

Aus dem Institut für Pathologie

der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Prof. Dr. med. Andreas Rosenwald

**Untersuchungen zu neuen potenziellen
N-Glykosylierungsmotiven in t(14;18)-positiven und
t(14;18)-negativen folliculären Lymphomen**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Claudia Maier

aus Bad Aibling

Würzburg, Februar 2023

Referent bzw. Referentin: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Ellen Leich-Zbat

Korreferent bzw. Korreferentin: Univ.-Prof. Dr. med. Franziska Jundt

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 15.09.2023

Die Promovendin ist Ärztin.

**Untersuchungen zu neuen potenziellen
N-Glykosylierungsmotiven in t(14;18)-positiven und
t(14;18)-negativen folliculären Lymphomen**

Inhaltsverzeichnis

Einleitung.....	3
Follikuläres Lymphom.....	3
N-Glycosylierung im FL	11
<i>IGVH4-34</i> als Keimbahngen in B-Zellerkrankungen	13
t(14;18)-negative folliculäre Lymphome.....	13
Zielsetzung der Arbeit.....	15
Material	16
Zusammensetzung der Studienkohorte	16
Methoden	20
Erstellen von Tissue Microarrays (TMAs) aus FFPE Gewebe	20
IHC Färbungen für BCL2	21
FISH Analysen.....	22
Mikroskopische Auswertung der FISH.....	23
DNA-Extraktion aus kryoasserviertem Frischgewebe	25
DNA-Sequenzierung mit dem LymphoTrack®.....	26
Bioinformatische Pipelines zur Definition des Tumorklons.....	27
Analyse neuer potentieller N-Glykosylierungsmotive.....	28
Statistische Analysen.....	31
Ergebnisse	33
Frequenz und Verteilung der t(14;18)-Translokation	33

Bestimmung des Haupttumorklons	36
FL I/II zeigten eine signifikant niedrigere klonale Frequenz als FL III/IV	39
Kein Unterschied in der SHM-Frequenz zwischen verschiedenen FL Subgruppen	41
Anzahl neuer potenzieller N-Glykosylierungsmotive	42
Unterschiedliche Präferenz für die Lokalisation der N-Glykosylierungsmotive in t(14;18)-positiven und negativen FL	43
Häufigkeit der Gennutzung von <i>IGHV4-34</i>	51
Die Verwendung des Aminosäuremotiv NLS beschränkte sich auf t(14;18)-negative FL.....	54
Entstehung der neu erworbenen N-Glykosylierungsmotive.....	55
Berechnung des progressionsfreien Überlebens in FL Subgruppen.....	59
Diskussion	62
Beobachtete Häufigkeit und Verteilung neu erworbener N-Glykosylierungsmotive im Vergleich mit der Literatur	63
Unterschiede zwischen frühen und fortgeschrittenen FL Stadien	65
Unterschiede zwischen t(14;18)-positiven und negativen FL.....	66
Unterschiedliche Nutzung der Keimbahnsequenz <i>VH4-34</i> in verschiedenen FL Subgruppen	68
Diskussion zu klinischen Kaplan-Meier-Korrelationen	71
Ausblick	72
Zusammenfassung.....	73
Literaturverzeichnis	74

Einleitung

Follikuläres Lymphom

Definition

Das Follikuläre Lymphom (FL) ist eine Neoplasie der B-Lymphozyten im Keimzentrum des lymphatischen Gewebes¹. Es gehört zu den indolenten non-Hodgkin Lymphomen und zeigt einen langen Verlauf mit Regression und Rezidiven¹. Das zytogenetische Merkmal der FL ist die chromosomale Translokation $t(14;18)(q32;q21)$, die man in 85-90% der Fälle beobachten kann¹. In 10-15% der FL ist diese Translokation demnach nicht nachweisbar^{2,3}.

Epidemiologie

Das FL macht 5% aller hämatologischen Neoplasien und 20-25% aller Non-Hodgkin Lymphome aus⁴. Damit ist es nach dem diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom (DLBCL) das zweithäufigste Non-Hodgkin Lymphom in den westlichen Ländern¹. Das FL tritt fast ausschließlich bei Erwachsenen mit einem medianen Altern von ≥ 60 Jahren auf. Mit einem Geschlechterverhältnis von $m:w = 1:1,7$ tritt es vermehrt bei Frauen auf^{4,5}. Die höchsten Inzidenzen finden sich in den USA, Australien, Südafrika und Westeuropa, während das FL in der asiatischen Bevölkerung zwei bis drei Mal seltener auftritt⁴. Neben genetischen und ethnischen Ursachen spielen in der Pathogenese des FL Umwelteinflüsse eine Rolle. So ist eine erhöhte Belastung der Umwelt mit Pestiziden sowie Herbiziden mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko assoziiert⁵.

Klinischer Hintergrund mit Stadien-Einteilung

Das FL manifestiert sich typischerweise in den Lymphknoten, kann allerdings auch in der Milz, dem Knochenmark sowie im peripheren Blut auftreten⁵. Auch extralymphatische Organe, wie beispielsweise der HNO-Bereich und der Gastrointestinaltrakt, können betroffen sein⁶. Bei den meisten Patienten ist aber eine Lymphadenopathie wesentlich⁵. Als weitere Symptome wurden Müdigkeit,

häufige Infektionen und die typische B-Symptomatik beschrieben, die sich durch Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsverlust kennzeichnet⁴.

Bei klinischem Verdacht auf ein FL wird die Diagnose mittels histologischer Untersuchung auf Basis einer operativen Lymphknotenexstirpation gestellt. Die ausführliche Diagnostik zum Ausbreitungsstadium schließt Analysen des Blutes, eine Knochenmarkpunktion, zytogenetische Untersuchungen für die Translokation t(14;18) und eine Bildgebung (CT Hals/Thorax/Abdomen) zum Staging mit ein⁷.

Die Einteilung in die Stadien I-IV richtet sich nach der Ann-Arbor-Klassifikation¹ (Tabelle 1):

Tabelle 1: Kriterien der klinischen Stadien Einteilung I-IV im Follikulären Lymphom nach „Innere Medizin“, Herold G.1

Stadium	Kriterien
I	Befall einer einzelnen Lymphknotenregion oder lokaler Befall eines einzigen extralymphatischen Organsystems
II	Befall von zwei oder mehreren Lymphknotenregionen auf einer Seite des Diaphragmas oder Vorkommen lokalisierter extranodaler Herde und Befall einer oder mehrerer Lymphknotenregionen auf einer Seite des Diaphragmas
III	Befall von zwei oder mehreren Lymphknotenregionen auf beiden Seiten des Diaphragmas oder Befall von lokalisierten extranodalen Herden und Befall von Lymphknoten auf beiden Seiten des Diaphragmas
IV	Disseminierter Befall eines oder mehrerer extralymphatischer Organsysteme mit oder ohne Befall von Lymphknoten

Zum lymphatischen Gewebe zählen Lymphknoten, Milz, Thymus, Waldeyer'scher Rachenring und die Appendix¹.

Da das FL lange asymptomatisch bleibt, sind die Mehrheit (70-80%) der Patienten und Patientinnen zum Diagnose-Zeitpunkt schon in den Stadien III oder IV und nur 20-30% in den Stadien I oder II⁴. Das frühe Stadium wird typischerweise mit einer lokalen Radiotherapie, eventuell kombiniert mit systemischer Therapie (Immun- oder Chemotherapie) behandelt⁷. Dies führt im Stadium I in 85% und im Stadium II in 35% zu einer kompletten Remission für 10 Jahre^{1,7}. Die FL im Stadium III und IV gelten als unheilbar⁴, allerdings mit einem mittleren Überleben von ca. 10 Jahren (2-20 Jahre)¹. Asymptomatischen

Patienten und Patientinnen mit geringem Leidensdruck wird zunächst die „watch and wait“- Strategie empfohlen⁴. Symptomatische Patientinnen und Patienten oder solche mit hohem Leidensdruck durch den Tumor werden typischerweise einer Immunchemotherapie mit R-CHOP (Rituximab + Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednisolon) unterzogen⁴.

Bei den meisten Patienten und Patientinnen kommt es zu einem Rezidiv oder zu einer Progression des Tumors. Zu diesem Zeitpunkt ist es wichtig diejenigen herauszufiltern, die früh eine histologische Transformation in eine aggressivere Variante entwickeln könnten (1-3% pro Jahr), bzw. die Patientinnen und Patienten, die von einer intensiveren Therapie, z.B. einer allogenen oder autologen Stammzelltransplantation, profitieren könnten⁴.

Histologie und Grading

Als Keimzentrumstumor besteht das FL vor allem aus Zentrozyten, Zentroblasten, folliculär, dendritischen Zellen (FDC), Makrophagen und T-Zellen⁹. Der Zentrozyt ist eine B-Zelle, meist mittlerer Größe, mit scharfkantiger Kerneinkerbung, dessen Chromatin mäßig dicht ist¹⁰. Normalerweise ist der Zytoplasmasaum so schmal und wenig basophil, dass er kaum sichtbar ist^{10,11}. Im Vergleich zum normalen Keimzentrum ist die Zahl der Zentrozyten beim FL typischerweise stark erhöht. Der Zentroblast, ein proliferierender aktivierter B-Lymphozyt, ist definiert als große Zelle mit feiner Kernchromatinstruktur, randständigen Nukleolen und einem schmalen Saum von basophilem Zytoplasma¹¹. Weiterhin unterscheidet sich die Verteilung dieser beiden Zellreihen, Zentroblasten und Zentrozyten von reaktiven Keimzentren. Im Vergleich zu normalen Keimzentren ist beim FL keine Unterteilung in eine helle, weniger proliferierende und dunkle, stärker proliferierende Zone erkennbar⁵. Auch fehlen meist eine klar umrandende Mantelzone und das typische „starry – sky pattern“ des reaktiven Keimzentrums. Das FL weist typischerweise ein folliculäres Wachstumsmuster (>75% folliculär), manchmal ein folliculäres und diffuses (25-75% folliculär) oder selten ein nur partiell folliculär und hauptsächlich diffuses Wachstumsmuster (<25% folliculär) auf⁵. Je diffuser die

Wachstumsarchitektur, desto häufiger ist das Auftreten einer Sklerose⁵. Die WHO klassifiziert das FL histologisch anhand der Anzahl an Zentroblasten in drei Grade:

Grad 1 = 0-5 Zentroblasten/Hauptgesichtsfeld

Grad 2 = 6-15 Zentroblasten/Hauptgesichtsfeld

Grad 3 = >15 Zentroblasten/Hauptgesichtsfeld⁹.

Zur Diagnosestellung sollten mindestens 10 Hauptgesichtsfelder (=sichtbarer Ausschnitt eines Präparats durch das Mikroskop bei 400-facher Vergrößerung) mit verschiedenen Follikeln untersucht werden⁵.

FL Grad 3 macht nur ca. 10% aller FL-Fälle aus und wird nochmals unterteilt in die Grade 3A und 3B. Während im FL Grad 3A Zentrozyten noch nachweisbar sind, besteht das FL Grad 3B komplett aus clusterförmig angeordneten Zentroblasten⁹. Das FL Grad 3B unterscheidet sich sowohl biologisch, als auch klinisch von FL Grad 1-3A. So konnte u.a. gezeigt werden, dass FL Grad 3B oft mit einem DLBCL assoziiert ist und statt der Translokation t(14;18) signifikant häufiger DNA-Rearrangements in 3q27 aufweist, welche das *BCL6* Proto-Onkogen betreffen¹². Dies lässt eine andere Pathogenese in der Tumortransformation vermuten. Somit gilt das FL Grad 3B eher als Variante des DLBCL und weniger als FL¹².

Immunhistochemie (IHC)

Der Immunphänotyp ist sehr charakteristisch und somit Teil der Diagnosestellung des FL. Die Tumorzellen weisen ein Oberflächen-Immunglobulin auf, meist IgM und IgD, seltener IgG⁹. Typisch ist die Expression von B-Zell-assoziierten Antigenen: CD19, CD20, CD22, CD79a⁵. Die FL-Zellen sind negativ für CD5 und CD43, was eine Unterscheidung zum nodulär wachsenden Mantelzell-Lymphom erlaubt. Wie in reaktiven Follikeln lassen sich die FDC positiv für CD21, CD23 und CD35 färben. Der Ki-67 Proliferationsindex steigt mit dem histologischen Grad (Grad 1-2: < 20%; Grad 3: > 20%)⁹. Typischerweise sind die neoplastischen

Zellen positiv für BCL2, BCL6 und CD10. Vor allem FL Grad 1-2 zeigen in 85-90% der Fälle eine BCL2 Überexpression⁵.

Pathogenese

Das FL ist eine B-Zell-Neoplasie, deren Differenzierung – wie oben anhand histologischer und molekularer Eigenschaften beschrieben – den Keimzentrums-B-Zellen entspricht. Die maligne Transformation ereignet sich während der physiologischen B-Zell-Reifung⁴.

VDJ Rekombination

Als erster Meilenstein in der Reifung von B-Zellen ist die VDJ Rekombination des B-Zell-Immunglobulins im Knochenmark zu nennen. Hier wird der variable B-Zell-Rezeptor (BCR) aus den verschiedenen Segmenten des Immunglobulins, den Segmenten der Keimbahn (V, D und J Segmente) individuell zusammengesetzt¹³. Dabei werden durch die RAG („recombination-activating gene“) Enzyme Doppelstrangbrüche in der DNA erzeugt, was ein Risiko für genetische Alterationen birgt¹⁴. Während dieses Prozesses kann es auch zu der Translokation $t(14;18)(q32;q21)$ kommen, die für viele FL eine frühe Mutation in der FL-Pathogenese darstellt¹³.

Translokation $t(14;18)$ und weitere genetische Aberrationen

Bei der $t(14;18)$ gerät das BCL2 Onkogen, das auf Chromosom 18 lokalisiert ist, unter die Kontrolle des „Enhancers“ des Immunglobulin-Schwerkettengens (*IGHV*), das sich auf Chromosom 14 befindet. Das Ergebnis dieser chromosomalen Translokation ist die Überexpression des anti-apoptotischen BCL2 Onkogens, das im Selektionsprozess der Affinitätsreifung des BCR mit FDC und T-Zellen den Tumorzellen einen starken Überlebensvorteil verschafft⁴. Die $t(14;18)$ scheint jedoch nicht alleine für die Tumorgenese verantwortlich zu sein, denn sie findet sich – Prävalenz mit dem Alter steigend¹⁵ – auch im Blut und lymphatischen Gewebe von gesunden Individuen¹⁶. Außerdem zeigten Studien mit $t(14;18)$ transgenen Mäusen nur eine geringe Transformation zum Lymphom,

die gleichzeitig mit einer langen Latenz einhergeht. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die verlängerte Lebenszeit der B-Lymphozyten, die unter anderem durch die Überexpression des BCL2-Onkogens verursacht wird, das Risiko für weitere Mutationen in späteren Phasen der B-Zell-Reifung erhöht und die FL Pathogenese fördert¹⁷. Weitere Ereignisse, die zu genetischen Aberrationen führen könnten, sind die somatische Hypermutation (SHM) und der Klassenwechsel der Immunglobuline (Ig) (CSR = class switch recombination) im Keimzentrum. SHM beschreibt einen Vorgang, der durch Mutationen in der variablen Region des BCR die Affinität zum Antigen erhöht. Dabei werden die Immunglobuline mit der höchsten Affinität zum Antigen positiv selektiert¹⁴. Die CSR führt durch veränderte Zusammensetzung der konstanten Region des Immunglobulins zur Expression verschiedener Antikörper-Isotypen (IgG, IgA oder IgE)¹⁴. Zu häufigen sekundären chromosomalen Aberrationen zählen $-1p32-36$, $-6q11-27$, $+7$, $+12$ und $+X$ ¹⁴. Zudem wurden zahlreiche Mutationen in Histon-modifizierenden Genen, wie den Histon-Methyltransferasen *MLL2* und *EZH2* und Histon-Acetylasen *CREBBP*, *EP300* und *MEF2B*, gefunden, von denen Mutationen wie *CREBBP* und *EP300* auch als sehr frühe genetische Events beschrieben wurden¹³. Daher wurde das FL auch schon als Tumor des Epigenoms bezeichnet¹³.

FL Microenvironment

Die neoplastischen B-Zellen im FL stehen in ihrer folliculären Wachstumsweise in engem Kontakt mit T-Zellen, FDC, Makrophagen, Fibroblasten und anderen Stromazellen. Diese Zellen interagieren mit den FL-Zellen und unterstützen ihre Proliferation, indem sie Adhäsionsmoleküle, andere stimulierende Oberflächenmoleküle und Wachstumsfaktoren/Zytokine produzieren¹⁴. Eine hohe Anzahl an Tumor-assoziierten Makrophagen bzw. eine Anreicherung von Makrophagen-assoziierten Gensignaturen gilt im FL als schlechter prognostischer Faktor^{18,19}. Der Krankheitsverlauf scheint also von den nicht malignen, infiltrierenden Immunzellen mitbestimmt zu werden¹⁹.

B-Zell-Rezeptor (BCR)

B-Zellen sind während ihrer gesamten Entwicklungsstufen abhängig von Signalen, die der BCR übermittelt. Besonders im Keimzentrum führt eine hohe Antigenaffinität, präsentiert durch FDCs, bei den schnell proliferierenden B-Zellen zu starken stimulierenden Signalen für die weitere Differenzierung – andernfalls kommt es zur Apoptose¹⁴. Die hohe Antigenaffinität entsteht durch SHM der variablen Ig-Gen-Region des BCR²⁰. Für das FL ist der andauernde Prozess der SHM typisch und führt zu erheblicher intraklonaler Heterogenität²⁰. Der BCR, ein membrangebundenes Ig, besteht aus zwei identischen schweren Ketten (IGHV) und zwei identischen leichten Ketten (IGVL), die, über Disulfidbrücken verknüpft, eine Y-förmige Struktur bilden (Abbildung 1)²¹. Die Antigenbindungsstelle setzt sich jeweils aus der VH- und VL-Region an den äußeren „Armen“ des Y-förmigen Ig zusammen²¹. Eine Gelenkregion verbindet die konstanten Regionen der schweren Ketten miteinander²¹. Die Struktur der schweren Ketten bestimmt die Klasse des Antikörpers. Es werden fünf Hauptklassen unterschieden: IgM, IgD, IgG, IgA und IgE. Die VH- und VL-Regionen sind je einzigartig in ihrer Variabilität²¹. Diese Variabilität konzentriert sich besonders auf bestimmte Abschnitte, nämlich drei hypervariable Regionen CDR1, CDR2 und CDR3 in der V-Domäne²¹. Die Abschnitte zwischen den hypervariablen CDR-Regionen zeigen weniger Variabilität und werden auch Gerüstregionen („framework regions“) genannt: FR1, FR2, FR3, FR4²². Sie enthalten vor allem stille Mutationen und schützen somit die strukturelle Integrität der Ig²². Die variablen CDR1-CDR3 Regionen zeigen ein Übermaß an Mutationen, die zum Austausch von Aminosäuren führen, und modifizieren damit die Affinität zum Antigen²². Auch räumlich kommt den CDR-Regionen als Schleifen am Rand von β -Faltblättern in der 3-D-Struktur eine exponierte Position zu²¹. So bilden die CDRs der VH- und VL- Domänen zusammen eine einzigartige Antigenbindungsstelle²¹. Da sie komplementär zum Antigen sind, werden sie „komplementaritäts bestimmende Regionen“ (CDRs, complementarity determining regions) genannt²¹.

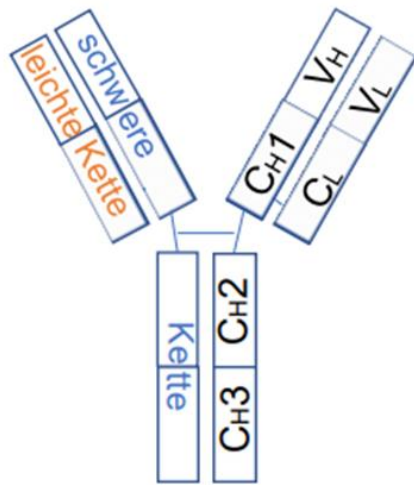


Abbildung 1: vereinfachtes Schema des B-Zell Rezeptors nach „Janeway Immunologie“, Murphy K.16, Immunglobuline bestehen aus zwei leichten und zwei schweren Polypeptidketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. CH1, CH2, CH3 und CL, konstante Regionen des BCR; VH und VL, variable Regionen des BCR; BCR, B-Zell-Rezeptor; H, schwere Kette; L, leichte Kette;

Die IGVH-CDR3 – lokalisiert an der VH-DH-JH Verbindungsstelle – ist die hypervariabelste Region der drei CDRs und für die Antigen-spezifität von größter Bedeutung²³ (Abbildung 2). Je nach Länge des DH Gensegments, Deletionen oder Insertionen von Nukleotiden während der VDJ Rekombination variiert die Länge der CDR3 Region zwischen 15-85 bp¹⁴.

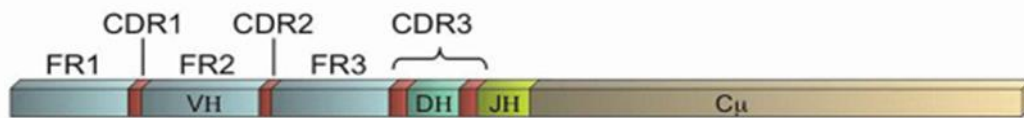


Abbildung 2: Schematische Abbildung der variablen Region des BCR: Dargestellt sind die drei hypervariablen Regionen CDR1, CDR2 und CDR3 sowie FR1, FR2, FR3 des VH-Gens. Die variabelste Region CDR3 ist an der Verbindungsstelle zwischen den VH-DH-JH Gensegmenten lokalisiert. BCR, B-Zell-Rezeptor; CDR, komplementaritäts bestimmende Region; FR, Gerüstregionen („framework region“);

FL Zellen zeigen eine ziemlich gleiche VH Gen-Familie und Gensegmentnutzung (VH, DH und JH) wie normale B-Lymphozyten²⁰, allerdings signifikant mehr Mutationen im IGVH Gen, was mit einer verlängerten Lebensspanne im Keimzentrum einhergeht¹⁴. Die Tatsache, dass der BCR an der Oberfläche der

FL-Zellen erhalten bleibt, obwohl das *IGHV* Gen in den meisten Fällen durch die t(14;18) Translokation zerstört wird, weist auf eine wichtige Funktion des BCR im Überleben der Tumorzellen hin²⁴. Unter anderem steht zur Debatte, ob Antigene die Proliferation der neoplastischen B-Zellen unterstützen. So wurden in ca. 20% der FL Autoantigene entdeckt, die den BCR stimulieren und damit zur Proliferation der Tumorzellen beitragen könnten^{25,26}. Unter diesen konnte bei einem FL-Patienten bzw. einer FL-Patientin Myoferlin und in einer anderen Studie bei 19,35% der getesteten FL Vimentin als Autoantigene identifiziert werden^{25,26}. Außerdem zeigten sich bei FL im Vergleich zu normalen B-Zellen Unterschiede in der Aminosäuresequenz der IGHV-Region des BCR, hervorgerufen durch SHM, die mit einer N-Glykosylierung im IGHV in Verbindung standen²⁷.

N-Glykosylierung im FL

79-100% der FL erwerben durch SHM funktionelle N-Glykosylierungsmotive in der IGV Region, hauptsächlich den CDR²⁷. Das Motiv für die N-Glykosylierung ist die Aminosäureabfolge Asparagin (Asn)-X-Serin (Ser)/Threonin (Thr), wobei X jede Aminosäure außer Prolin (Pro), Asparaginsäure (Asp) oder Glutaminsäure (Glu) sein kann²⁷. Diese Motive finden sich so gut wie nicht in normalen B-Zellen und nicht funktionellen VH Gensequenzen. Daher wird davon ausgegangen, dass diese Motive positiv selektiert werden und einen Überlebensvorteil für die Tumorzellen darstellen²⁷. Weiterhin zeigt das Fehlen von N-Glykosylierung beim Multiplem Myelom (MM) und chronischer lymphatischer Leukämie (CLL), dass Zellen, die das Keimzentrum bereits verlassen haben, keine N-Glykosylierungsmotive anreichern²⁷. Keimzentrum-assoziierte Lymphome hingegen erwerben N-Glykosylierungsmotive: das endemische Burkitt Lymphom (BL) in 82%, das sporadische BL in 43% und das DLBCL in 41% der Fälle²⁷.

Da die Anreicherung von neuen Motiven bereits in den frühesten morphologisch erkennbaren Tumorstadien, der *in-situ* follikulären Neoplasie des FL nachgewiesen werden konnte, wird geschlossen, dass sie in einem frühen Stadium der malignen Transformation auftreten²⁸. Der Prozess der N-Glykosylierung findet in den Zellorganellen, z.B. dem Endoplasmatischen

Retikulum (ER) und dem Golgi-Apparat statt²⁹. Zuerst werden an der ER Membran die Oligosaccharide mit speziellen Glykosyltransferasen an Dolichylpyrophosphat gebunden²⁹. Im Lumen des ER erkennen anschließend Oligosaccharyltransferasen die Aminosäuresequenz, (Asn)-X-Serin (Ser)/Threonin (Thr) der Polypeptide und verknüpfen die Seitenkette der Aminosäure Asn mit den Oligosacchariden²⁹. Die weitere Modifikation und Prozessierung der entstandenen Glykoproteine findet nun im Golgi-Apparat statt²⁹. Die N-Glykosylierungsmotive im FL zeichnen sich insbesondere dadurch aus, dass die angefügten Zucker in der IGV Region vor allem aus Oligomannosen, („unreifen“ Zuckern) bestehen³⁰. Die meisten Glykoproteine an Oberflächen und auch in der konstanten Region des Ig setzen sich hingegen aus komplex prozessierten Zuckern zusammen³⁰. Dies deutet darauf hin, dass die Oligomannosen der V-Region für die Enzyme im Golgi-Apparat, wie Mannosidase I und GlcNAc Transferase I sterisch unzugänglich sind und somit nicht komplett prozessiert werden³⁰.

C-Typ Lektine können wiederum spezifisch an die mannosylierten BCR binden und die Proliferation der FL-Zellen stimulieren³¹. Bei den C-Typ Lektinen handelt es sich vor allem um den Mannose Rezeptor (MR) und das DC-SIGN („DC-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin“), die von Zellen des angeborenen Immunsystems, nämlich Makrophagen und dendritischen Zellen, exprimiert werden³¹. Die Bindung und Aktivierung von DC-SIGN führt in den FL-Zellen zur BCR Aggregation, intrazellulärem Ca^{2+} -Anstieg, anhaltender Phosphorylierung der Milz Tyrosin Kinase (SYK), der Protein Kinase B (AKT), der Phospholipase C- γ -2 (PLC γ 2) und der extrazellulären Signal-regulatorischen Kinase (ERK) sowie einer erhöhten Expression von cMYC^{31,32}. Zusammenfassend ermöglicht die beschriebene funktionale Verbindung zwischen den Tumorzellen und dessen Mikroumgebung den FL-Zellen das Überleben und die Proliferation durch Antigen-unabhängige BCR Stimulation³¹.

IGHV4-34 als Keimbahngen in B-Zellerkrankungen

In lymphatischen Tumoren wie der CLL findet man das *IGHV4-34* in 8.9% aller Keimbahnsequenzen³³. Ungefähr ein Drittel davon zeichnet sich dadurch aus, dass sie in ihrer V-D-J Rekombination stereotypisch sind – weisen also eine spezifische Kombination von IGHV-IGHD-IGHJ auf³⁴. Aufgrund der identischen Eigenschaften der antigenbindenden CDR3 Region wird angenommen, dass in der Tumorgenese der CLL die Bindung eines spezifischen Antigens eine entscheidende Rolle spielt³⁵. Auch das Mantelzell-Lymphom, ein Non-Hodgkin Lymphom, präsentiert ein eingeschränktes Genrepertoire mit u.a. *IGHV4-34*³⁶. Hadzidimitriou et al. konnten dabei in etwa 10% stereotypische CDR3 Regionen identifizieren³⁶. Bei der Kälteagglutinin-Krankheit und im systemischen Lupus erythematoses (SLE) ist das *IGHV4-34* sogar bekannt für seine intrinsische Autoreaktivität, welche sich dadurch auszeichnet, dass sich Auto-Antigene gegen Erythrozyten bzw. B-Zellen richten^{37,38}.

t(14;18)-negative folliculäre Lymphome

Wie bereits weiter oben erwähnt, ist die Translokation t(14;18) ein zentrales Merkmal für das FL². Diese mittels FISH (Fluorescence in situ hybridization) detektierbare Translokation ist in 85-90% des Stadium III/IV FL Grad 1–3A nachweisbar². So verbleiben ungefähr 15% der FL, denen die t(14;18) fehlt². In FL der frühen Stadien I und II kann der Bruch im BCL2 Genlocus sogar nur in knapp 50% der Fälle detektiert werden³⁹. Interessanterweise wurde aber auch in den meisten Fällen (69-86%) der t(14;18)-negativen FL eine Überexpression von BCL2 detektiert³⁹. Die molekular-genetische Ursache hierfür wurde bislang nur unzureichend erforscht. Morphologisch können die t(14;18)-negativen FL nicht von den t(14;18)-positiven FL unterschieden werden³. Beide Gruppen exprimieren Keimzentrumsmarker wie *BCL6* und *IRF8*², zeigen eine fortlaufende SHM der *IGHV* Gene⁴⁰, gleiche Level in der Expression der AID (aktivierungsinduzierte Cytidin-Desaminase)⁴⁰ und genetische Mutationen, wie sie für Keimzentrums-Lymphome typisch sind (z.B. Zugewinne im REL Genlocus)². Auch hinsichtlich klinischer Parameter, wie dem Gesamtüberleben,

konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden³⁹. Diese Ergebnisse stützen die These, dass sowohl die t(14;18)-positiven als auch -negativen FL zur selben Entität gehören³⁹. Mittels Genexpressionsanalysen und immunhistochemischen Färbungen konnte jedoch eine Anreicherung von z.B. Post-Keimzentrums B-Zell- und Immun-Signaturen, eine erhöhte IRF4/MUM1 Expression sowie eine reduzierte CD10 Expression in t(14;18)-negativen FL beobachtet werden². Diese Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass t(14;18)-negative FL einen späten Keimzentrums-Phänotyp in der B-Zell Differenzierung aufweisen^{2,3,39}. Diese Theorie konnte auch im Rahmen einer „whole exome“ Sequenzierstudie bestätigt werden³. Vergleichbar zu der Situation im ABC-DLBCL (activated B-cell-like DLBCL) - einer post-Keimzentrumsneoplasie - konnte auch bei t(14;18)-negativen FL eine Anreicherung von Mutationen in NF-κB-assoziierten Genen beobachtet werden⁴¹. Eine molekulare Analyse von FL und transformierten FL ergab zudem, dass t(14;18)-negative FL zu ca. 50% in ein ABC-DLBCL transformieren, während t(14;18)-positive FL nahezu ausschließlich in ein GCB-DLBCL (germinal center B-cell-like DLBCL) transformieren⁴².

Trotz des gleichen Ausmaßes an SHM zwischen den beiden FL Subgruppen konnten Zugewinne von neuen potentiellen N-Glykosylierungsmotiven weniger häufig in t(14;18)-negativen FL gefunden werden⁴¹. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Gruppe der t(14;18)-negativen FL oder zumindest ein Teil davon eine andere Pathogenese aufweisen als t(14;18)-positive FL, die möglicherweise eher von Prozessen der Antigenpräsentation als durch Bindung an Lektine gesteuert wird⁴¹.

Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war t(14;18)-positive und -negative FL I/II und/oder III/IV zum Zeitpunkt der Primärdiagnose und/oder dem Zeitpunkt eines Rezidivs hinsichtlich ihrer erworbenen, potentiellen N-Glykosylierungsmotive im *IGHV* zu untersuchen. Dabei galt es, Unterschiede in der Frequenz, Lokalisation und der Zusammensetzung der Motive zwischen den Subgruppen hervorzuheben. Über diesen Ansatz sollten zum einen frühere Ergebnisse an einer größeren Kohorte bestätigt und zum anderen neue Erkenntnisse über die zugrunde liegende molekulare Pathogenese von t(14;18)-positiven und -negativen FL gewonnen werden. Darüber hinaus sollten Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen FL I/II und FL III/IV sowie zwischen FL zum Zeitpunkt der Primärdiagnose und zum Zeitpunkt eines Rezidivs herausgearbeitet werden.

Hinweis: Ein Großteil dieser Arbeit wurde bereits veröffentlicht (Maier et al., Blood Advances, 2021)⁶². Veröffentlichte Ergebnisse wurden in den Legenden im Ergebnisteil kenntlich gemacht und entsprechend zitiert. Auf die Zitate der eigenen Publikation an einzelnen Textstellen wurde im Rahmen dieser Arbeit verzichtet.

Material

Zusammensetzung der Studienkohorte

In dieser Arbeit wurden retrospektive Analysen an Restmaterial von anonymisierten FL aus dem pathologischen Institut der Universität Würzburg und dem Robert-Bosch-Krankenhaus in Stuttgart durchgeführt, wobei bei der Verwendung des Probenmaterials die notwendige Diagnostik sowie die Verpflichtung für Rückstellproben gewährleistet wurde. Es wurden 140 FL Fälle Grad 1-3A mit Formalin-fixiertem Paraffin-eingebettetem (FFPE) Gewebe und ausschließlich follikulärem Wachstumsmuster anhand der Kriterien der WHO-Klassifikation für Tumoren der Hämatopoetischen und Lymphoiden Gewebe (WHO 2008 und 2017) lichtmikroskopisch ausgewählt - darunter 29 FL I/II zum Zeitpunkt der Primärdiagnose (PD-FL), 61 PD-FL III/IV und 50 FL I-IV zum Zeitpunkt eines Rezidivs (R-FL). (Tabelle 2).

Tabelle 2: Übersicht der gesamten Studienkohorte unterteilt in die Stadien I-IV, PD- und R-FL sowie der Herkunft der FL-Fälle (Würzburg, Stuttgart); n.a., nicht angegeben; PD, Primärdiagnose; R, Rezidiv; I/II, FL im frühen klinischen Stadium; III/IV, FL im fortgeschrittenen klinischen Stadium;

Stadium	PD-FL	R-FL
I/II aus Würzburg	17	7
I/II aus Stuttgart	12	3
III/IV aus Würzburg	40	26
III/IV aus Stuttgart	21	
n.a. aus Würzburg		14

Unter den 140 FL Fällen war für 133 Fälle kryoasserviertes Frischgewebe verfügbar, 83 PD-FL und die 50 R-FL Fälle (Abbildung 8). Die Einteilung in das klinische Stadium I-IV war in 119 FL Fällen bekannt, dagegen fehlte die Kenntnis des Stadiums in 14 R-FL Fällen (Tabelle 2). Die DNA-Sequenzierung mit dem

LymphoTrack® wurde an allen t(14;18)-negativen FL und an einem Teil der t(14;18)-positiven FL mit kryoasserviertem Frischgewebe durchgeführt (Abbildung 8). Somit wurde von insgesamt 68 FL (je zwölf t(14;18)-positive und -negative PD-FL I/II, je neun t(14;18)-positive und -negative PD-FL III/IV sowie 15 t(14;18)-positive und elf t(14;18)-negative R-FL I-IV) die klonale VDJ-Sequenz des Ig-Gens identifiziert (Tabelle 4).

Die vorliegende Arbeit wurde durch die lokale Ethikkommission genehmigt (20220412 02) und wurde in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt.

Sonden für die FISH Analyse

Vysis LSI <i>BCL2</i> Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe	Abbott GmbH & Co.KG, Wiesbaden
Vysis LSI <i>IGH/BCL2</i> Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe	Abbott GmbH & Co.KG, Wiesbaden

Antikörper für die Immunhistochemie

Antikörper	Verdünnung	Vorbehandlung	Firma
BCL2, Clone 124	1:400	CS pH 6,0	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
BCL2, Clone E17	1:100	CS pH 6,0	Cell Marque, Rocklin, CA, USA

Lösungen und Puffer für FISH-Analyse und DNA-Extraktion

Sondenmix

Einfacher Gewebeschnitt

Aqua destillata, H ₂ O	2,00 μ l
Sonde	1,00 μ l
Vysis LSI/WCP Hybridisation Buffer	7,00 μ l

Tissue Microrarray (TMA)

Aqua destillata, H ₂ O	3,00 μ l
Sonde	1,50 μ l
Vysis LSI/WCP Hybridisation Buffer	10,50 μ l

Waschlösung

Aqua destillata, H ₂ O	95,00 ml
NP40, Igepol CA-630	300,00 μ l
SCC, Standard Saline Citrat (20x)	2,00 ml

Tris/EDTA-Puffer, pH = 9,0

Aqua destillata, H ₂ O	2000,00 ml
EDTA, C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈ Ethylendiamintetraessigsäure	1,49 g
TRIS, C ₄ H ₁₁ NO ₃ Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	12,11 g

SSC, Standard Saline Citrat (20x), pH = 7,0

Aqua destillata, H ₂ O	1000,00 ml
Natriumacetat, C ₂ H ₃ NaO ₂	88,20 g
Natriumchlorid, NaCl	175,30 g

PBS, Phosphate Buffered Saline (10x), pH = 7,3

Aqua destillata, H ₂ O	1000,00 ml
Dinatriumphosphat, Na ₂ HPO ₄	14,40 g
Kaliumhydrogenphosphat, KH ₂ PO ₄	2,00 g
Natriumchlorid, NaCl	80,00 g
Kaliumchlorid, KCl	2,00 g

Kit für die DNA-Extraktion

Inhalt des AllPrep DNA Mini Kits Cat. 80204 der Firma Qiagen GmbH, Hilden

AllPrep DNA Mini Spin-Säulen
Puffer RLT Plus *
Puffer RW1 *
Puffer RPE
RNase freies Wasser
Puffer AW1 *
Puffer AW2
Puffer EB

* enthält Guanidiniumnitrat

Sonstige Chemikalien für FISH und DNA-Extraktion

Aqua destillata, H ₂ O	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
β-Mercaptoethanol	AppliChem, Darmstadt

Dinatriumhydrogenphosphat, Na ₂ HPO ₄	Merck KGaA, Darmstadt
EDTA, C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈ Ethylendiamintetraessigsäure	AppliChem, Darmstadt
Ethanol, C ₂ H ₆ O	AppliChem Darmstadt
FixoGum Rubber Cement	Marabuwerke GmbH & Co. KG, Tamm
Immersionsöl	AppliChem, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat, KH ₂ PO ₄	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchlorid, KCl	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumacetat, C ₂ H ₃ NaO ₂	AppliChem, Darmstadt
Natriumchlorid, NaCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natronlauge (1M), NaOH	Merck KGaA, Darmstadt
NP40, Igepol CA-630	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Pepsin Kristallin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
RNAse	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Salzsäure (1M), HCl	AppliChem, Darmstadt
TRIS, C ₄ H ₁₁ NO ₃ Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	AppliChem, Darmstadt
Vectashield Mounting Medium for Fluorescence with DAPI	Vector Laboratories, Burlingame
Vysis LSI/WCP Hybridisation Buffer	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Xylol Isomerengemisch, C ₈ H ₁₀	CSC Jäckle Chemie GmbH & Co. KG, Nürnberg

Laborgeräte

Fluoreszenz-Mikroskop, DM RBE Fluo	Leica Mikrosystems Vertrieb GmbH, Wetzlar
Heizblock, Model 12895	Medax Nagel GmbH, Kiel
Manual Tissue Arrayer, MTA-1	Beecher Instruments Inc., Sun Prairie
Spectrophotometer, NanoDrop ND-1000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
pH-Meter, pH 330	WTW GmbH, Weilheim
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Präzisionswaage, Adventurer Typ ARRW60	Ohaus Corporation, Pine Brook
Präzisionswaage, Adventurer Typ AR1530	Ohaus Corporation, Pine Brook
Wärmeschrank Typ UFB 400	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Wasserbad 37°C, Typ 3047	Köttermann GmbH, Uetze
Wasserbad 73°C, Typ FRG WB 14	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Wasserbad 100°C, Typ 1002	GFL mbH, Burgwedel
Vortex, Genie 2, GLW L46	Scientific Industries Inc., Bohemia
Zentrifuge, Typ 5415D	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge 5424	Eppendorf AG, Hamburg

Methoden

Erstellen von Tissue Microarrays (TMAs) aus FFPE Gewebe

Für die Analyse der *BCL2*-Bruchpunkte und *BCL2*-Translokation mittels FISH und *BCL2* Expressions-Analysen mittels IHC wurden vier TMAs erstellt - getrennt nach PD- und R-FL, wobei die PD-FL nochmals nach Stadium I/II oder Stadium III/IV unterteilt wurden (Tabelle 3).

Tabelle 3: Übersicht der Verteilung der FL-Fälle auf den vier verschiedenen TMAs; PD, Primärdiagnose; R, Rezidiv; I/II, FL im frühen klinischen Stadium; III/IV, FL im fortgeschrittenen klinischen Stadium;

Stadium	TMA 1	TMA 2	TMA 3	TMA 4
I/II – PD-FL	29 Fälle			
III/IV – PD-FL		33 Fälle	26 Fälle	
I-IV –R-FL				43 Fälle

Die Tumorareale wurden zuvor mikroskopisch an Hämatoxylin und Eosin (HE)-gefärbten Ganzschnitten identifiziert und das zu stanzende Areal auf dem Deckglas des jeweiligen Falls markiert. Diese Markierungen wurden anschließend auf die zugehörigen Paraffin Gewebelöcke der einzelnen Fälle übertragen. Neun FL Fälle erwiesen sich aufgrund der Gewebestruktur nicht als geeignet für einen TMA und wurden als Ganzschnitte in der FISH bzw. IHC gefärbt und analysiert. Die vier TMAs wurden unter Verwendung des Manual Tissue Arrayer (MTA-1) angefertigt. Gewebezylinder einer Größe von 0,6 mm wurden aus dem markierten Areal des Donor-Gewebeblocks mit einer Hohlzylinder gestanzt und in einen leeren Akzeptor-Block aus speziellem Paraffin (Schmelzpunkt 56 bis 58 °C) eingesetzt. Zuvor wurde an einer ausgewählten Stelle aus dem Akzeptorblock eine Stanze gleicher Größe entnommen. Um die Gewebestanden richtig zu positionieren, verfügte der MTA-1 über eine Millimeter-Anzeige, die das genaue Einsetzen in den fest eingespannten Akzeptor-Paraffinblock gewährleistete. So konnten mehrere Stanzen der verschiedenen

FFPE Gewebeblöcke in einer zuvor festgelegten Anordnung in den Empfängerblock eingebracht werden. Diese Anordnung der jeweiligen Fälle wurde für jeden TMA-Block vorher in einer Karte festgelegt (Abbildung 3).

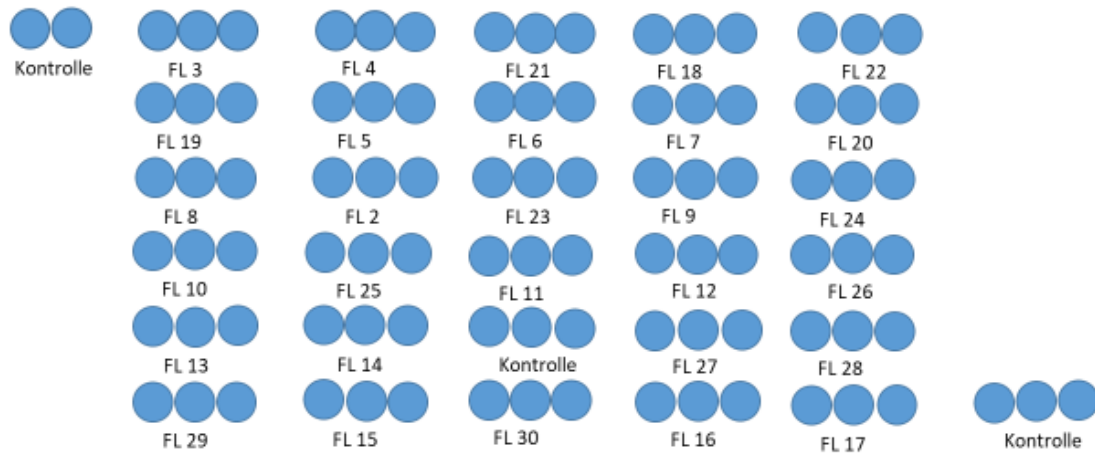


Abbildung 3: Beispielhafte Darstellung der Karte des TMA 1 mit 29 PD-FL Fällen des Stadiums I/II (TMA 2-4 im Anhang)

Von jedem FL Fall wurden jeweils drei Gewebestanden mit einem Millimeter Abstand horizontal nebeneinander platziert. In der Horizontalen hatten die einzelnen FL Fälle zwei Millimeter und in der Vertikalen einen Millimeter Abstand voneinander. Um sich makro- und mikroskopisch auf dem TMA zu orientieren, wurden Kontrollen mit nicht-neoplastischen reaktiven Lymphknoten am linken Rand oben und Kontrollen mit Nierengewebe am rechten Rand unten eingesetzt. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle aus nicht-neoplastischem reaktivem Lymphknoten in jeden TMA eingebaut.

IHC Färbungen für BCL2

IHC Färbungen zur Beurteilung der BCL2-Expression wurden an 140 FL Fällen durchgeführt. Die Färbungen erfolgten an den vier zuvor beschriebenen TMA-Schnitten und neun Ganzschnitten mit dem Tecan Färbeautomat im Rahmen von etablierten Standardprotokollen in der Routinediagnostik. Das FL-Gewebe wurde dabei separat mit den zwei verschiedenen BCL2-Antikörpern (Clone 124 und Clone E17) hybridisiert.

Die Auswertung erfolgte durch lichtmikroskopische Beurteilung der Anzahl der positiv gefärbten FL-Zellen, wobei die Fälle je nach Menge der gefärbten Zellen in folgende Rubriken unterteilt wurden:

0: <15% BCL2-positive FL-Zellen

1: >15% BCL2- positive FL-Zellen

2: >30% BCL2- positive FL-Zellen

Ein Fall wurde als BCL2-positiv gewertet, wenn mehr als 30% der FL-Zellen für mindestens einen der beiden BCL2-Antikörper positive waren, also mit „2“ beurteilt wurde.

FISH Analysen

Die FISH wurde wie die IHC Färbungen für BCL2 an den vier verschiedenen TMAs und neun Ganzschnitten durchgeführt. Zunächst wurden die Fälle mit der Sonde „Vysis LSI *BCL2* Dual Color Break Apart Rearrangement Probe“ (*BCL2*-BAP) für die Detektion des *BCL2*-Bruchpunktes an der Region *18q21* ausgewertet. Anschließend wurde die Fusion des *BCL2* Gens mit dem *IGH* Gen auf Chromosom *14q32* und damit die *t* (14;18) (*q32;q21*) Translokation mit der Sonde „Vysis LSI *IGH/BCL2* Dual Color Dual Fusion Probe“ (*IGH/BCL2*-Fusion) untersucht. Weiterhin wurden drei Kontrollgewebe (reaktive Lymphknoten) für die Berechnung des Cut-off-Wertes der *IGH/BCL2*-Fusionssonde verwendet. Für die *BCL2*-BAP Sonde wurde der bereits etablierte Cut-off-Wert von 14% verwendet. Für die FISH wurden zunächst die Objektträger (OT) der TMA-Schnitte sowie der Ganzschnitte auf einer 75 °C heißen Heizplatte ca. 30 min vorgewärmt, um das Paraffin zum Schmelzen zu bringen. Zur weiteren Entwässerung wurden die Schnitte 2x 10 Minuten in Xylol und anschließend für je fünf Minuten in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 90%, 70% Ethanol) und destilliertem Wasser inkubiert. Die thermische Denaturierung der DNA erfolgte in einer 100 °C heißen Tris-EDTA Lösung für zehn Minuten. Nach 10-minütiger Abkühlung in der Tris-EDTA-Lösung wurden die OT 1h in einer 37 °C warmen RNase-Lösung inkubiert, um noch eventuell vorhandene RNA zu entfernen. Anschließend wurden die OT in einer 2x SSC Lösung gewaschen. Zur Proteolyse wurden die OT 10 Minuten in einer 37 °C vorgewärmten Pepsinlösung inkubiert und danach für die pH-

Neutralisierung fünf Minuten in einer PBS Lösung gewaschen. Wiederum für fünf Minuten erfolgte die Entwässerung der OT in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%,90%,100%). Nach 10-minütiger Trocknung der Gewebeschnitte bei 37 °C wurde die weitere Arbeit im abgedunkelten Raum durchgeführt. Es erfolgte nun das Pipettieren von je 10 µl Sondenlösung auf das Gewebe und die Abdeckung mit dem Deckgläschen mit Fixogum Kleber. Um die DNA weiter zu denaturieren und somit für die Sonde zugänglich machen, wurden die OT bei 75 °C auf der Heizplatte inkubiert. Die eigentliche Hybridisierung fand nun über Nacht bei 37°C in einem Wärmeschrank statt. Am nächsten Tag wurde wieder im abgedunkelten Raum gearbeitet. Nach Ablösung des Deckgläschens wurden die Gewebeschnitte von unspezifisch gebundener DNA befreit und dafür zwei Minuten in einer Waschlösung bei 73 °C und anschließend eine Minute in einer Waschlösung bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend erfolgte kurz das Eintauchen in destilliertes Wasser. Zur Beurteilung der Schnitte mit dem Fluoreszenzmikroskop wurde je ein Tropfen Vectashield/DAPI in die Mitte auf jedes Gewebe pipettiert und mit einem Deckglas luftblasenfrei abgedeckt. Die OT wurden im Kühlschrank bei 4 °C abgedunkelt aufbewahrt.

Mikroskopische Auswertung der FISH

Die Auswertung, der mit FISH-Sonden hybridisierten Fälle, erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop, DM RBE Fluo und der Verwendung eines 100x Ölimmersionsobjektivs. Pro Fall wurden 100 Zellkerne nach den spezifischen Signalkonstellationen (siehe Erklärung in den beiden folgenden Abschnitten) untersucht. Für die Auszählung wurden im Falle der Ganzschnitte drei verschiedene Areale des FL Gewebes und im Falle der TMAs alle vorhandenen Gewebestanzten eines Falles bewertet.

Auswertung der Hybridisierung mit der „Vysis LSI *BCL2* Dual Color Break Apart Rearrangement Probe“ (*BCL2-BAP*)

Eine Zelle wurde negativ für den *BCL2*-Bruchpunkt gewertet, wenn der Zellkern eine Konstellation von zwei gelben Fusionssignalen zeigte (Abbildung 4). Positiv

für den *BCL2*-Bruchpunkt wurde eine Zelle gewertet, deren Zellkern neben einem gelben Fusionssignal ein rotes und ein grünes Signal aufwies (Abbildung 4).

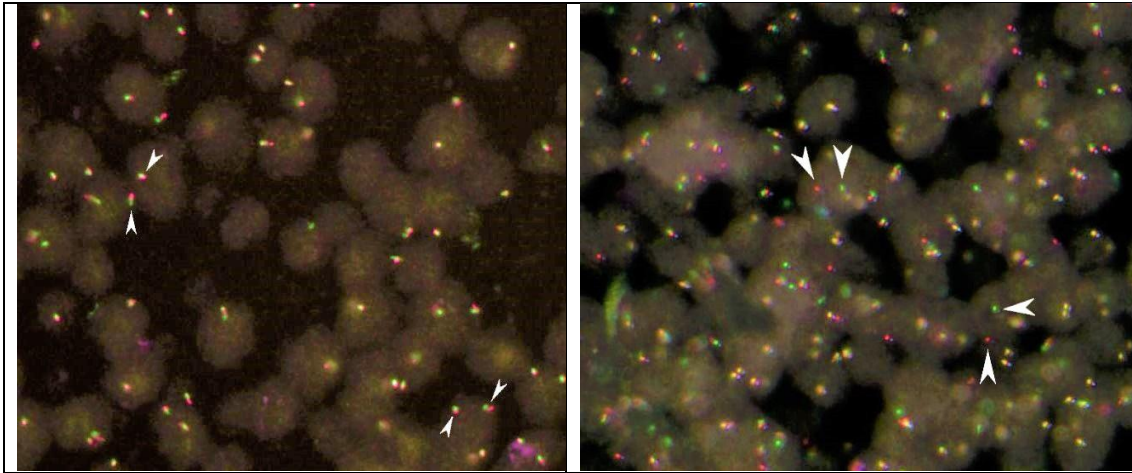


Abbildung 4: Auswertung der Hybridisierung mit der Sonde „Vysis LSI *BCL2* Dual Color Break Apart Rearrangement Probe“ (*BCL2*-BAP) an FL-Gewebe mit dem Fluoreszenzmikroskop, DM RBE Fluo, 100x Vergrößerung: (links) Pfeile markieren gelbe Fusionssignale → Zellen negativ für *BCL2*-Bruchpunkt; (rechts) Pfeile markieren ein getrenntes rotes und grünes Signal → Zellen positiv für *BCL2*-Bruchpunkt

Auswertung der Hybridisierung mit „Vysis LSI *IGH/BCL2* Dual Color Dual Fusion Probe“ (*IGH/BCL2*-Fusion)

Eine Zelle wurde negativ für die *BCL2/IGH*-Fusion und damit die t(14;18) gewertet, wenn der Zellkern zwei rote und zwei grüne Signale beinhaltete (Abbildung 5). Positiv für die *BCL2/IGH*-Fusion war eine Zelle, deren Zellkern neben einem roten und einem grünen ein gelbes Fusionssignal enthielt (Abbildung 5). Zwei Signale wurden als getrennt interpretiert, wenn der Abstand zwischen diesen größer als der zweifache durchschnittliche Signal-Durchmesser war. Der Cut-off-Wert dieser Sonde wurde anhand der Auswertung von drei Fällen nicht-neoplastischen Lymphknotengewebes berechnet. Dabei wurde von jedem Fall die Anzahl positiv gefärbter Zellen bestimmt und der Durchschnitt daraus mit der dreimaligen Standardabweichung addiert. Cut-off-Wert: Durchschnitt + 3 × SD.

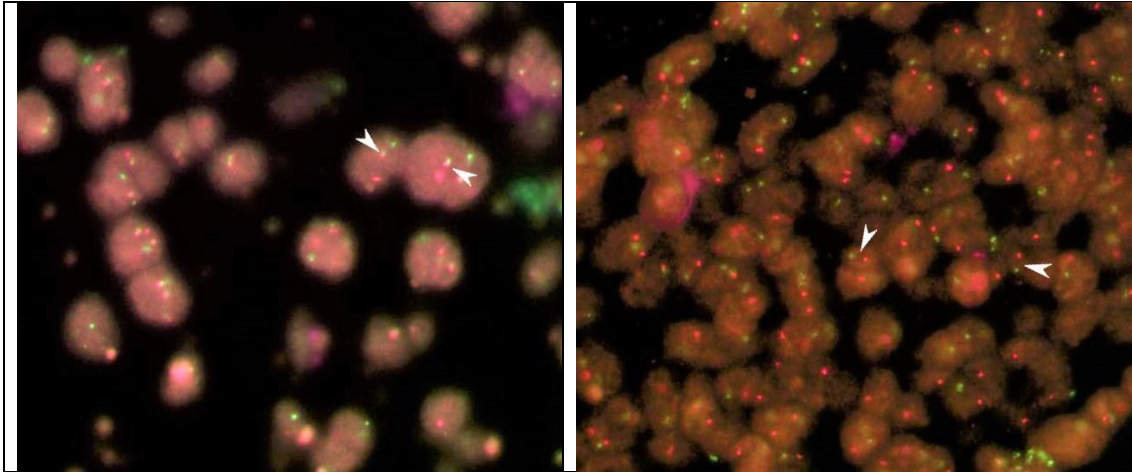


Abbildung 5: Auswertung der Hybridisierung mit der Sonde „Vysis LSI IGH/BCL2 Dual Color Dual an FL-Gewebe mit dem Fluoreszenzmikroskop, DM RBE Fluo, 100x Vergrößerung: Fusion Probe“ (IGH/BCL2-Fusion): (links) Pfeile markieren getrennte rote und grüne Signale → Zellen negativ für die BCL2/IGH Fusion; (rechts) Pfeile markieren gelbes Fusionssignal → Zellen positiv für die BCL2/IGH Fusion

DNA-Extraktion aus kryoasserviertem Frischgewebe

Für die Extraktion von DNA aus kryoasserviertem FL-Frischgewebe wurde das DNA/RNA Mini Kit verwendet. Insgesamt wurde DNA aus 100 Fällen des pathologischen Instituts der Universität Würzburg isoliert, darunter 14 PD-FL I/II, 38 PD-FL III/IV und 48 R-FL I-IV. Bei insgesamt 33 FL Fällen aus dem Robert-Bosch-Krankenhaus in Stuttgart lag die extrahierte DNA bereits vor.

Zuerst wurden pro Fall 10-15 Raspeln von 10µm Dicke mit dem Kryomikrotom vom jeweiligen Frischgewebe abgenommen und in ein gekühltes 1,5ml Eppendorf-Tube übertragen. Dem geraspelten Frischmaterial wurde mit dem AllPrep Kit, gemäß dem Herstellerprotokoll, ein Gemisch aus Puffer und β -Mercaptoethanol zur Lyse der Zellen hinzugefügt. Das Lysat wurde für einige Sekunden auf einem Vortex-Mixer gründlich durchmischt und zur vollständigen Homogenisierung mindestens je fünf Mal zuerst mit einer Nadel mit Spritze der Größe 20G und anschließend 26G aufgezogen. Nach Zentrifugation für drei Minuten wurde der Überstand in die AllPrep DNA Spin-Säule pipettiert, wo die DNA effektiv gebunden wurde. Mit Zugabe von Puffer, gemäß dem Herstellerprotokoll, wurde die DNA Spin-Säule nun mehreren Zentrifugation- und Waschschritten unterzogen. Die DNA wurde anschließend in 100µl Puffer EB

eluiert und die jeweilige Konzentration in ng/μl mit dem NanoDrop Spectrophotometer photometrisch bestimmt. Dabei wurde für die Bestimmung der Quantität die Absorption bei 260nm und für die Bestimmung der Qualität bzw. der Reinheit der DNA die Absorption bei 280nm gemessen. Das Verhältnis aus A260/A280 sollte bei einer reinen DNA-Probe bei ≤1,8 liegen. Gelagert wurde die extrahierte DNA in einem 1,5 ml Eppendorf-Tube bei -20°C.

DNA-Sequenzierung mit dem LymphoTrack®

Zur Identifizierung von klonalen VDJ-Sequenzen des Ig-Gens wurden von 68 FL mit bekanntem Translokationsstatus (Tabelle 4) in der „Clinical and Experimental Onco-Hematology Unit des National Cancer Institute“ in Aviano, Italien mit dem LymphoTrack® IGH FR1 Assay Amplikons generiert und diese anschließend mit dem Miseq® von Illumina mit einer durchschnittlichen Amplikolänge von 452 bp sequenziert.

Tabelle 4: Übersicht der mit dem LymphoTrack® sequenzierten PD- und R-FL Fälle, unterteilt nach Stadium und t(14;18)-Translokationsstatus; PD, Primärdiagnose; R, Rezidiv; U, unbekanntes FL Stadium; I/II, FL im frühen klinischen Stadium; III/IV, FL im fortgeschrittenen klinischen Stadium; Modifiziert nach Leich et al. Blood Adv (2021) 5 (23): 4890–4900. © the American Society of Hematology. R, Rezidiv;

Stadium	t(14;18)-positive FL	t(14;18)-negative FL	Total
PD-FL I/II	12	12	24
PD-FL III/IV	9	9	18
R-FL I/II	5	4	9
R-FL III/IV	9	2	11
R-FL U	1	5	6
Total	36	32	68

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur DNA-Amplifikation wurde an allen Fällen gemäß dem Standardprotokoll mit dem LymphoTrack® IGH FR1 Assay Kit durchgeführt. Der Assay bestand aus einem speziellen Master Mix, der den Vorwärtsprimer, der an der konstanten FR1 Region band, wie auch den Rückwärtsprimer, der an der JH-Region band, enthielt (Abbildung 6). Somit flankierten diese Primer die V-J Region, woraus pro Tumorklon Amplikons mit einem einzigartigen *IGHV* Gen in Länge und Basensequenz resultierten. FL, die ein spezifisches *IGHV* Gen nur in weniger als 5% der Sequenzen aufwiesen, galten als polyklonal. Bei diesen Fällen wurde zusätzlich zum IGH FR1 - wiederum gemäß dem Protokoll - der FR2 und FR3 Assay sowie der IGH Leader Assay durchgeführt (Abbildung 6). Der Leader Assay wurde speziell für Fälle konzipiert, die aufgrund von SHM nicht in der FR1 Primer Region gebunden werden konnten. Diese beinhalteten demnach einen Vorwärtsprimer, der bereits an der „Leader“-Sequenz der VH Region bzw. an der FR2 und FR3 Region ansetzte.



Abbildung 6: Schematische Darstellung der Ansatzstellen der verschiedenen Primer an der IGHV-Region (Leader-, VH-, JH-Region) des B-Zell Rezeptors, modifiziert von LymphoTrack® IGH (FR1, FR2, & FR3) Assays – MiSeq®, Invivocribe

Bioinformatische Pipelines zur Definition des Tumorklons

Um die häufigste *IGHV* Gensequenz als Tumorklon zu identifizieren und zu quantifizieren, wurden von Dr. Riccardo Bomben bioinformatische Analysen mit der LymphoTrack Software (LS) (LymphoTrack Software – MiSeq v2.1.1) durchgeführt. Um die Ergebnisse der LS zu verifizieren, wurde von Dr. Riccardo Bomben zusätzlich eine selbst etablierte bioinformatische Pipeline „Define Clone“, welche auf pRESTO, Change-O und Shazam basiert^{43,44}, angewandt. Der Unterschied zu der LS bestand darin, dass nicht nur die ersten 200

verschiedenen Sequenzen analysiert wurden, sondern die Analyse von allen verschiedenen Sequenzen erfolgte, die im Next Generation Sequencing (NGS) Prozess generiert wurden. Dabei wurden auch alle Sequenzen inkludiert, die mehr als zwei verschiedene Nukleotide aufwiesen, natürlich immer vorausgesetzt, dass das VH/JH-Gen gleich war und die CDR3 Sequenz ähnlich, was einen Vorteil für Tumore mit hoher intraklonaler Variabilität wie das FL darstellte. Dadurch konnte eine bessere Übersicht über die verschiedenen Repräsentationen der Tumorklone erstellt werden. Für die Zuordnung der speziellen *IGHV* Gensequenz des Tumorklons zur Keimbahn, die Quantifizierung der SHM und die Bestimmung der Lokalisation der neuen N-Glykosylierungsmotive wurde die IMGT Datenbank (http://www.imgt.org/IMGT_vquest/vquest) verwendet. Die sequenzierten Daten sind deponiert in der „National Center for Biotechnology Information Sequence Read Archive database NCBI“ (Beitrittsnummer: PRJNA722152).

Analyse neuer potentieller N-Glykosylierungsmotive

Für die Analyse von neuen potentiellen N-Glykosylierungsmotiven wurden im Rahmen dieser Arbeit die Nukleotidsequenzen des Tumorklons pro FL mit den Sequenzen des nächstverwandten Keimbahngens verglichen und dabei eventuelle Basenabweichungen identifiziert. Hierfür wurde für alle FL zur Auswertung sowohl das IgBLAST Tool (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) (Abbildung 7) als auch zur Kontrolle das IMGT/V-QUEST mit der IMGT Datenbank (http://www.imgt.org/IMGT_vquest/vquest) verwendet. Der prozentuale Wert der Homologie zum nächstverwandten Keimbahngen ergab sich aus dem Verhältnis der mutierten Basen zur Gesamtzahl der Nukleotide des Keimbahngens. Diese Analyse gab auch Auskunft darüber, ob es sich um eine produktive Nukleotidsequenz handelte, d.h. ob sie erfolgreich in eine Aminosäuresequenz ohne Stoppcodon übersetzt werden konnte oder, ob es zu einer Verschiebung des Leserasters kam. Darüber hinaus wurden die Regionen CDR1, CDR2 und CDR3 sowie die dazwischenliegenden Framework Regionen bestimmt. Bei der Identifikation der CDR Regionen spielte historisch das System von Kabat et al. eine große Rolle, das auf der Annahme basierte, dass die CDRs

die variabelsten Regionen im *IGHV* Gen darstellten. Die Länge von CDR3 wurde dabei von Codon 94 bis Codon 102 festgelegt⁴⁵. Aktueller ist die Nomenklatur des „IMGT“, die die Definition nach Kabat et al. mit den neuen Erkenntnissen der Antikörper-3D-Struktur vereint. Hier wird die CDR3 Region von Codon 104 bis 118 festgelegt⁴⁶.

Neue potentielle N-Glykosylierungsmotive wurden manuell in der Aminosäuresequenz detektiert. Bei der Entstehung solcher Motive kommt es durch Mutation des Keimbahngens zu der neuen Aminosäureabfolge Asn-X-Ser/Thr, wobei X jede Aminosäure außer Pro, Asp oder Glu sein kann²⁷ (Abbildung 7). N-Glykosylierungsmotive, die sich bereits in der Keimbahnsequenz zeigten, wurden nicht als neues potentielles N-Glykosylierungsmotiv gewertet, sondern zu den natürlichen Motiven gezählt.

Domain classification requested: imgt

V-(D)-J rearrangement summary for query sequence (multiple equivalent top matches, if present, are separated by a comma):

Top V gene match	Top D gene match	Top J gene match	Chain type	stop codon	V-J frame	Productive	Strand
IGHV3-11*01	IGHD7-27*01	IGHJ6*02	VH	No	In-frame	Yes	+

V-(D)-J junction details based on top germline gene matches:

V region end	V-D junction*	D region	D-J junction*	J region start
GCGAG	GGGTT	CTGGGGA	CCTAATAAACGTCC	ACTAC

*: Overlapping nucleotides may exist at V-D-J junction (i.e., nucleotides that could be assigned to either rearranging gene). Such nucleotides are indicated inside a parenthesis (i.e., (TACAT)) but are not included under the V, D or J gene itself.

Sub-region sequence details:

	Nucleotide sequence	Translation	Start	End
CDR3	GCGAGGGGTTCTGGGGACCTAATAAACGTCCACTACTATGGTATGGACGTC	ARGSGDLINVHYGMDV	220	270

Alignment summary between query and top germline V gene hit:

	from	to	length	matches	mismatches	gaps	identity(%)
FR1-IMGT	1	6	6	6	0	0	100
CDR1-IMGT	7	30	24	15	9	0	62.5
FR2-IMGT	31	81	51	46	5	0	90.2
CDR2-IMGT	82	105	24	20	4	0	83.3
FR3-IMGT	106	219	114	104	10	0	91.2
CDR3-IMGT (germline)	220	224	5	5	0	0	100
Total			224	196	28	0	87.5

```

<FR1-><-----CDR1-IMGT-----><-----FR2-IMGT----->
A S G F I F K N Y N M T W I R Q A P G K G L E W I S N I T T
V 87.5% (196/224) Query_1 1 GCCTCTGGATTCAATTTTAAAACTATATATATTCCTGGATCCGCCAGGCTCCAGGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTCACATATACACT 90
IGHV3-11*01 70 .....CC..C.GTG...CT.C...GC.....G.....G.....T.....G..G. 159
A S G F T F S D Y Y M S W I R Q A P G K G L E W V S Y I S S
V 87.1% (195/224) IGHV3-11*04 70 .....CC..C.GTG...CT.C...GC.....G.....G.....T.....G..G. 159
V 86.6% (194/224) IGHV3-48*03 70 .....CC..C.GT.GT...G.A...AC...G.....G.....G.....T.....G..G. 159

DR2-IMGT-----><-----FR3-IMGT----->
T G N T I S Y A D S V K G R F T I S R D N A K Q S L F L Q M
V 87.5% (196/224) Query_1 91 ACTGGTAATACCATATCCTATGCAGACTCAGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGGGACAACGCCAAGCAATCACTGTTTTGCAAATG 180
IGHV3-11*01 160 .G.....G.....A...C.....T.....A.C.....A.C.....A.C..... 249
S G S T I Y Y A D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L Q M
V 87.1% (195/224) IGHV3-11*04 160 .G.....G.....A...C.....T.....A.C.....A.C.....A.C..... 249
V 86.6% (194/224) IGHV3-48*03 160 .G.....G.....A...C.....T.....A...C.....A.C.....A.C..... 249

-----><-----CDR3-IMGT----->
N S L R V A D T A V Y Y C A R G S G D L I N V H Y Y G M D V
V 87.5% (196/224) Query_1 181 AACAGCCTGAGAGTCGCGGACACGGCGTTTATTACTGTGCGAGGGGTTCTG6GGGACCTAATAAACGTCCACTACTATGGTATGGACGTC 270
IGHV3-11*01 250 .....C..A.....G.....G.....G.....G.....G.....T.....G..G. 293
N S L R A E D T A V Y Y C A

```

Abbildung 7: Beispielhafte Darstellung der Auswertung einer IGHV-Sequenz mit dem IgBLAST Tool (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>): Die Nukleotidsequenz des jeweiligen Tumorklons entspricht hier der „Query_1“ Sequenz. Das am nächsten verwandte Keimbahngen hier „IGHV3-11*01“ (Homologie 87,5 %) erscheint direkt darunter, wobei die abweichenden Basen und die entsprechenden Aminosäuren (violett) angegeben sind. Das durch Mutation neu erworbene N-Glykosylierungsmotiv wurde manuell identifiziert und markiert (rote Kästchen).

Statistische Analysen

Test auf Signifikanz

Unter Verwendung des Programms IBM SPSS Statistics Version 25 (IBM SPSS Statistics, IBM Corporation, Armonk, NY) und Graph-Pad Prism 8.3.1 (GraphPad Software, La Jolla, CA) wurden mit Hilfe von Kontingenztabelle, welche die Häufigkeiten bestimmter Eigenschaften - wie z.B. Motive in einer speziellen *IGHV* Gen Region - enthielten, Unterschiede zwischen verschiedenen Subgruppen berechnet. Als Signifikanztest für die Bestimmung der Abhängigkeit zweier dichotomer Variablen wurde der exakte Fisher-Test verwendet, da dieser auch bei geringer Stichprobengröße als Alternative zum Chi-Quadrat-Test zuverlässige Resultate ermittelt⁴⁷. Wenn nicht anders angegeben, entsprachen die errechneten Signifikanzwerte der 2-seitigen Signifikanz. Zweitens wurde zum statistischen Vergleich zweier unabhängiger Subgruppen der Mann-Whitney-U-Test (MWU-Test) angewandt. Odds ratios (ORs) und 95% Konfidenzintervalle (KI) wurden berechnet mit SciStat (OR calculator [scistat.com]).

Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde auf 5% festgelegt, wodurch eine statistische Signifikanz bei einem p-Wert von ≤ 0.05 erreicht wurde.

Kaplan Meier-Analysen

Von insgesamt 35 FL Fällen, deren *IGHV* Gen hinsichtlich neuen N-Glykosylierungsmotiven untersucht wurde, waren klinische Daten zum Geschlecht, Alter, Diagnosedatum und Progressionsdatum bzw. bei fehlender Progression zum letzten Vorstellungsdatum verfügbar (Tabelle 5). Davon stammten 9 FL aus der Gruppe der frühen Stadien, 11 Fälle aus der Kohorte der späten Stadien und 15 Fälle aus den FL Rezidiven (Tabelle 5).

Tabelle 5: Übersicht der PD- und R-FL Fälle Stadium I-IV nach t(14;18)-Translokation mit klinischen Daten für die Kaplan Meier Korrelationen; I/II, FL im frühen klinischen Stadium; III/IV, FL im fortgeschrittenen klinischen Stadium; U, unbekanntes FL Stadium;

Stadium	t(14;18)-positive FL	t(14;18)-negative FL
PD-FL I/II	7	2
PD-FL III/IV	7	4
R-FL -IV	9	6

Zur Auswertung und Darstellung wurde das Programm IBM SPSS Statistics Version 26 verwendet. Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde auf 5% festgelegt, wodurch eine statistische Signifikanz bei einem p-Wert von ≤ 0.05 erreicht wurde. Dabei wurde das Patientenkollektiv hinsichtlich des Translokationsstatus, des Geschlechtes sowie neu erworbener N-Glykosylierungsmotive auf das progressionsfreie Überleben nach Kaplan-Meier untersucht.

Die statistischen Auswertungen wurden von der Doktorandin selbst durchgeführt.

Ergebnisse

Frequenz und Verteilung der t(14;18)-Translokation

Frequenz der t(14;18)-Translokation in der gesamte Kohorte (PD- und R-FL I-IV)

Um für die Sequenzierung der *IGHV* und die darauf folgende Bestimmung neu erworbener N-Glykosylierungsstellen eine mit t(14;18)-negativen FL angereicherte Kohorte zusammenzustellen, untersuchten wir zunächst den t(14;18)-Status und bestimmten die *BCL2* Expression.

Für die *BCL2*-BAP Sonde galt, dass ein Fall als *BCL2*-Bruchpunkt positiv gewertet wurde, wenn die Anzahl der positiven Zellen über 14% lag, andernfalls galt der Fall als negativ. Die Berechnung für die *IGH/BCL2*-Fusion Sonde ergab einen Cut-off-Wert von 13%.

In der gesamten Studienkohorte (PD-FL I-IV und R-FL I-IV) ergab die Auswertung der FISH, dass 26% (34 von 131) der FL Fälle t(14;18)-negativ waren. 82% dieser Fälle wiesen mittels IHC dennoch eine *BCL2*-Expression auf (Abbildung 8). 74% (97 von 131) der FL Fälle waren positiv für den *BCL2*-Bruchpunkt, davon konnten 72% (94 von 131) als t(14;18)-positiv bestätigt werden (Abbildung 8). Die in der FISH *BCL2*-Bruchpunkt-positiven Fälle waren in der IHC in 97% positiv für die *BCL2*-Expression.

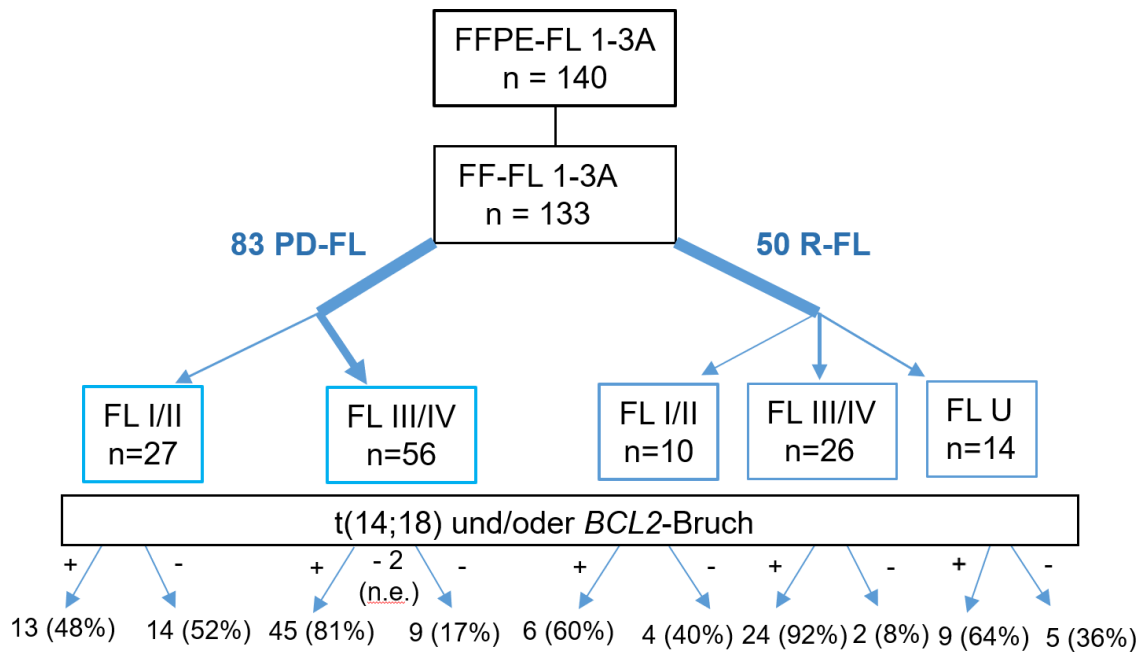


Abbildung 8: Übersicht der Anzahl der FL Fälle, welche der FISH Analyse unterzogen wurden und daraus resultierende Ergebnisse. FFPE, Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe, FF, kryoasserviertes Frischgewebe; PD, Primärdiagnose; R, Rezidiv; I/II, FL im frühen klinischen Stadium; III/IV, FL im fortgeschrittenen klinischen Stadium; U, unbekanntes FL Stadium; Modifiziert nach Leich et al. Blood Adv (2021) 5 (23): 4890–4900. © the American Society of Hematology. Eine generelle Erlaubnis von Blood Advances liegt vor (siehe Anhang).

Von den insgesamt 140 Fällen, die einer FISH Analyse unterzogen wurden, konnten zwei Fälle (1.4%) aufgrund unzureichender Gewebequalität mit der *BCL2*-BAP-Sonde nicht ausgewertet werden. 3.6% der Fälle (5/140) lieferten aus gleichem Grund kein Ergebnis mit der *BCL2/IGH*-Fusion-Sonde. In der IHC Färbung für die *BCL2*-Expression konnten 2 von 140 Fällen (1.4%) aufgrund schlechter Gewebequalität nicht ausgewertet werden. Eine erfolgreiche DNA Extraktion fand in 98% der FL Fälle statt. In einem Fall (1%) konnte keine ausreichende Qualität erzielt werden und in einem anderen Fall (1%) war die Ausbeute zu gering.

Frequenz der t(14;18) in PD-FL I/II

In der Kohorte der PD-FL I/II waren 48% (13/27) negativ und 52% (14/27) der Fälle positiv für den *BCL2*-Bruchpunkt (Abbildung 8). 13 von 14 *BCL2*-Bruchpunkt positiven Fällen konnten mit der Sonde *BCL2/IGH*-Fusion als t(14;18)-positiv bestätigt werden. In einem Fall (1/14) konnte aufgrund unzureichender Gewebequalität die Sonde *BCL2/IGH*-Fusion nicht ausgewertet werden. In der Gruppe der t(14;18)-negativen FL waren 85% (11/13) positiv für die *BCL2*-Expression in der IHC. Ein Fall (1/13) der t(14;18)-negativen FL konnte aufgrund fehlenden FFPE Gewebes nicht bezüglich der *BCL2*-Expression in der IHC ausgewertet werden.

Frequenz der t(14;18) in PD-FL III/IV

In der Kohorte PD-FL III/IV waren 17% (9/54) der auswertbaren Fälle *BCL2*-Bruchpunkt negativ, während 81% (45/54) der Fälle sich positiv für den *BCL2*-Bruchpunkt zeigten (Abbildung 8). In 44 der 45 Fälle konnte die Fusion von *BCL2* und *IGH* auf Chromosom 14 mit der Sonde *BCL2/IGH*-Fusion bestätigt werden. In einem der 45 Fälle zeigte sich bei positivem Ergebnis mit der *BCL2-BAP* Sonde keine t(14;18)-Translokation, also ein negatives Ergebnis mit der *BCL2/IGH*-Fusion Sonde. Hier liegt wahrscheinlich die alternative Translokation t(2;18)(p11;q21) vor. Wiederum zwei Fälle (2/45) der *BCL2*-Bruchpunkt positiven Fälle konnten bei mangelnder Gewebequalität nicht mit der *BCL2/IGH*-Fusion Sonde ausgewertet werden. Drei Fälle waren aufgrund schlechter Gewebequalität weder mit der *BCL2-BAP* noch mit der *BCL2/IGH*-Fusion Sonde auswertbar. Positiv in der *BCL2*-Expression in der IHC zeigten sich 78% (7/9) der t(14;18)-negativen FL.

Frequenz der t(14;18) in R-FL I-IV

In der Kohorte der R-FL I-IV konnte in 22% (11/50) der Fälle der *BCL2*-Bruchpunkt nicht nachgewiesen werden (Abbildung 8). Dementsprechend waren 78% (39/50) der Fälle *BCL2*-Bruchpunkt positiv. 37 von 39 *BCL2*-Bruchpunkt positiven Fällen konnten mit der Sonde *BCL2/IGH*-Fusion auch als positiv für die Translokation t(14;18) verifiziert werden. In den übrigen zwei Fällen (2/39) konnte bei positivem *BCL2*-Bruchpunkt keine t(14;18) mit der *BCL2/IGH*-Fusion nachgewiesen werden. In der IHC zeigten 91% (10/11) der t(14;18)-negativen FL eine *BCL2*-Expression.

Bestimmung des Haupttumorklons

In 60 von 68 Fällen (88.2%) konnte mittels *IGHV*-Sequenzierung mit der FR1 oder der Leader-JH-Strategie ein Tumorklon identifiziert werden (Abbildung 9, Tabelle 6). In einem der acht verbliebenen Fälle (1/68) konnte nur mit der „FR2-JH-Strategie“ ein Tumorklon detektiert werden. In 7 von 68 Fällen (10,3%) war der Tumorklon weder mit der „FR1, FR2 oder FR3-JH“-Strategie noch mit der „Leader-JH“-Strategie nachweisbar, das heißt, es konnte mit keiner Strategie eine klonale Frequenz von >5% erzielt werden. Sechs dieser Fälle waren per Definition polyklonal. Der Ausschluss eines Falls erfolgte, da keine produktiven *IGHV* Sequenzen erfasst wurden (nur Klone mit Stopcodon oder Leserasterverschiebung).

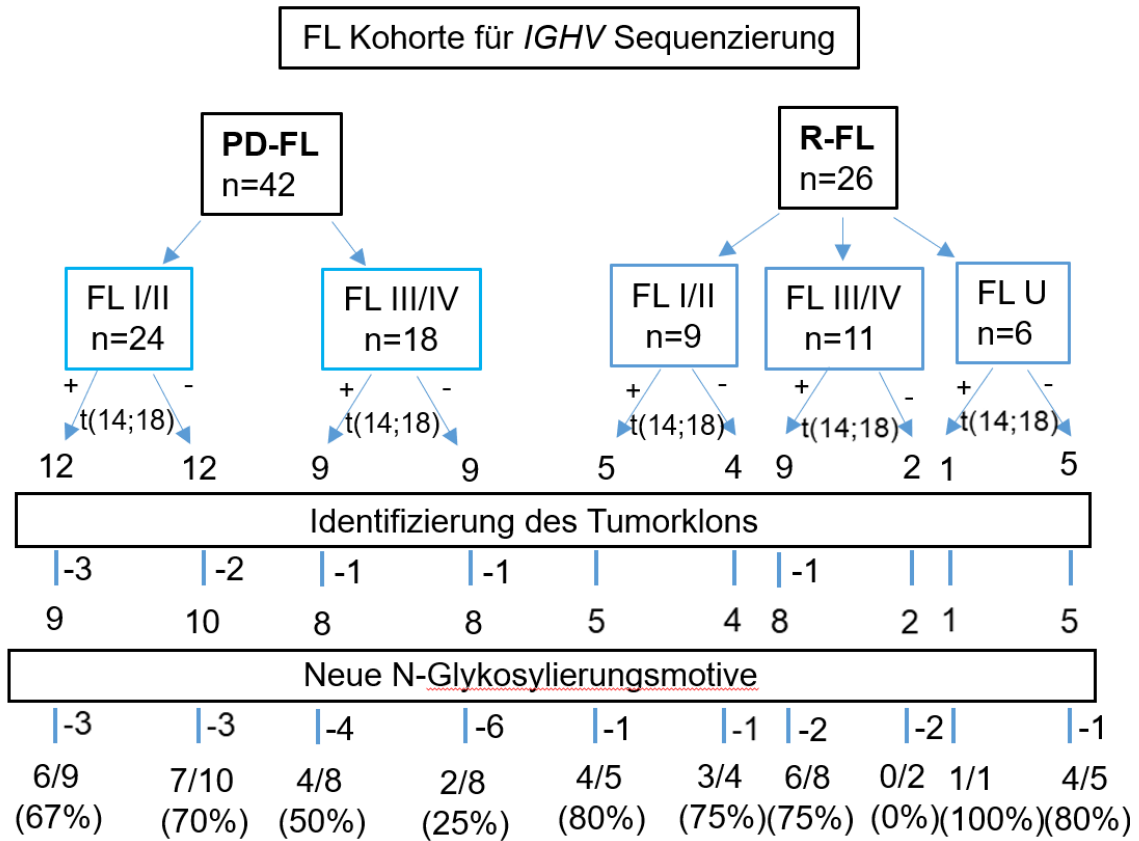


Abbildung 9: Übersicht der Anzahl der FL Fälle, welche mit dem LymphoTrack® sequenziert wurden (IGHV-Sequenzierung), und daraus resultierende Ergebnisse (Identifizierung des Tumorklons, Detektion von neuen N-Glykosylierungsmotiven). PD, Primärdiagnose; R, Rezidiv; I/II, FL im frühen klinischen Stadium; III/IV, FL im fortgeschrittenen klinischen Stadium; U, unbekanntes FL Stadium; Modifiziert nach Leich et al. Blood Adv (2021) 5 (23): 4890–4900. © the American Society of Hematology. Eine generelle Erlaubnis von Blood Advances liegt vor (siehe Anhang).

Der Prozentsatz der Fälle mit klonaler Amplifikation unterschied sich über die gesamte Kohorte (PD- und R-FL) nicht wesentlich zwischen den frühen (28/33: 84.8%) und späten (26/29: 89.7%) FL Stadien, sowie t(14;18)-positiven (34/39: 87.2%) und -negativen (29/32: 90.6%) FL (Tabelle 6).

Tabelle 6: Übersicht der PD- und R-FL I-IV mit klonaler Amplifikation. PD, Primärdiagnose; R, Rezidiv; I/II, FL im frühen klinischen Stadium; III/IV, FL im fortgeschrittenen klinischen Stadium;

FL Kohorte	Anzahl der Fälle mit klonaler Amplifikation % PD-FL	Anzahl der Fälle mit klonaler Amplifikation % R-FL
t(14;18)-positiv FL I/II	75 (9/12)	100 (5/5)
t(14;18)-negativ FL I/II	83.3 (10/12)	100 (4/4)
FL I/II	79.2 (19/24)	100 (9/9)
t(14;18)-positiv FL III/IV	88.9 (8/9)	89 (8/9)
t(14;18)-negativ FL III/IV	88.9 (8/9)	100 (2/2)
FL III/IV	88.9 (16/18)	91 (10/11)
t(14;18)-positiv FL I-IV	83.3 (20/24)	93 (14/15)
t(14;18)-negativ FL I-IV	85.7 (18/21)	100 (11/11)
FL I-IV	81.4 (35/43)	96.2 (25/26)

FL I/II zeigten eine signifikant niedrigere klonale Frequenz als FL III/IV

Für alle Fälle, in denen ein Haupttumorklon identifiziert werden konnte, wurde dessen Frequenz im Tumorgewebe ermittelt. Im Durchschnitt lag die Frequenz des Tumorklons über alle Stadien hinweg mit Einbezug der Rezidiv-Fälle bei 61.2%. Bezüglich der klonalen Frequenz ergab sich ein deutlicher Unterschied zwischen den frühen und späten Stadien (Abbildung 10). Während die Stadien I/II (PD+R) nur eine Frequenz von 51.2% des Klons aufwiesen, betrug diese bei den Stadien III/IV (PD+ R) 75.4%. Dieser Unterschied gestaltete sich wiederum unter Einbezug der Rezidive mit $p=0.015$ als signifikant (Abbildung 10). Zwischen t(14;18)-positiven (62.5%) und -negativen (65.1%) FL konnte bezüglich der mittleren klonalen Frequenz des Haupttumorklons kein signifikanter Unterschied beobachtet werden (Tabelle 7).

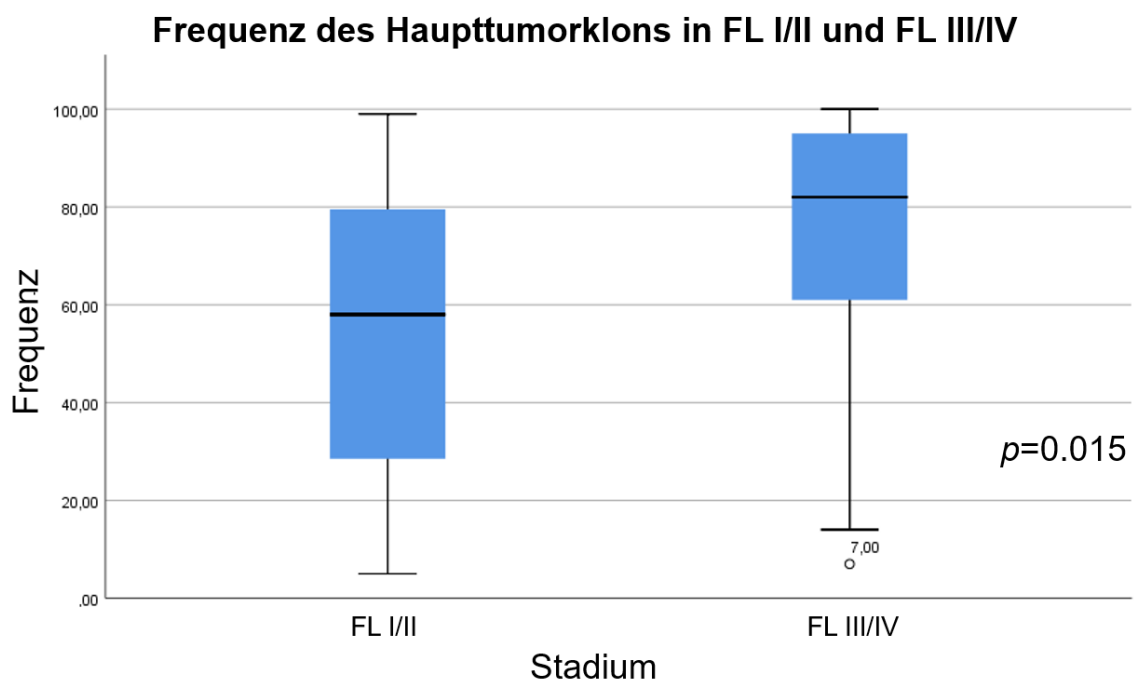


Abbildung 10: Frequenz des Haupttumorklons von PD- und R-FL Stadium I/II und Stadium III/IV: Es zeigte sich ein Unterschied in der mittleren Frequenz des Tumorklons im FL-Gewebe zwischen den Stadien: FL Stadien I/II 51.2% und III/IV 75.4%. PD, Primärdiagnose; R, Rezidiv; I/II, FL im frühen klinischen Stadium; III/IV, FL im fortgeschrittenen klinischen Stadium; Modifiziert nach Leich et al. *Blood Adv* (2021) 5 (23): 4890–4900. © the American Society of Hematology. Eine generelle Erlaubnis von *Blood Advances* liegt vor (siehe Anhang).

Tabelle 7: Übersicht der PD- und R-FL I-IV bezüglich deren mittlere Frequenz des Hauptklons im Tumorgewebe. PD, Primärdiagnose; R, Rezidiv; I/II, FL im frühen klinischen Stadium; III/IV, FL im fortgeschrittenen klinischen Stadium;

FL Kohorte	Mittlere Frequenz des Haupttumorklons % PD-FL	Mittlere Frequenz des Haupttumorklons % R-FL
t(14;18)-positiv FL I/II	56 (6-97)	23.7 (8,9-61)
t(14;18)-negativ FL I/II	52.1 (5-99)	57.2 (29.2-90.6)
FL I/II	54 (5-99)	38.6 (8.9-90.6)
t(14;18)-positiv FL III/IV	62.8 (7-100)	71.5 (16-99,2)
t(14;18)-negativ FL III/IV	81.5 (38-100)	85.9 (79.7;92)
FL III/IV	72.1 (7-100)	74.3 (16-99.2)
t(14;18)-positiv FL I-IV	62.5 (6-100)	55.9 (8.9-99.2)
t(14;18)-negativ FL I-IV	65.1 (5-100)	58.9 (19.5-92)
FL I-IV	62.9 (5-100)	62.9 (8.9-99.2)

Kein Unterschied in der SHM-Frequenz zwischen verschiedenen FL Subgruppen

Die mittlere Rate der SHM im *IGHV* war über die gesamte Kohorte (PD + R-FL) hinweg mit 16.6% in den t(14;18)-positiven FL I/II am höchsten und mit 9.1% in den t(14;18)-negativen FL III/IV am niedrigsten (Tabelle 8). Über alle Stadien hinweg und hinsichtlich des Translokationsstatus unterschied sie sich jedoch nur unwesentlich (Tabelle 8).

Tabelle 8: Übersicht der Rate der SHM in den PD- und R-FL. SHM = somatische Hypermutation; PD, Primärdiagnose; R, Rezidiv; I/II, FL im frühen klinischen Stadium; III/IV, FL im fortgeschrittenen klinischen Stadium; U, unbekanntes FL Stadium;

Kohorte	Mediale Rate der SHM %
t(14;18)-positiv PD-FL I/II	16.6 (8.9-25.2)
t(14;18)-negativ PD-FL I/II	15.2 (3.7-38.3)
t(14;18)-positiv PD-FL III/IV	11.7 (4.6-20.5)
t(14;18)-negativ FL PD- III/IV	9.1 (1.8-19.3)
t(14;18)-positiv R-FL I/II	12.2 (11.2; 13.2)
t(14;18)-negativ R-FL I/II	15.3 (11-24)
t(14;18)-positiv FL R-III/IV	14.2 (8.3-19.2)
t(14;18)-negativ R-FL III/IV	9.5 (7.6-11.4)
t(14;18)-positiv R-FL-U	12.8
t(14;18)-negativ R-FL-U	12 (11.4-12.6)

Anzahl neuer potenzieller N-Glykosylierungsmotive

Über die gesamte Studienkohorte hinweg lag die Anzahl von neu erworbenen N-Glykosylierungsmotiven bei 61.7% (71.4% bei FL I/II (PD+R-FL), 46.2% für FL III/IV (PD+R-FL) und 83.3% für R-FL-U (Tabelle 9).

Ähnliche Häufigkeit neu erworbener N-Glykosylierungsmotive in t(14;18)-positiven und -negativen FL Stadium I/II

PD- und R-FL I/II

In den PD-FL I/II konnte in 68.4% (13/19) der Fälle mindestens ein neu erworbenes N-Glykosylierungsmotiv detektiert werden. In 6 der 13 Fälle (46.2%) waren es sogar zwei neu erworbene N-Glykosylierungsmotive. Der Vergleich zwischen t(14;18)-positiven und -negativen FL zeigte eine ähnliche Anreicherung (66.7% gegenüber 70%) hinsichtlich neue erworbener N-Glykosylierungsmotive. Auch unter Einbezug der R-FL I/II waren im Hinblick auf die Frequenz der neu erworbenen N-Glykosylierungsmotive keine wesentlichen Unterschiede zwischen t(14;18)-positiven und -negativen FL erkennbar (Tabelle 9).

t(14;18)-negativen FL III/IV zeigten signifikant weniger neu erworbene N-Glykosylierungsmotive als t(14;18)-positive FL III/IV

PD-FL und R-FL III/IV

Insgesamt kam es in nur 37.5% (6/16) der PD-FL III/IV zum Zugewinn eines neuen N-Glykosylierungsmotivs. Im Vergleich zwischen t(14;18)-positiven und -negativen FL zeigte sich, dass 50% (4/8) der t(14;18)-positiven FL aber nur 25% (2/8) der t(14;18)-negativen FL neue Motive anreicherten. Dieser Unterschied erwies sich allerdings als nicht signifikant. Pro Aminosäuresequenz und Fall wurde jeweils nur ein neues Motiv detektiert.

Unter Einbezug der R-FL konnte jedoch ein signifikanter Unterschied beim Zugewinn von neuen N-Glykosylierungsmotiven zwischen t(14;18)-positiven und -negativen FL III/IV beobachtet werden. Bei einer Häufigkeit von 62.5% in den t(14;18)-positiven und 20% in den t(14;18)-negativen Fällen ergab sich ein 1-

seiter p -Wert (gerichtete Hypothese) von 0.042 (OR, 6.66, 95% KI, 1.04-42.43) (Tabelle 9).

Tabelle 9: Frequenz von neu hinzugewonnen N-Glykosylierungsmotiven in t(14;18)-positiven und -negativen PD- und R-FL I/II und III/IV. Der Vergleich (p -Wert) zwischen den t(14;18)-positiven und -negativen FL und Stadien I-IV wurde mit dem exakten Test nach Fisher berechnet. I/II, FL im frühen klinischen Stadium; III/IV, FL im fortgeschrittenen klinischen Stadium; n.s., nicht signifikant; Modifiziert nach Leich et al. Blood Adv (2021) 5 (23): 4890–4900. © the American Society of Hematology. Eine generelle Erlaubnis von Blood Advances liegt vor (siehe Anhang).

Klinisches Stadium	t(14;18)-positiv	t(14;18)-negativ	p -Wert
	Anzahl N-Glykosylierungsmotive		
I/II	10/14 (71.4%)	10/14 (71.4%)	n.s.
III/IV	10/16 (62.5%)	2/10 (20%)	0.042
p -Wert	0.71	0.036	

Unterschiedliche Präferenz für die Lokalisation der N-Glykosylierungsmotive in t(14;18)-positiven und negativen FL

Bei Betrachtung der vollständigen Studienkohorte fand die Generierung von neuen potentiellen N-Glykosylierungsmotiven hauptsächlich in den *IGHV* Regionen CDR3 und FR3 statt. So waren 17 von 50 (34%) neu erworbener N-Glykosylierungsmotive in CDR3 und 13 von 50 (26%) in FR3 lokalisiert (Abbildung 11). Die übrigen neu erworbenen N-Glykosylierungsmotive fanden sich in CDR1/FR2 (7/50), FR2/CDR2 (6/50), CDR2 (4/50), CDR1 (1/50), CDR3/FR4 (1/50) und FR4 (1/50) (Abbildung 11). 8 von 17 neu erworbenen Motiven in CDR3 wurden an Codon 107-109 in der hypervariablen CDR3 Region detektiert, wobei sechs davon t(14;18)-positiven Fällen zuzuordnen waren. In der FR3 Region wurden hingegen vier neue N-Glykosylierungsmotive im Codon 66-68, drei in Codon 68-70 und drei in Codon 90-92 erworben. Mit Ausnahme eines neu erworbenen N-Glykosylierungsmotivs fanden sich in t(14;18)-negativen FL alle neu erworbenen Motive in FR3 (Abbildung 11, S5).

Von den sieben neuen Motiven in CDR1/FR2 (Codon 38-40) waren sechs in t(14;18)-positiven FL zu finden (6 von 26, 23%) und nur eines in der Gruppe der t(14;18)-negativen FL (1 von 24, 4%) (nicht signifikant, OR, 6,9, 95% KI, 0,76-

62,28) (Abbildung 11, S5). Ein weiterer „Hotspot“ für neu erworbene N-Glykosylierungsmotive fand sich am Übergang von FR2 zu CDR2 (Codon 55-57). Alle sechs Motive in dieser Region fanden sich in t(14;18)-positiven FL (6 von 26, 23% vs 0 von 24, 0%; $p = 0.02$, OR, 15.53, 95% KI, 0.82-292.63) (Abbildung 11, S5).

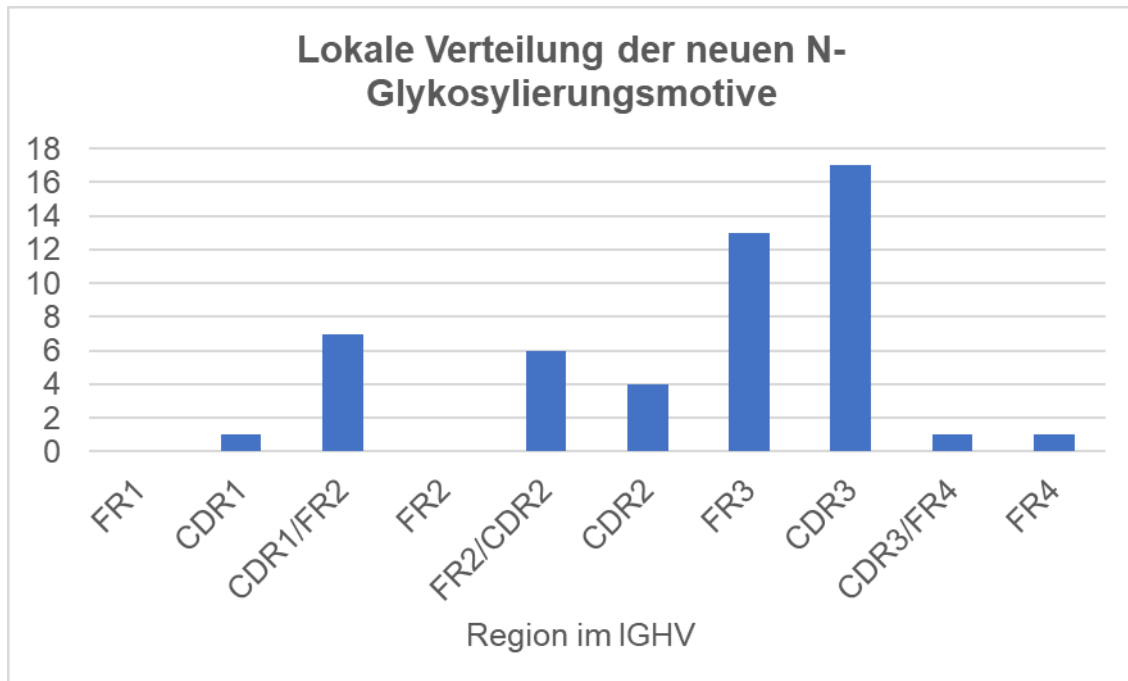


Abbildung 11: Lokale Verteilung der neuen N-Glykosylierungsmotive in der IGHV-Region (x-Achse) mit der jeweiligen Anzahl (y-Achse) der kompletten Studienkohorte (PD+R). CDR, komplementaritäts bestimmende Region; FR, Gerüstregionen („framework region“); IGHV, Immunglobulin schwere Kette; Modifiziert nach Leich et al. *Blood Adv* (2021) 5 (23): 4890–4900. © the American Society of Hematology. Eine generelle Erlaubnis von Blood Advances liegt vor (siehe Anhang).

Anreicherung von neu erworbenen N-Glykosylierungsmotiven in der IGHV-Region FR3 in allen t(14;18)-negativen FL Subgruppen

Betrachtet man nur die PD FL I/II zeigte sich in der Gruppe der t(14;18)-negativen FL ein Zugewinn von sechs neuen N-Glykosylierungsmotiven in FR3 (Abbildung 12). Zwei weitere Motive wurden in CDR3 zugewonnen und je ein Motiv in CDR2 sowie CDR1/FR2 (Abbildung 12). Im Vergleich dazu konnte man bei den t(14;18)-positiven Fällen sieben neue Motive in CDR3 zählen, zwei in CDR1/FR2 und je ein neues N-Glykosylierungsmotiv in FR2/CDR2, CDR2 und CDR3/FR4 (Abbildung 12).

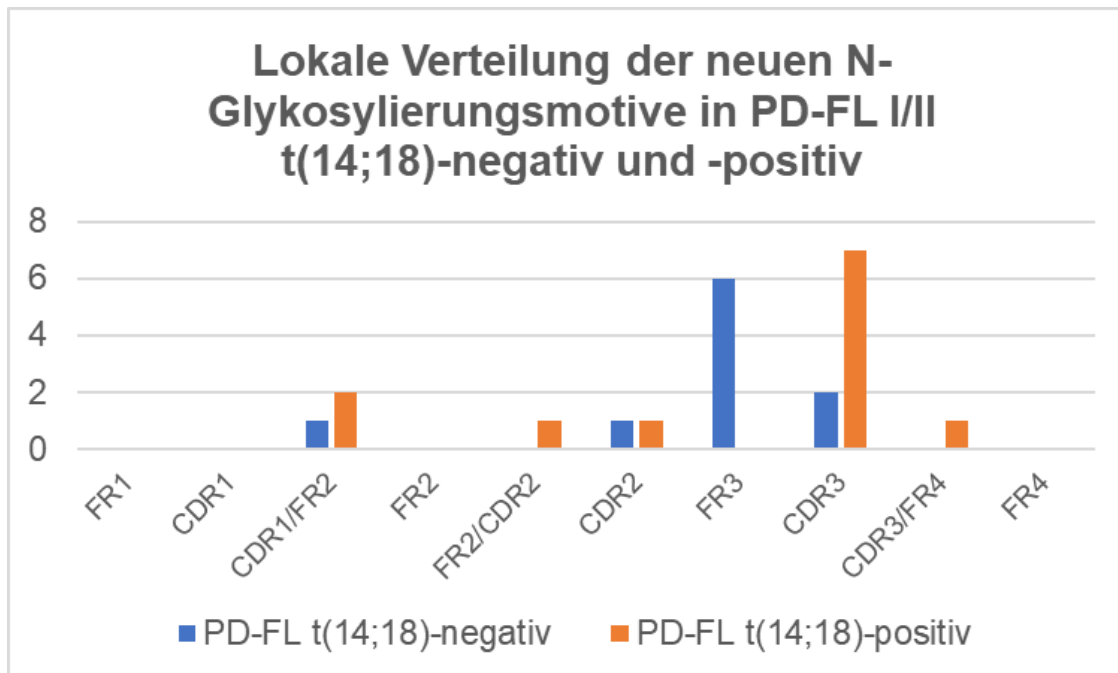


Abbildung 12: Lokale Verteilung der neuen N-Glykosylierungsmotive in der IGHV-Region (x-Achse) mit der jeweiligen Anzahl (y-Achse) der PD-FL I/II t(14;18)-negativ und -positiv. CDR, komplementaritäts bestimmende Region; FR, Gerüstregionen („framework region“); IGHV, Immunglobulin schwere Kette; I/II, FL im frühen klinischen Stadium; PD, Primärdiagnose; Modifiziert nach Leich et al. *Blood Adv* (2021) 5 (23): 4890–4900. © the American Society of Hematology. Eine generelle Erlaubnis von Blood Advances liegt vor (siehe Anhang).

In t(14;18)-negativen FL III/IV wurden ebenfalls zwei neue N-Glykosylierungsmotive in der FR3 Region zugewonnen, während die t(14;18)-positiven FL insgesamt vier neue Motive zeigten und zwar jeweils eins in CDR1/FR2, FR2/CDR2, FR3 und CDR3. (Abbildung 13).

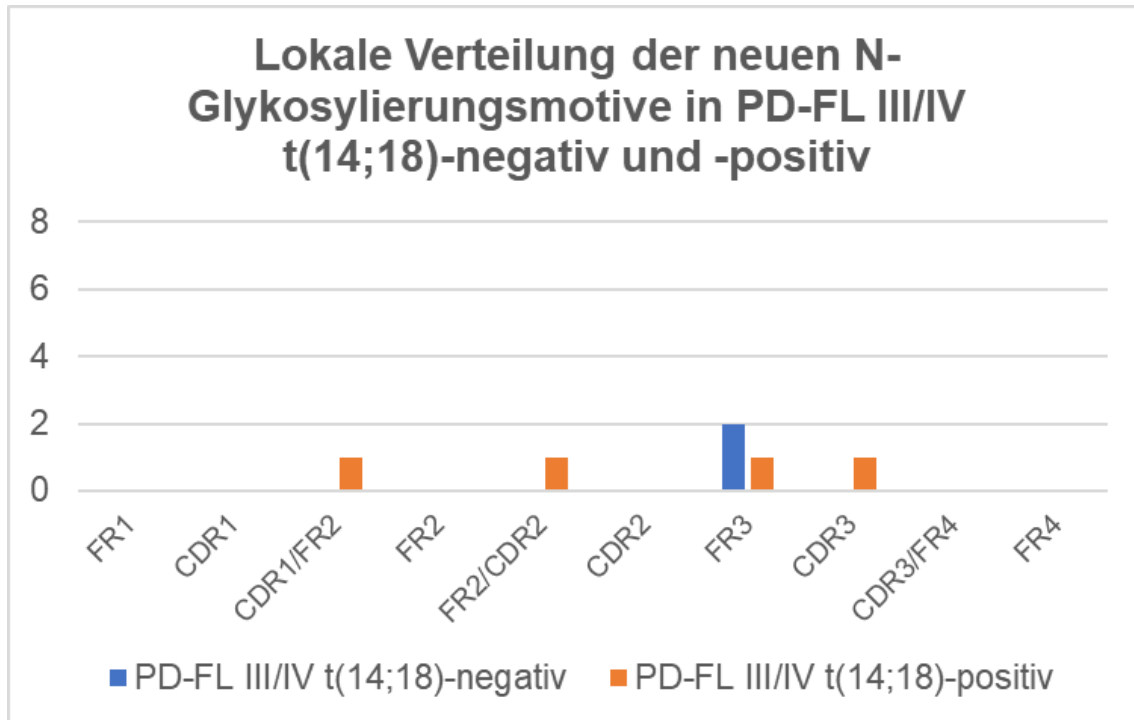


Abbildung 13: Lokale Verteilung der neuen N-Glykosylierungsmotive in der IGHV-Region (x-Achse) mit der jeweiligen Anzahl (y-Achse) der PD-FL III/IV t(14;18)-negativ und -positiv. CDR, komplementaritäts bestimmende Region; FR, Gerüstregionen („framework region“); IGHV, Immunglobulin schwere Kette; III/IV, FL im fortgeschrittenen klinischen Stadium; PD, Primärdiagnose; Modifiziert nach Leich et al. *Blood Adv* (2021) 5 (23): 4890–4900. © the American Society of Hematology. Eine generelle Erlaubnis von Blood Advances liegt vor (siehe Anhang).

Die t(14;18)-negativen R-FL I-IV wiesen die meisten neuen N-Glykosylierungsmotive auf, nämlich vier neue Motive in FR3 und CDR3, zwei Motive in CDR2 und letztlich je ein Motiv in CDR1 und FR4 (Abbildung 14). Im Gegensatz zu den t(14;18)-negativen R-FL waren bei den t(14;18)-positiven R-FL vier neue N-Glykosylierungsmotive in FR2/CDR2 und je drei neue Motive in CDR1/FR2 und CDR3 nachweisbar (Abbildung 14).

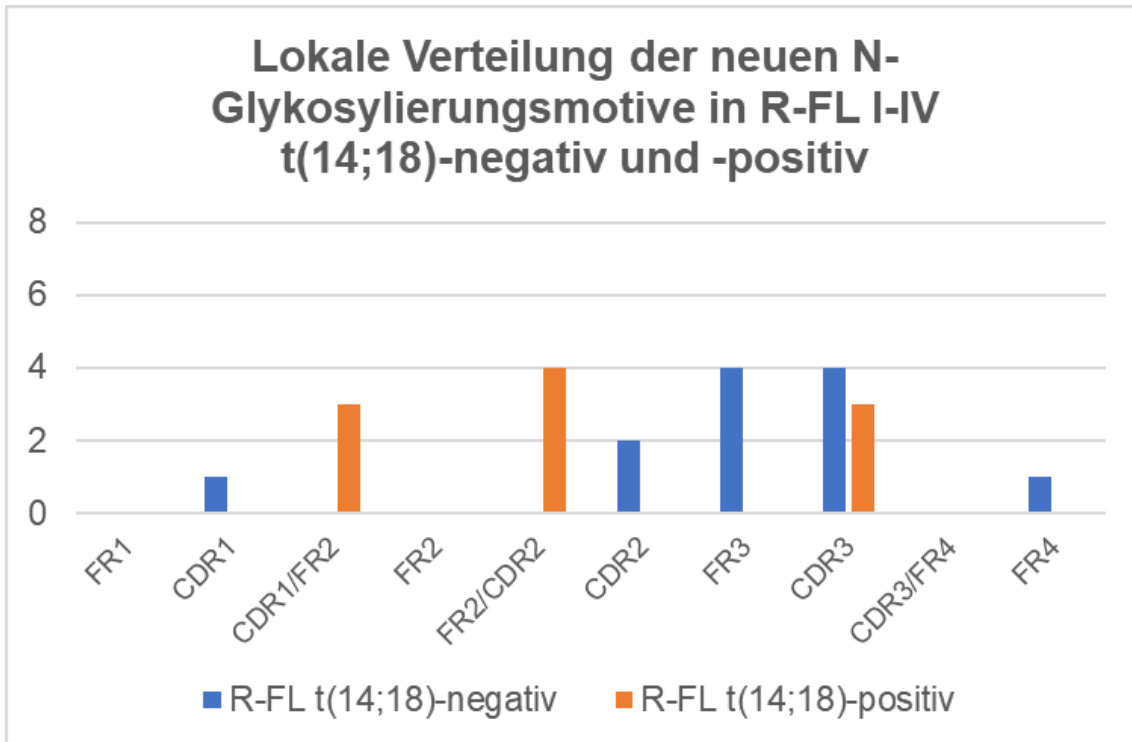


Abbildung 14: Lokale Verteilung der neuen N-Glykosylierungsmotive in der IGHV-Region (x-Achse) mit der jeweiligen Anzahl (y-Achse) der R-FL I-IV t(14;18)-negativ und -positiv. CDR, komplementaritäts bestimmende Region; FR, Gerüstregionen („framework region“); IGHV, Immunglobulin schwere Kette; R, Rezidiv; Modifiziert nach Leich et al. *Blood Adv* (2021) 5 (23): 4890–4900. © the American Society of Hematology. Eine generelle Erlaubnis von *Blood Advances* liegt vor (siehe Anhang).

Daraus ergab sich unter Einbezug der PD- und R-FL im Vergleich mit t(14;18)-positiven PD/R FL I-IV ein signifikanter Zugewinn von neuen potentiellen N-Glykosylierungsmotiven in FR3 in den t(14;18)-negativen FL I-IV (12/24 vs 1/26, $p < 0.001$, OR, 0.04, 95% KI, 0.0046-0.34). Im Gegensatz hierzu konnte in t(14;18)-positiven FL in allen anderen Regionen eine höhere Frequenz von neu erworbenen N-Glykosylierungsmotiven beobachtet werden (CDR1/FR2 Region (1/24 (4%) vs 6/26 (23%), n.s.), FR2/CDR2 Region (0/24 (0%) vs 6/26 (23%), $p = 0.02$), CDR3 Region (6/24 (25%) vs 11/26 (42%), $p = 0.2$) (Abbildung 15).

Der hohe CDR3-Peak in t(14;18)-positiven FL I/IV war maßgeblich auf die starke Anreicherung der Kohorte mit FL I/II zurückzuführen (Abbildung 12, 15).

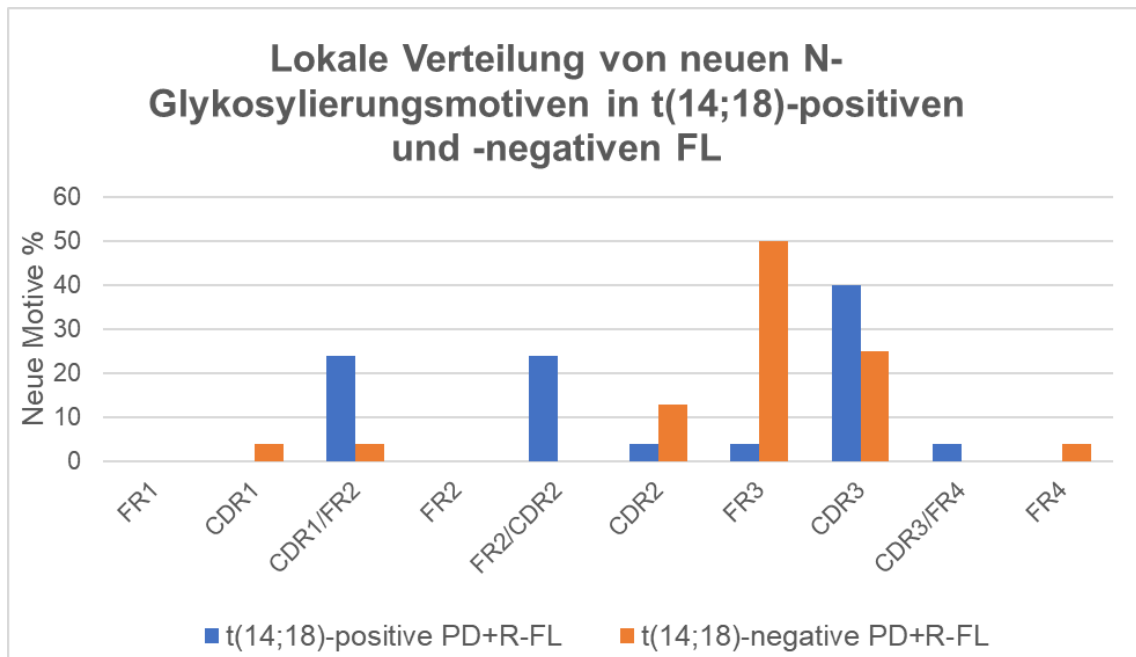


Abbildung 15: Lokale Verteilung der N-Glykosylierungsmotive in der IGHV-Region mit der prozentualen Anzahl (y-Achse) der t(14;18)-positiven FL (PD+R) im Vergleich zu den t(14;18)-negativen FL (PD+R). CDR, komplementaritäts bestimmende Region; FR, Gerüstregionen („framework region“); IGHV, Immunglobulin schwere Kette; PD, Primärdiagnose; R, Rezidiv; Modifiziert nach Leich et al. Blood Adv (2021) 5 (23): 4890–4900. © the American Society of Hematology. Eine generelle Erlaubnis von Blood Advances liegt vor (siehe Anhang).

Vermehrte Anreicherung von neuen Motiven in CDR3 in t(14;18)-positiven PD-FL I/II

In der Subgruppe der t(14;18)-positiven FL I/II (PD+R-FL) wurden 7 der 13 neu erworbenen N-Glykosylierungsmotive in der CDR3 Region des IGHV Gens zugewonnen, während es bei t(14;18)-negativen FL I/II (PD+R-FL) nur in 3 von 16 Fällen zu einem neuen Zugewinn in CDR3 kam (7/13 (53.8%) vs 3/16 (18.8%), $p=0.056$ (1-seitig), 0.064 (2-seitig)). (Abbildung 12).

Lokalisation neuer potentieller N-Glykosylierungsmotive in t(14;18)-positiven R-FL I-IV

Die t(14;18)-positiven R-FL gewannen drei neue N-Glykosylierungsmotive in der Region CDR1/FR2 (Stadium I/II: 1, Stadium III/IV: 1, unbekanntes Stadium: 1), vier in der Region FR2/CDR2 (Stadium I/II: 0, Stadium III/IV: 3, unbekanntes Stadium: 1) und sechs in der Region CDR3 (Stadium I/II: 3, Stadium III/IV: 3, unbekanntes Stadium: 0) hinzu (Abbildung 16). Somit fanden sich 30.8% der N-

Glykosylierungsmotive in der Region FR2/CDR2, 23.1% in den Regionen CDR1/FR2 und die Mehrheit von 46.2% an Motiven in CDR3 (Abbildung 16). Im Vergleich hierzu (s.o.) konnte man bei t(14;18)-negativen FL vier neue Motive in FR3 und CDR3, zwei in CDR2 und jeweils ein neues Motiv in CDR1 und FR4 detektieren (Abbildung 14, S4).

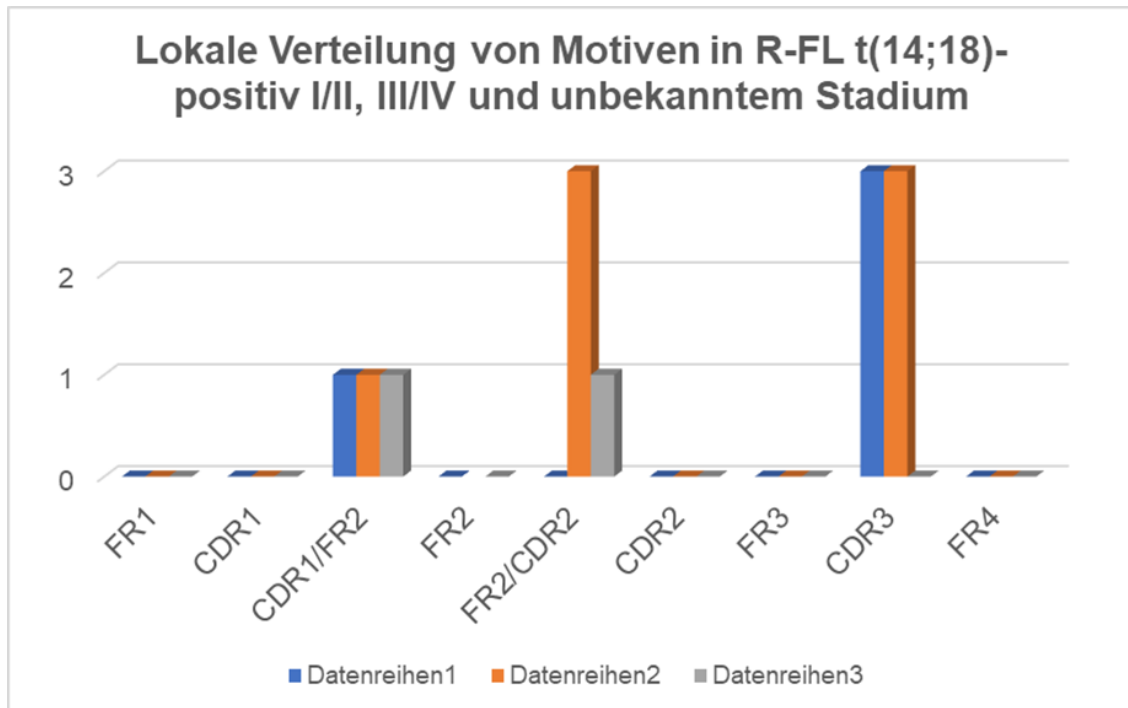


Abbildung 16: Lokale Verteilung im IGHV (x-Achse) und Anzahl (y-Achse) von neuen potentiellen N-Glykosylierungsmotiven in R-FL t(14;18)-positiv, Datenreihen 1: Stadium I/II, Datenreihen 2: Stadium III/IV, Datenreihen 3: unbekanntes Stadium. I/II, FL im frühen klinischen Stadium; III/IV, FL im fortgeschrittenen klinischen Stadium; CDR, komplementaritäts bestimmende Region; FR, Gerüstregionen („framework region“); IGHV, Immunglobulin schwere Kette; R, Rezidiv; Modifiziert nach Leich et al. *Blood Adv* (2021) 5 (23): 4890–4900. © the American Society of Hematology. Eine generelle Erlaubnis von Blood Advances liegt vor (siehe Anhang).

Anreicherung der in CDR3 lokalisierten N-Glykosylierungsmotive an den V,D,J-Verbindungsstellen

Fast alle neu erworbenen N-Glykosylierungsmotive in der CDR3 Region (16/17 (94,1%)) fanden sich komplett oder anteilig an der Verbindungsstelle zwischen V- und D-Segmenten oder an der Verbindungsstelle zwischen D- und J-Segmenten des *IGHV* Gens (zur Erklärung siehe Abbildung 6 und Tabelle 10).

Tabelle 10: Übersicht der Motive in der CDR3-Region des IGHV an den V,D,J-Verbindungsstellen: Fast alle neuen Motive reichern sich am Übergang der Gensegmente des IGHV Gens an, insbesondere am Übergang vom V- zum D-Segment sowie vom D- zum J-Segment.*

FL Fall	V Region	V-D Verbindung	D Region	D-J Verbindung	J Region
FL 3		N	IT		
FL 4				NYS	
FL 7		NT	T		
FL 2		N	SS		
FL 15		NIS			
FL 14		NN	S		
FL 13		N	YS		
FL 27	N	AS			
FL 25		NCT			
FL 43			NF	T	
FL 94			N	RS	
FL 103		N	IT		
FL 107		N	IS		
FL 112			NNT		
FL 118		N	IT		
FL 131		NM	T		
FL 136			N	IS	

* V,D,J-Verbindungsstellen befinden sich zwischen den Gensegmenten VH, DH und JH der IGHV-Region. CDR3 als hypervariabelste Region beinhaltet alle 3 Verbindungsstellen (siehe Abbildung 2).

Häufigkeit der Gennutzung von *IGHV4-34*

IGHV4-34 Nutzung trat ausschließlich in PD-FL auf

In der Kohorte der R-FL wurde das Gen *IGHV4-34* in keinem der 25 klonalen Fälle genutzt (Abbildung 17). In den PD-FL hingegen nutzten 8 von 35 Fällen *IGHV4-34* (Abbildung 17). Daraus ergab sich statistisch signifikant eine vermehrte Nutzung dieses Gens in der Kohorte der PD-FL ($p=0.016$, OR, 15.76, 95% KI, 0.86-287.25).

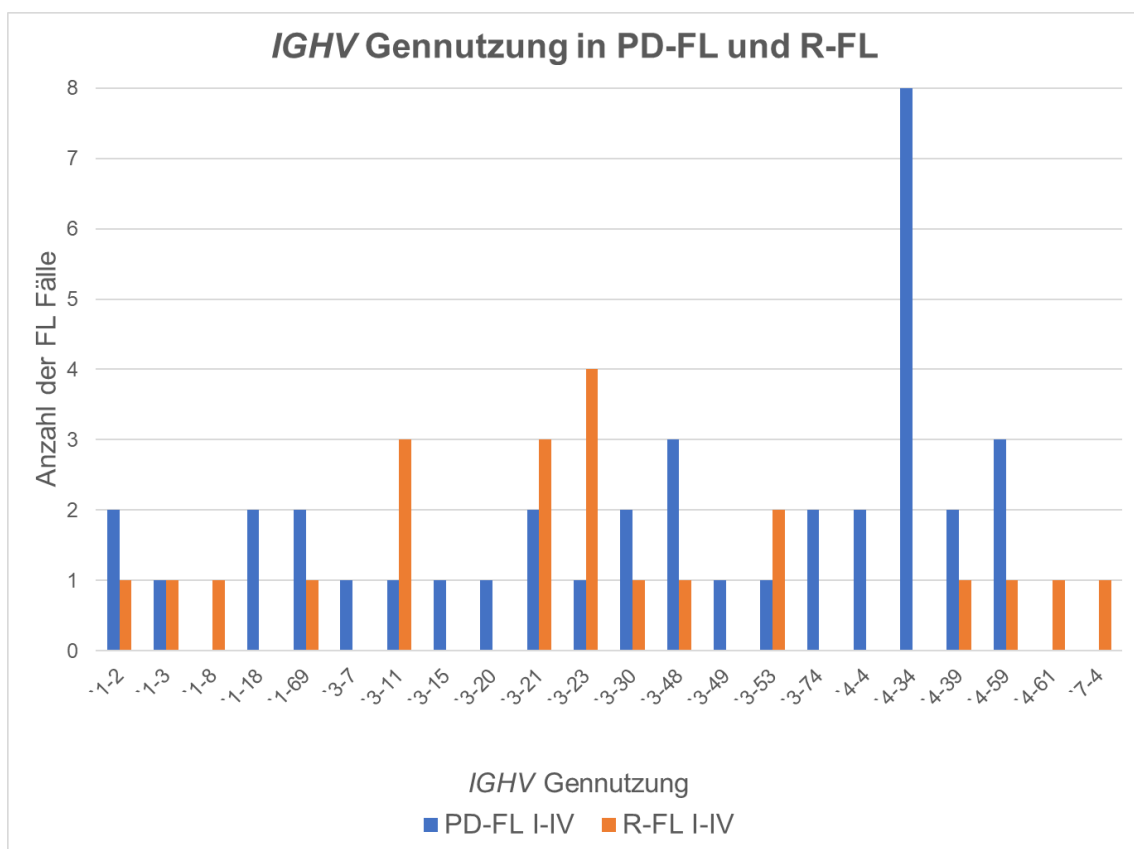


Abbildung 17: *IGHV* Gennutzung (y-Achse) sowie deren Häufigkeit (x-Achse) im Vergleich PD-FL I-IV (blau) und R-FL I-IV (gelb). *IGHV*, Immunglobulin schwere Kette; PD, Primärdiagnose; R, Rezidiv; Modifiziert nach Leich et al. *Blood Adv* (2021) 5 (23): 4890–4900. © the American Society of Hematology. Eine generelle Erlaubnis von Blood Advances liegt vor (siehe Anhang).

IGHV4-34 signifikant häufiger in t(14;18)-negativen PD-FL als in t(14;18)-positiven PD-FL

In der Kohorte der t(14;18)-positiven PD-FL wurden insgesamt 13 und in der Kohorte der t(14;18)-negativen PD FL zehn verschiedene *IGHV*-Gene genutzt (Abbildung 18). Dabei war *IGHV4-34* das mit Abstand am häufigsten genutzte Gen der t(14;18)-negativen PD-FL (6/18 vs 2/17, ($p = 0.23$, OR, 3.75, 95% KI, 0.63-22.04)) (Abbildung 18). Bei den t(14;18)-positiven PD-FL wurde das gleiche *IGHV* Gen maximal zwei Mal genutzt (Abbildung 18). Betrachtete man ausschließlich die Fälle mit neu erworbenen N-Glykosylierungsmotiven wiesen 55.6% (5/9) der t(14;18)-negativen FL das *IGHV4-34* Gen auf, während es in t(14;18)-positiven FL vollständig fehlte (0% (0/10)) ($p=0.01$, OR, 25.66, 95% KI, 1.15-568.94) (Tabelle 11).

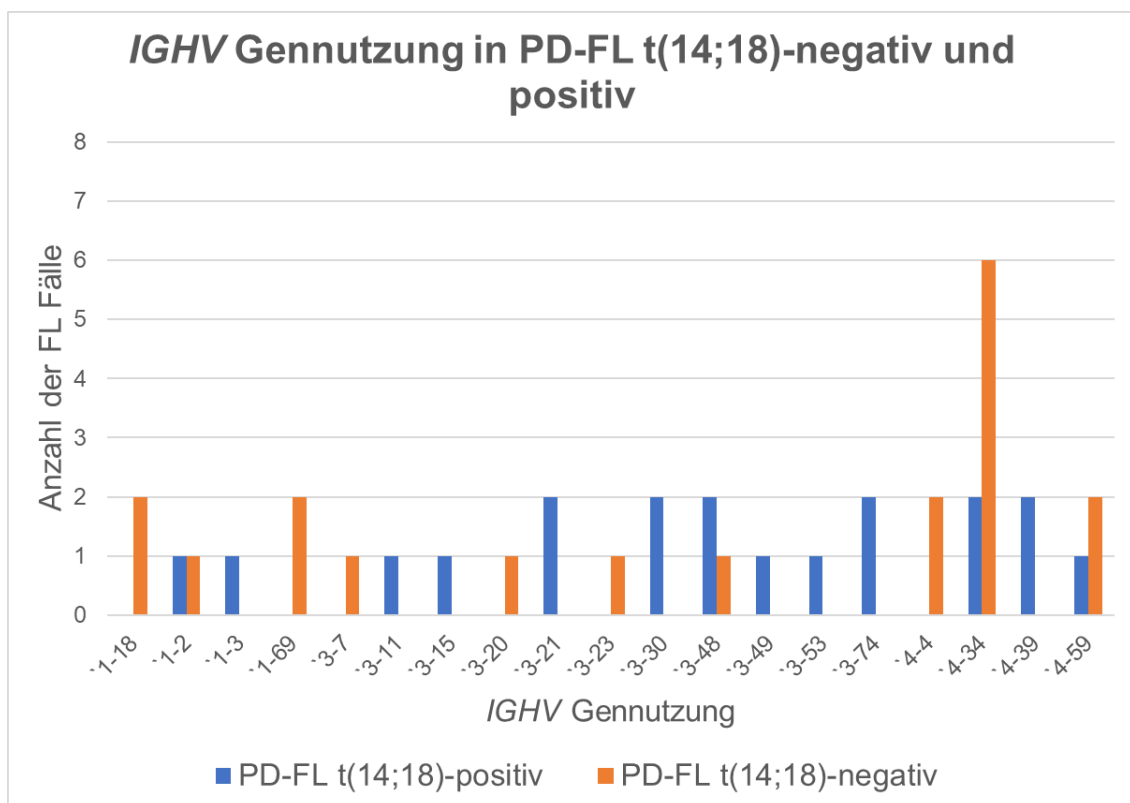


Abbildung 18: *IGHV* Gennutzung (y-Achse) sowie deren Häufigkeit (x-Achse). Im Vergleich PD-FL t(14;18)-positiv (blau) und -negativ (orange). *IGHV*, Immunglobulin schwere Kette; PD, Primärdiagnose; Modifiziert nach Leich et al. Blood Adv (2021) 5 (23): 4890–4900. © the American Society of Hematology. Eine generelle Erlaubnis von Blood Advances liegt vor (siehe Anhang).

Verlust des natürlichen N-Glykosylierungsmotivs korreliert mit SHM

Die Keimbahnsequenz von *IGHV4-34* besitzt bereits ein natürliches N-Glykosylierungsmotiv in CDR2 (Codon 52-54) (Abbildung S5). Die mittlere SHM der vier Fälle, die das natürliche Motiv in *IGHV4-34* bewahrten, betrug nur 6%, während in den vier FL Fällen, die das natürliche Motiv mutationsbedingt verloren haben, eine mittlere SHM von 12.6% ermittelt wurde (Tabelle 11). Dieser Unterschied war mit $p=0.029$ statistisch signifikant. Insgesamt verloren also 50% der Fälle das natürliche Motiv NHS in CDR2 (Tabelle 11).

Tabelle 11: Übersicht der Gennutzung von IGHV4-34 in Zusammenhang mit dem potentiellen Verlust des natürlichen Motivs sowie der Generierung neuer Motive. Dabei wurden nur Fälle aufgeführt, welche ein neues Motiv dazu gewonnen haben oder Fälle mit der IGVH Sequenz `4-34`. SHM, somatische Hypermutation; VH, variable Region der schweren Kette, I/II, FL im frühen klinischen Stadium; III/IV, FL im fortgeschrittenen klinischen Stadium; Modifiziert nach Leich et al. Blood Adv (2021) 5 (23): 4890–4900. © the American Society of Hematology. Eine generelle Erlaubnis von Blood Advances liegt vor (siehe Anhang).

Nr	Stadium	SHM (%)	Klonale Frequenz (%)	VH-Nutzung	Neue Motive	Natürliches Motiv	Verlust natürliches Motiv
t(14;18)-negativ							
18	I/II	6.95	74	`4-59	1	Nein	nein
25	I/II	7.91	12	`4-34	1	Ja	nein
26	I/II	8.64	99	`4-34	2	Nein	ja
27	I/II	22.83	73	`3-23	1	Nein	nein
28	I/II	38.3	21	`1-69	2	Nein	nein
29	I/II	13.99	92	`4-34	1	Nein	ja
30	I/II	27.67	18	`1-69	2	Nein	nein
37	III/IV	7.73	38	`4-34	0	Ja	nein
38	III/IV	15.45	97	`4-34	1	Nein	ja
39	III/IV	3.64	95	`4-34	1	Ja	nein
t(14;18)-positiv							
1	I/II	21.76	65	`3-53	1	Nein	nein
2	I/II	19.3	69	`3-21	2	Nein	nein
3	I/II	21.46	55	`3-74	1	Nein	nein
4	I/II	12.39	28	`4-39	1	Nein	nein
7	I/II	12.79	97	`3-48	2	Nein	nein
9	I/II	15	67	`4-59	2	Nein	nein
43	III/IV	17.89	22	`1-2	1	Nein	nein
52	III/IV	7.76	80	`3-48	1	Nein	nein
58	III/IV	9.13	100	`3-30	1	Nein	nein
59	III/IV	7.76	98	`3-11	1	Nein	nein
68	III/IV	4.55	14	`4-34	0	Ja	nein
72	III/IV	12.27	91	`4-34	0	Nein	ja

Die Verwendung des Aminosäuremotiv NLS beschränkt sich auf t(14;18)-negative FL

Insgesamt wurde in 21 FL ein neu erworbenes N-Glykosylierungsmotiv detektiert. In 8/21 (21.6%) der FL war das N-Glykosylierungsmotiv NIS vertreten. Weitere häufige Motive stellten NLS (n=4), NMT (n=4), NIT(n=4) und NYT (n=4) dar (Tabelle 12,13). Das Motiv NLS wurde ausschließlich in der Gruppe der t(14;18)-negativen FL detektiert (Tabelle 12).

Tabelle 12: Frequenz und Zusammensetzung der Aminosäuresequenz der N-Glykosylierungsmotive in t(14;18)-negativen PD/R-FL I-IV.

Motiv	NLS	NIS	NNT	NYT	NST	NSS	NMT	NCT	NWT
Frequenz	4	3	2	2	2	2	1	1	1
Motiv	NQS	NAS	NLT	NGT	NRS	NIT			
Frequenz	1	1	1	1	1	1			

Tabelle 13: Frequenz und Zusammensetzung der Aminosäuresequenz der N-Glykosylierungsmotive in t(14;18)-positiven PD/R-FL I-IV

Motiv	NIS	NMT	NIT	NMS	NYS	NYT	NLT	NTS	NSS	NWS
Frequenz	5	3	3	3	2	2	1	1	1	1
Motiv	NNS	NGS	NTT	NFT						
Frequenz	1	1	1	1						

Entstehung der neu erworbenen N-Glykosylierungsmotive

Generierung neu erworbener N-Glykosylierungsmotive hauptsächlich durch Mutation der AS an Position 1 zu Asparagin in der Gesamtkohorte

In Bezug auf die ganze FL Kohorte entstanden die neu erworbenen N-Glykosylierungsmotive zu 63.3% durch einen essentiellen Austausch zur AS Asn (N) an Position eins des Motivs (Tabelle 14,15). Weitere 16.7% der Motive wurden durch einen Austausch essenzieller Aminosäure an Position eins ($X \rightarrow N$) und an Position drei ($X \rightarrow S$ oder T) und 10% durch einen essenziellen Austausch der AS nur an Position drei generiert (Tabelle 14,15). In 23.3% aller Motive fand ein zusätzlicher, nicht essenzieller Austausch der AS an Position zwei statt – dabei war kein wesentlicher Unterschied bezüglich des t(14;18)-Status ersichtlich (Tabelle 14,15).

T(14;18)-positive FL erwarben neue N-Glykosylierungsmotive signifikant häufiger durch Mutation an Position 1 als t(14;18)-negative FL

Die Aminosäure Asparagin (Asn/N), welche die erste Aminosäure des Motivs darstellt, wurde in allen t(14;18)-positiven Fällen (24/24 (100%)) durch Mutationen generiert. Dabei lag in 11 von 13 Fällen (84,6%) in der Keimbahn die Aminosäure Tyrosin (Y) zu Grunde (Basentriplett: TAC) (Tabelle 14). In allen Fällen mutierte die Base Thymin (T) zu Adenin (A), so dass aus dem Codon TAC (Tyrosin) das Codon AAC (Asparagin) entstand. Zusätzlich fand in 4 von 11 Fällen ein nicht essenzieller Austausch der Base Cytosin (C) an Position drei durch ein Thymin (T) statt (Tabelle 14).

Das Asn (N) in den neu erworbenen N-Glykosylierungsmotiven, die in den t(14;18)-negativen FL detektiert wurden, war hingegen zu 35.3% (8/23) bereits in der Keimbahnsequenz vorhanden und entstand somit nur zu 64.7% durch den Austausch von Nukleotiden ($p=0.02$, OR, 89.3, 95% KI, 4.8081-1660,5223). Das Asn (N) generierte sich dabei aus keiner spezifischen Aminosäure bzw. spezifischem Basentriplett (Tabelle 15).

Somit erwarben t(14;18)-positive FL signifikant häufiger neue N-Glykosylierungsmotive durch Mutation der Keimbahnsequenz zur Aminosäure Asparagin (N) an Position eins als t(14;18)-negative FL ($p=0.024$). Im Gegensatz zu Asn (N) entstand das Ser (S) an Position drei in beiden Subgruppen nur in 26.7% durch Mutation. Zu 73.7% lag es in beiden Subgruppen bereits in der Keimbahn vor (Tabelle 14,15).

Signifikant häufigere Mutation von Serin zu Threonin in t(14;18)-positiven FL

Das Threonin (Thr/T) an Position drei entstand in der Kohorte der t(14;18)-positiven FL zu 85.7% (6 von 7 Fällen) durch Mutationen aus in der Keimbahnsequenz zu Grunde liegendem Serin (Ser/S) (Tabelle 14). Im Gegensatz dazu mutierte in der Gruppe der t(14;18)-negativen FL das Thr nur in zwei Fällen ($2/8 = 25\%$) aus Ser ($p=0,04$) (Tabelle 15). Wiederum einmalig ereignete sich in dieser Subgruppe sogar der umgekehrte Austausch von Thr zu Ser (Tabelle 15). Somit konnte in den t(14;18)-positiven FL signifikant häufiger eine Mutation von Ser zu Thr an Position drei des N-Glykosylierungsmotivs beobachtet werden ($p=0.041$).

Tabelle 14: Darstellung der N-Glykosylierungsmotive in der AS-Sequenz in der jeweiligen IGHV-Region mit gelber Hervorhebung der mutierten Aminosäuren bzw. der zu Grunde liegenden mutierten Nukleotidsequenz in t(14;18)-negativen FL nach IMGT Datenbank (http://www.imgt.org/IMGT_vquest/vquest). PD, Primärdiagnose; R, Rezidiv; I/II, FL im frühen klinischen Stadium, III/IV, FL, im fortgeschrittenen klinischen Stadium; AS, Aminosäure; n.a., nicht angegeben;

FL Nr.	Status	Klinisches Stadium	AS-Motiv FL/ Keimbahn	Region	Nukleotidsequenz	
26	PD	I/II	NWT/ YWS	CDR1/FR2	AAC→N TAC→Y	ACC→T AGC→S
			NQS/ NPS	FR3	CAG→Q CCG→P	
29	PD	I/II	NLS/ NPS	FR3	CTG→L CCG→P	
18	PD	I/II	NSS/ NPS	FR3	TCC→S CCC→P	
28	PD	I/II	NIS/ DKS	FR3	AAT→N GAC→D	
			NLT/ SLR	FR3	AAT→N AGC→S	ACG→T AGA→R
30	PD	I/II	NST/ GTA	CDR2	AAT→N GGT→G	ACG→T GCA→A
			NLS/ ELS	FR3	AAT→N GAG→E	
38	PD	III/IV	NYT/ NYN	FR3	ACC→T AAC→N	
39	PD	III/IV	NLS/ KLS	FR3	AAC→N AAG→K	
93	R	I/II	NNT/ SNK	CDR2	AAC→N AGT→S	ACA→T AAA→K
94	R	I/II	NLS/ TFT	CDR1	AAT→N ACC→T	AGC→S ACC→T
			NIS/ NYA	FR3	TCA→S GCA→A	
			NNT/ IST	FR3	AAT→N ATC→I	
96	R	I/II	NYT/ NYA	FR3	ACA→T GCA→A	
136	R	n.a.	NSS/ SSS	CDR2	AAT→N AGT→S	
128	R	n.a.	NLT/ KLS	FR3	AAT→N AAG→K	ACC→T AGC→S

Tabelle 15: Darstellung der N-Glykosylierungsmotive in der AS-Sequenz in der jeweiligenIGHV-Region mit gelber Hervorhebung der mutierten Aminosäuren bzw. der zu Grunde liegenden mutierten Nukleotidsequenz in t(14;18)-positiven FL nach IMGT Datenbank (http://www.imgt.org/IMGT_vquest/vquest). PD, Primärdiagnose; R, Rezidiv; I/II, FL im frühen klinischen Stadium, III/IV, FL, im fortgeschrittenen klinischen Stadium; AS, Aminosäure; n.a., nicht angegeben;

FL Nr.	Status	Klinisches Stadium	AS-Motiv FL/ Keimbahn	Region	Nukleotidsequenz FL Fall Keimbahn	
7	PD	I/II	NIS/ YIS	FR2/CDR2	AAC→N TAC→Y	
9	PD	I/II	NYT/ YWS	CDR1/FR2	AAC→N TAC→Y	ACC→T AGC→S
1	PD	I/II	NMT/ YMS	CDR1/FR2	AAC→N TAC→Y	ACT→T AGC→S
52	PD	III/IV	NMS/ YIS	FR2/CDR2	AAT→N TAC→Y	
58	PD	III/IV	NMS/ GMH	CDR1/FR2	AAC→N GGC→G	TCC→S CAC→H
59	PD	III/IV	NYT/ YYA	FR3	AAC→N TAC→Y	ACA→T GCA→A
111	R	I/II	NMS/ YMS	CDR1/FR2	AAC→N TAC→Y	
99	R	III/IV	NLT/ YIS	FR2/CDR2	AAT→N TAC→Y	ACT→T AGT→S
101	R	III/IV	NIS/ AIS	FR2/CDR2	AAT→N GCT→A	
108	R	III/IV	NIS/ YIS	FR2/CDR2	AAT→N TAC→Y	
103	R	III/IV	NMT/ YMS	CDR1/FR2	AAC→N TAC→Y	ACG→T AGC→S
113	R	n.a.	NMT/ YMS	CDR1/FR2	AAT→N TAC→Y	ACG→T AGC→S
113	R	n.a.	NIT/ YIS	FR2/CDR2	AAC→N TAC→Y	ACT→T AGT→S

Berechnung des progressionsfreien Überlebens in FL Subgruppen

Kein Geschlechtsspezifischer Unterschied im progressionsfreien Überleben

Zu 35 Patienten (16 weiblich, 19 männlich) aus dem aktuellen Datensatz lagen klinische Daten vor.

8 von 16 weiblichen und 9 der 19 männlichen Patienten waren im Krankheitsverlauf progredient. Hinsichtlich der Dauer des progressionsfreien Überlebens ergab sich in unserem Datensatz kein Unterschied hinsichtlich des Geschlechts ($p=0.769$) (Abbildung 19).

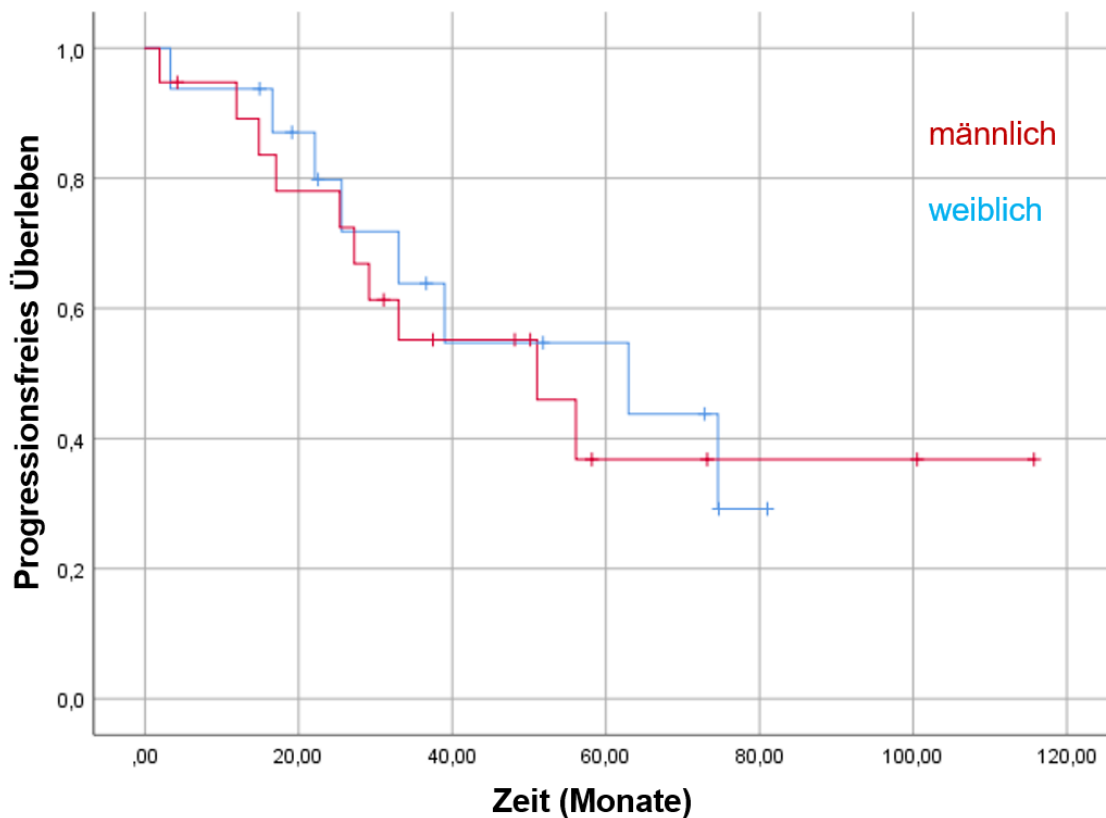


Abbildung 19: Kaplan Meier Kurve zur Darstellung des progressionsfreien Überlebens (y-Achse) in Monaten (x-Achse) bei weiblichen (blau) und männlichen (rot) FL Patienten.

Kein Unterschied im progressionsfreien Überleben zwischen t(14;18)-positiven und -negativen FL

Unterteilte man die 35 Patienten anhand ihrer Translokation, zeigten 11 der 23 t(14;18)-positiven und 7 der insgesamt 12 t(14;18)-negativen FL Patienten einen Tumorprogress (Tabelle S1).

Hinsichtlich der Dauer des progressionsfreien Überlebens zeigte sich jedoch auch zwischen diesen Gruppen kein wesentlicher Unterschied ($p=0.801$) (Abbildung 20).

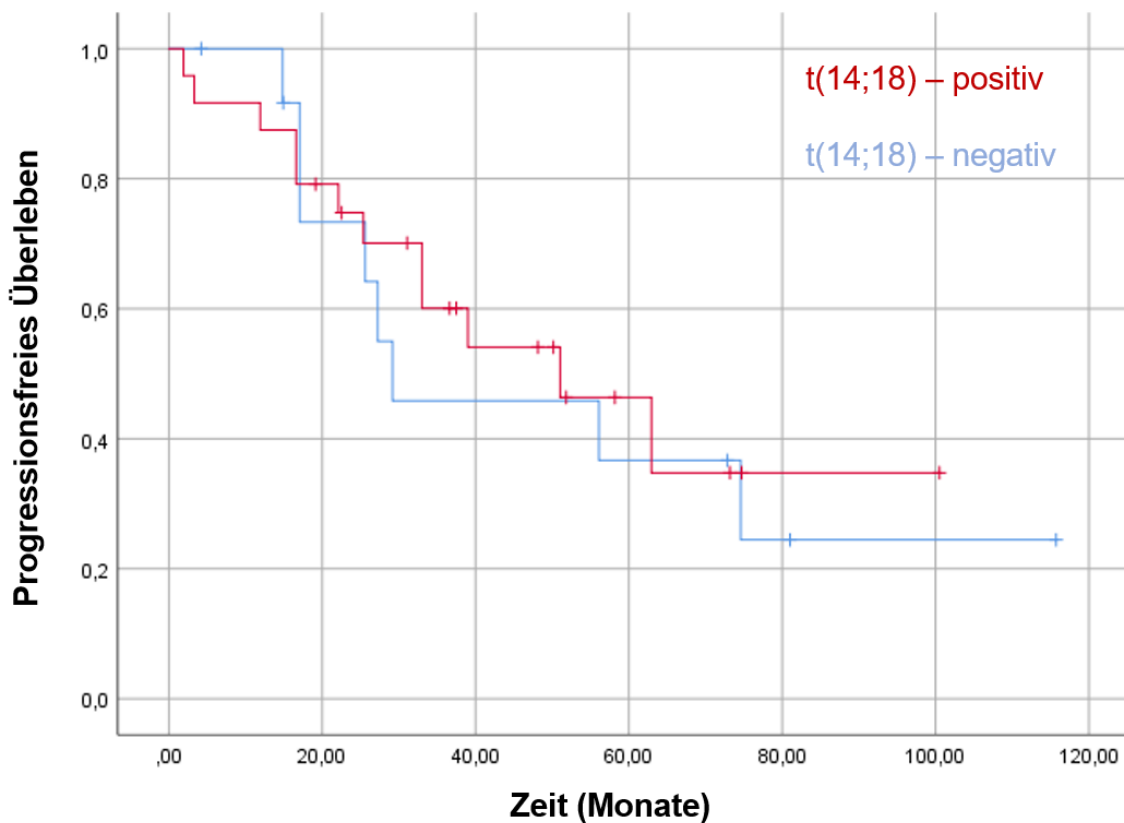


Abbildung 20: Kaplan Meier Kurve zur Darstellung des progressionsfreien Überlebens (y-Achse) in Monaten (x-Achse) in t(14;18)-positiven (rot) und -negativen (blau) FLI-IV.

Frühere Progression bei Fällen ohne neues potentielles N-Glykosylierungsmotiv

Im Hinblick auf den Zugewinn mindestens eines neu erworbenen N-Glykosylierungsmotivs zeigte sich jedoch ein nennenswerter Unterschied im progressionsfreien Überleben. So zeigten die 15 FL-Patienten ohne neues N-Glykosylierungsmotiv eine starke Tendenz zu einer früheren Progression als die 20 Patienten mit neu erworbenem N-Glykosylierungsmotiv ($p=0.213$) (Abbildung 21).

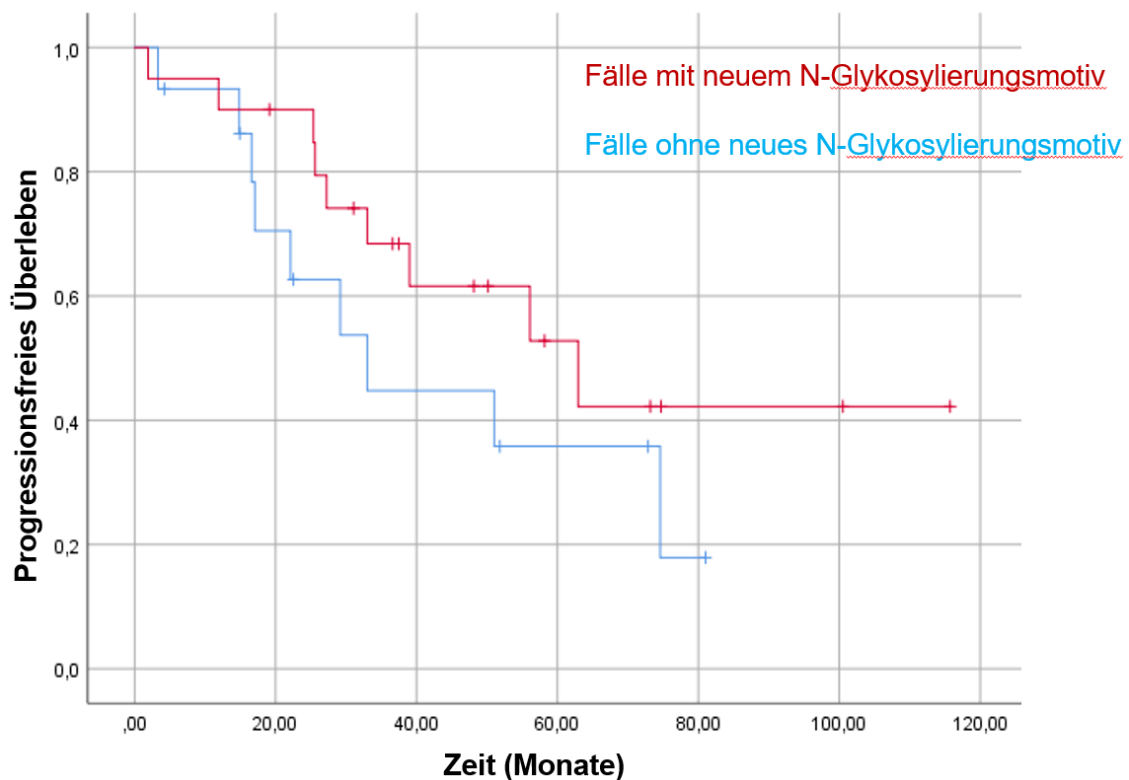


Abbildung 21: Kaplan Meier Kurve zur Darstellung des progressionsfreien Überlebens (y-Achse) in Monaten (x-Achse) bei FL Fällen mit (rot) und ohne (blau) neues potentielles N-Glykosylierungsmotiv.

Diskussion

Das FL weist trotz der t(14;18)-Translokation einen funktionstüchtigen BCR auf²⁷. An diesem wurden bereits an nicht selektierten FL Kohorten, welche aufgrund der Häufigkeit vornehmlich t(14;18)-positive FL Stadium III/IV einschlossen, eine große Anzahl an N-Glykosylierungsmotiven nachgewiesen³². Man konnte auch zeigen, dass diese Motive funktional sind, trotz weiterer Mutationen im Keimzentrum erhalten bleiben und mit Lektin-exprimierenden Zellen des Tumor-Mikromillieus (z.B. mit M2-Makrophagen) interagieren³². Es liegt also die These nahe, dass die N-Glykosylierungsmotive für die Pathogenese des FL von Bedeutung sind. Bisher ist allerdings wenig bekannt über t(14;18)-negative FL wie auch über die frühen/lokalisierten Stadien I und II. Somit wurden in der vorliegenden Arbeit, die auch bereits als Veröffentlichung vorliegt (Maier et al., Blood Advances, 2021)⁶², insbesondere diese bisher wenig untersuchten Subgruppen analysiert.

Wie bereits in der Zielsetzung der Arbeit erwähnt, wurde darauf verzichtet die eigene Veröffentlichung an jeder einzelnen Textstelle zu zitieren.

In der aktuellen Kohorte zeigten die t(14;18)-negativen FL signifikant weniger neu erworbene N-Glykosylierungsmotive als die t(14;18)-positiven FL im fortgeschrittenen Stadium III/IV, während man zwischen t(14;18)-positiven und -negativen FL im frühen/lokalisierten Stadium I/II keinen Unterschied beobachten konnte. Weiterhin zeigten t(14;18)-negative FL im Allgemeinen bevorzugt einen Zugewinn neu erworbener N-Glykosylierungsmotive in der FR3 Region des *IGHV* Gens `4-34 und unterschieden sich in diesen Punkten deutlich von den t(14;18)-positiven FL. Interessanterweise wurde die Nutzung des *IGHV4-34* Gens jedoch ausschließlich im dominanten Klon unbehandelter FL und in keinem Haupttumorklon rezidivierender FL beobachtet.

Beobachtete Häufigkeit und Verteilung neu erworbener N-Glykosylierungsmotive im Vergleich mit der Literatur

Die Häufigkeit neu erworbener N-Glykosylierungsmotive war trotz übereinstimmender mittlerer SHM Raten in der aktuellen FL Kohorte niedriger als die aus der Literatur bekannte Frequenz^{27,48}. Ein möglicher Grund hierfür wäre, dass unsere Kohorte fast zur Hälfte t(14;18)-negative FL einschloss, von denen die späteren Stadien signifikant weniger neue Motive anreicherten. Betrachtet man die t(14;18)-positiven FL unserer Kohorte alleine, lag jedoch auch hier die Frequenz deutlich unter dem Wert früherer Studien²⁷. Dies könnte auf die fehlende Untersuchung des V_L Gens zurückzuführen sein. So ergaben Analysen von McCann et al., dass bei alleiniger Untersuchung der V_H Sequenz 28 von 33 V_H Genen (84.8%) ein potentielles Motiv zeigten⁴⁸. Bei zusätzlichem Einbezug des V_L Gens konnten drei weitere Fälle mit neuen Motiven detektiert werden, sodass insgesamt 93.9% der Fälle mindestens ein Motiv anreicherten⁴⁸. Im Vergleich zeigte sich mit 45.5% im V_L Gen allerdings eine deutlich niedrigere Rate an neu erworbenen N-Glykosylierungsmotiven als im V_H Gen⁴⁸ – einhergehend mit dem niedrigeren mittleren SHM Level von 6% im V_L Gen²⁷. Auch in der Literatur unterscheiden sich die einzelnen Studien hinsichtlich der Frequenz neu erworbener N-Glykosylierungsmotive. Zhu et al. 2002 beschrieben bei alleiniger Untersuchung der V_H Sequenz einen Zugewinn von 79%²⁷, McCann et al. 2006 80.5%⁴⁸ und Zabalegui et al. 2004 beschrieben in 100% der Fälle eine Anreicherung von neuen N-Glykosylierungsmotiven⁴⁹. Möglicherweise begründet sich die Variabilität zwischen den Kohorten aber auch auf ethnischen und technischen Unterschieden.

Des Weiteren unterschied sich in unserer Studie auch die Verteilung der Motive innerhalb der V_H Genregionen. Vorangegangene Ergebnisse von Zhu et al. und McCann et al. zeigten, dass die Mehrheit der neuen Motive direkt innerhalb der variablen CDR Regionen lokalisiert waren und sich bevorzugt in CDR2 fanden^{27,50}. In unserer Studie konnten wir die neu erworbenen N-Glykosylierungsmotive jedoch vermehrt innerhalb der CDR3 und der FR3 Region finden. Die Anreicherung in CDR3 wurde hierbei bevorzugt in den t(14;18)-positiven Fällen der frühen Stadien I/II beobachtet. Der signifikante Zugewinn von

neuen Motiven in der FR3 Region war vor allem auf die Anreicherung mit t(14;18)-negativen FL zurückzuführen. Somit handelt es sich um neue Beobachtungen, die auf die seltenen FL Subgruppen zurückzuführen sind, die in dieser Kohorte angereichert waren. Die größte Analogie zu bereits publizierten Studienkohorten zeigte sich hingegen in unserer t(14;18)-positiven Rezidiv-Kohorte, in der wir vornehmlich „Hotspots“ an Codon 38-40 am Übergang CDR1/FR2 und an Codon 55-57 am Übergang FR2/CDR2 beobachteten. Dies scheint sich auf den ersten Blick nicht mit den Beobachtungen von Zhu et al. zu decken, die als „Hotspot“ für neu erworbene N-Glykosylierungsmotive Codon 33-35 der Aminosäure-Sequenz in CDR1 und Codon 50-52 der Aminosäure-Sequenz in CDR2 beschrieben haben²⁷. Dieser scheinbare Unterschied liegt jedoch lediglich an der verschiedenen Verwendung der Nomenklaturen zur Definition der Ig-Segmente. Während Zhu et al. in ihrer Studie die Definition von Kabat et al. verwendeten²⁷, nutzten wir aufgrund der Aktualität die Nomenklatur des „IMGT“ (international ImMunoGeneTics information system). Im Vergleich der beiden Nomenklaturen entspricht nun Codon 38-40 dem Codon 33-35 in CDR1 und Codon 55-57 dem Codon 50-52 in CDR2⁴⁶. Diese Beobachtung könnte ein Hinweis darauf sein, dass die bereits publizierten Kohorten vornehmlich aus rezidierten t(14;18)-positiven FL bestanden. Da es sich um randomisierte Kohorten handelte, bei denen keine Anreicherung für seltene Subgruppen beschrieben wurde und nicht vermerkt wurde, dass es sich um unbehandelte FL handelte, wäre dies auch im Hinblick auf die lange Überlebenszeit und die hohen Rezidivraten beim FL durchaus plausibel⁴. Für molekulare FL Studien wurde in der Vergangenheit auch häufig nach t(14;18)-positiven FL selektiert um die Diagnose FL zu sichern. Koning et al. beobachteten in ihrer Studie neben den beiden genannten zusätzlich einen „Hotspot“ in CDR3 an Codon 107-109⁵¹, der auch mit unseren Untersuchungen konsistent ist⁵¹. In Übereinstimmung mit der Literatur kam es in der FR2 Region zu keinem neuen Zugewinn von N-Glykosylierungsmotiven, was bereits in der Vergangenheit von Zhu et al. durch die interne und damit schwer zugängliche Position von FR2 im Ig erklärt wurde²⁷.

Unterschiede zwischen frühen und fortgeschrittenen FL Stadien

Wie bereits erwähnt, bestand die Gruppe der FL I/II je zur Hälfte aus t(14;18)-positiven und -negativen FL, wohingegen man in den Stadien III/IV nur ca. 10% t(14;18)-negative FL fand³⁹. Daraus ließe sich zum einen schlussfolgern, dass t(14;18)-negative FL bevorzugt im frühen Stadium I/II vorliegen, und die t(14;18)-Translokation im Tumorgewebe erst später im Krankheitsverlauf entsteht oder zum anderen, dass es sich um unterschiedliche Krankheitsentitäten handelt. Passend zu der ersten Annahme wiesen die lokalisierten Stadien I/II in der aktuellen Studie, unabhängig vom Translokationsstatus, eine signifikant niedrigere mittlere klonale Frequenz (53.2%) auf als die fortgeschrittenen Stadien III/IV (72.1%). Da in einer Studie mit longitudinalen FL Proben gezeigt wurde, dass es sich bei dem Erwerb neuer N-Glykosylierungsmotive um frühere Ereignisse handelt, die im Verlauf der Erkrankung erhalten blieben, würde dies eher die zweite Annahme stützen, dass es sich zumindest bei einem Teil der FL I/II und FL III/IV um unterschiedliche Krankheitsentitäten handelt.

Letztere Beobachtung ist vor allem interessant, da CDR3 die Ig-Region mit der größten Bedeutung für die Antigenerkennung ist²². Somit ist diese hoch variable CDR3 Schleife für die Antigen Spezifität und Erkennung von allen variablen CDR Schleifen die Wichtigste²². Da die CDR3 Schleife in ihrer einzigartigen Hypervariabilität von keinem Keimbahnen codiert wird, lassen sich folglich die Mutationen zur Keimbahn nicht bestimmen. Es waren alle neu erworbenen N-Glykosylierungsmotive, die in CDR3 detektiert wurden an der Verbindungsstelle von V- und D-Gen bzw. von D- und J-Gen lokalisiert. Somit besteht die Möglichkeit, dass der Erwerb der neuen N-Glykosylierungsmotive nicht oder zumindest nicht ausschließlich durch SHM sondern auch durch die VDJ-Rekombination im Knochenmark, während der frühen B-Zell Entwicklung, erfolgte¹³. Dies würde die Aussage von Koers et al. stützen, dass N-Glykosylierungsmotive in V_H CDR3 nicht mit der SHM Rate korrelieren⁵². Außerdem generiert auch die V_L Kette, welche ein niedrigeres SHM Level hat, ihre potentiellen neuen Motive hauptsächlich in CDR3²⁷, was wiederum der Entstehung durch SHM widerspricht. Das könnte weiter implizieren, dass diese Motive bereits in einem sehr frühen Stadium der Tumorgenese (VDJ-

Rekombination) entstehen und gerade den frühen/lokalisierten FL Stadien I/II, aufgrund der exponierten und entscheidenden Position in der CDR3 Schleife, einen erheblichen Selektionsvorteil garantieren. Unterstützt wird diese Vermutung auch dadurch, dass die in-situ folliculäre Neoplasie, eine Vorstufe des manifesten FL, N-Glykosylierungsmotive ebenfalls in CDR3 anreichert⁵³. Die Untersuchungen in der aktuellen Kohorte weisen somit verstärkt darauf hin, dass sich die Pathogenese von zumindest einem Teil der FL I/II maßgeblich von der Pathogenese der FL III/IV unterscheidet und es sich möglicherweise um unterschiedliche Krankheitsentitäten handelt.

Unterschiede zwischen t(14;18)-positiven und negativen FL

T(14;18)-negative und -positive FL unterschieden sich in Frequenz und Entstehung von neuen N-Glykosylierungsmotiven. Ein Alleinstellungsmerkmal der t(14;18)-negativen FL III/IV war die niedrigere Rate an neu erworbenen N-Glykosylierungsmotiven¹⁷. Somit scheint sich die Pathogenese nicht nur zwischen lokalisierten und fortgeschrittenen, sondern auch zwischen t(14;18)-positiven und -negativen FL zu unterscheiden. Da es sich aufgrund unserer vorangegangenen Beobachtungen (Zamo et al.) um eine gerichtete Hypothese handelte, wählten wir für den p-Wert die 1-seitige Signifikanz.

Die mittlere Rate der SHM zeigte jedoch keinen wesentlichen Unterschied zwischen t(14;18)-positiven und -negativen FL und scheidet somit als Grund für diese Unterschiede aus. Darüber hinaus beobachteten wir in der t(14;18)-negativen FL Kohorte verstärkt die Nutzung des N-Glykosylierungsmotivs NLS, welches interessanterweise weniger wahrscheinlich als N-Glykosylierungsmotiv dient⁵⁵. In zwei Fällen ist NLS sogar das einzige Motiv, das in der jeweiligen V_H Sequenz überhaupt detektiert werden konnte. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sowohl die Pathogenese von FL ohne neu erworbenes N-Glykosylierungsmotiv als auch die Pathogenese von t(14;18)-negativen FL mit dem Motiv NLS unabhängig von einer Lektin-vermittelten Stimulation des BCR ist.

Die Differenz zwischen t(14;18)-positiven und -negativen FL wurde noch deutlicher durch den abweichenden Entstehungsmechanismus der N-

Glykosylierungsmotive aus der Keimbahn. Kasturi et al. konnten zum Beispiel zeigen, dass das Ersetzen von Serin an Position drei durch Threonin die Wahrscheinlichkeit zur N-Glykosylierung erhöht⁵⁵. In Übereinstimmung mit unseren bisherigen Beobachtungen zeigte sich die genannte Mutation signifikant häufiger in den t(14;18)-positiven FL als in den t(14;18)-negativen FL. Zusammenfassend deuten diese Beobachtungen darauf hin, dass t(14;18)-positive FL von einer Lektin-vermittelten Stimulation des BCR abhängig sind, während t(14;18)-negative FL auf einen anderen Mechanismus der BCR Stimulation angewiesen sind.

Anreicherung der N-Glykosylierungsmotive in FR3 in t(14;18)-negativen FL als Hinweis für Autoreaktivität

Aufgrund der Beobachtung, dass die t(14;18)-negativen FL weniger N-Glykosylierungsmotive in den CDR Regionen anreicherten, stellt sich die Frage, mit welchem alternativen Mechanismus diese Subgruppe ihr Überleben im Keimzentrum sichert.

Ein Aspekt, der für eine mögliche autoreaktive Komponente der t(14;18)-negativen FL sprechen könnte, ist die Verteilung der Motive mit dem Hotspot in FR3. Denn auch für andere B-Zell-Erkrankungen autoimmunologischer Natur wurden N-Glykosylierungsmotive bevorzugt in dieser Region gefunden⁵⁶. So reicherten sich auch in den, für die rheumatoide Arthritis typischen Antikörpern gegen citrullinierte Proteine (ACPA), in über 90% N-Glykosylierungsmotive durch SHM in FR3 an⁵⁶. Doch nicht nur für die rheumatoide Arthritis, auch für weitere rheumatologische Autoimmunerkrankungen wie das primäre Sjögren Syndrom und ANCA-assoziierte Vaskulitiden wurden die Mehrheit der N-Glykosylierungsmotive in FR3 detektiert⁵⁶. Auch Visser et al. stellten anhand ihrer Ergebnisse die Hypothese auf, dass N-Glykosylierungsmotive in den FR Regionen einen alternativen Entstehungsmechanismus für autoreaktive B-Zellen unabhängig von der klassischen Antigenselektion darstellen könnten⁵⁷. Allerdings unterschied sich die Zusammensetzung der angefügten Zucker bei den genannten Autoimmunerkrankungen. Hier finden sich hauptsächlich stark syallierte Glykane⁵⁶ im Gegensatz zu den Glykanen des FL, die vor allem aus

Mannosen bestehen³⁰. Letztlich setzen wir dabei natürlich die Annahme voraus, dass t(14;18)-negative FL genauso glykosyliert werden wie die t(14;18)-positiven FL. Da Erstere aber in bisherigen Studienkohorten aufgrund ihrer Unterrepräsentanz (10-15% aller FL) bzw. der Auswahlkriterien speziell t(14;18)-positiver FL wahrscheinlich weniger vertreten waren, bleibt die Glykan-Komposition im Sinne der Oligomannosen eine Annahme und müsste gesondert untersucht und verifiziert werden.

Unterschiedliche Nutzung der Keimbahnsequenz *VH4-34* in verschiedenen FL Subgruppen

Verlust des natürlichen N-Glykosylierungsmotivs in *VH4-34*

Wie in der Literatur beschrieben, kam es auch in unseren Fällen zu einem Verlust des natürlichen Motivs in CDR2 des *IGHV4-34*⁵⁰ – dabei waren 50% der Fälle betroffen. Mc Cann et al. beschrieben sogar in 80% der Fälle den Verlust des natürlichen Motivs⁵⁰. Interessanterweise korrelierte der Verlust des Motivs mit einer erhöhten SHM Rate. Auch in normalen B-Zellen kommt dieses Keimbahngens in 4-10% der Zellen vor⁵⁰. Im Gegensatz zu neu erworbenen N-Glykosylierungsmotiven werden die natürlichen Motive in CDR2 nicht oligomannosyliert und tragen somit nicht über die Bindung an Lektinen zur Stimulation und zum Überleben der malignen Zellen bei⁵⁰. Die N-Glykosylierung durch Oligomannosen stellt demnach ein spezifisches Merkmal der neu hinzugewonnenen Motive dar⁵⁰.

VH4-34 als autoreaktive Keimbahnsequenz in t(14;18)-negativen FL

Neben einer verstärkten Lokalisation der neu erworbenen N-Glykosylierungsmotive in FR3 bei t(14;18)-negativen FL, wurden im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich eine verstärkte Nutzung des *IGHV4-34* Gens in dieser Subgruppe beobachtet. Da die Nutzung von *IGHV4-34* häufig im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen erwähnt wurde, spricht auch dies für eine (Auto)-Antigen vermittelte Stimulation dieser Fälle⁶¹.

Interessanterweise konnte Young et al. auch für das ABC-DLBCL eine vermehrte Nutzung von *VH4-34* und Autoreaktivität beobachten sowie eine Bewahrung von Motiven in FR1 der Keimbahnsequenz *VH4-34*, die als autoreaktiv gelten⁵⁸. Dazu zählen QW (Codon 6-7) und AVY (Codon 24-26) in FR1, die v.a. im IgM ABC-DLBCL kaum mutiert waren (7% IgM vs 40% IgG ABC-DLBCL)⁵⁸. Im Gegensatz dazu scheinen normale B-Zellen mit *VH4-34* das Motiv AVY in FR1 im Laufe ihrer Entwicklung zu verlieren⁵⁹. Dieses Motiv scheint wohl die Autoreaktivität zu unterbinden, um somit dem Selektionsprozess im Keimzentrum standzuhalten⁵⁹. Auch Sebastian et al. bestätigten in ihrer Studie, dass alle DLBCL mit *IGHV4-34* das Motiv AVY in FR1 und die AS W (Codon 7 in FR1) behielten⁶⁰. In weiterer Übereinstimmung zu Young et al. entstammten hier 100% der *IGHV4-34* Sequenzen dem Nicht-Keimzentrums-DLBCL, d.h. dem ABC-DLBCL⁶⁰. Da bekannt ist, dass t(14;18)-negative FL in ca. 50% zu ABC-DLBCL transformieren, während t(14;18)-positive FL im Prinzip ausschließlich zu GCB-DLBCL transformieren⁴¹, ist die Hypothese zu prüfen, ob die t(14;18)-negativen FL ihren Selektionsvorteil auch durch autoreaktive Stimulierung des BCR beziehen. Aufgrund des für die meisten Fälle gewählten Primers FR1, der erst bei Codon 24 oder 25 in FR1 startet, ist es in diesem Studiendesign jedoch nicht realisierbar, die gesamte Sequenz von FR1 auf die autoreaktiven Motive hin zu analysieren. Für genauere Aussagen müsste somit die gesamte Sequenz in FR1 analysiert werden sowie die Studienkohorte vergrößert werden.

In weiteren Übereinstimmungen zu Untersuchungen am ABC-DLBCL von Sebastian et al., konnten wir in t(14;18)-negativen FL zusätzlich eine Mutationsrate von ~80% in Codon 92 in FR3 und 0% in Codon 93 beobachten⁶⁰. Diese Ergebnisse suggerieren eine mögliche Analogie auf molekularer Ebene zwischen dem ABC-DLBCL und den t(14;18)-negativen FL und bestärken somit unsere bisherigen Beobachtungen. In Zusammenschau mit der verstärkten Lokalisation der neu erworbenen N-Glykosylierungsmotive in FR3, deuten diese Ergebnisse verstärkt darauf hin, dass bei t(14;18)-negativen FL oder zumindest einem Teil davon weniger die klassische N-Glykosylierung als mehr die positive Selektion durch Autoantigene eine entscheidende Rolle spielen könnte (Abbildung 22).

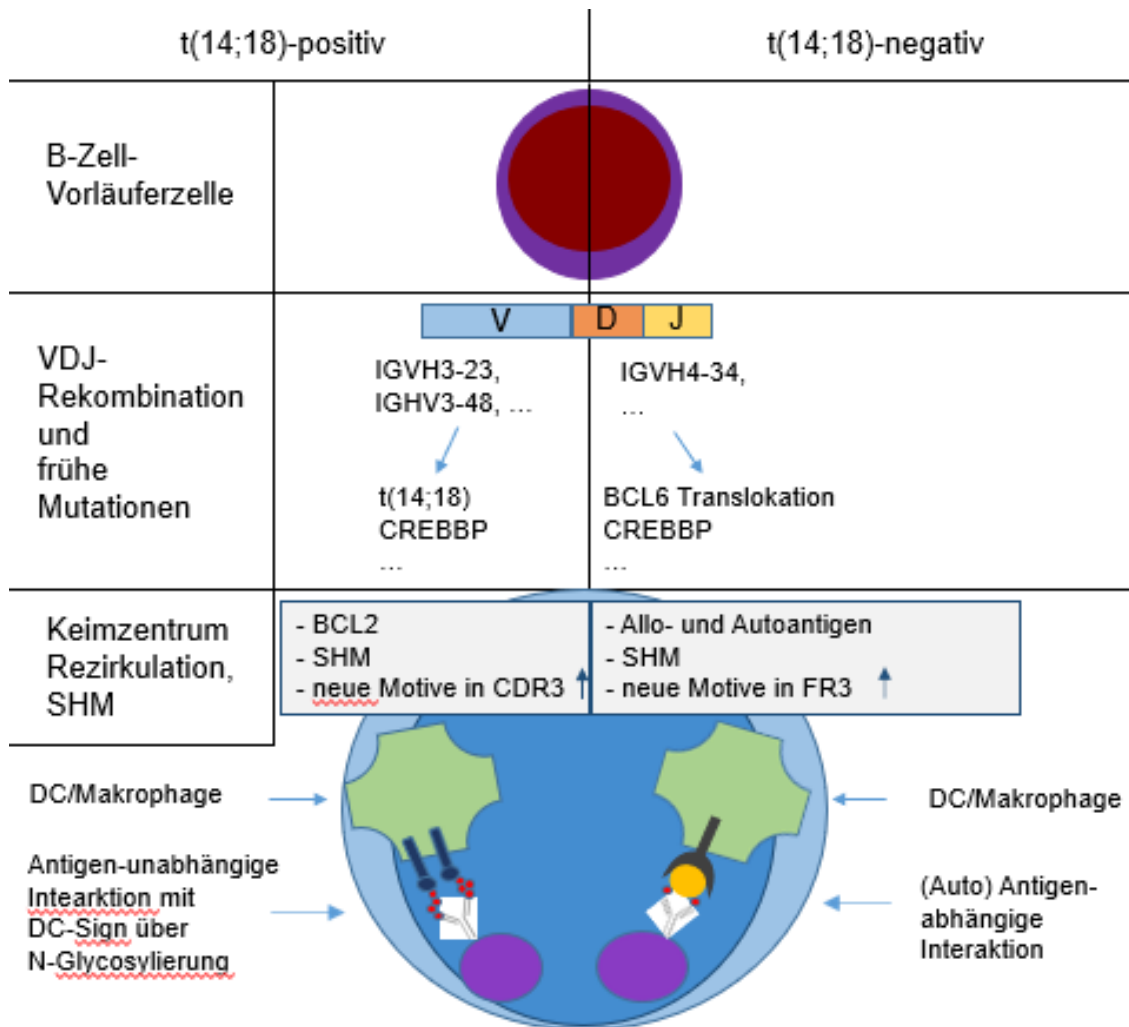


Abbildung 22: Hypothetisches Modell zur Pathogenese der t(14;18)- positiven und -negativen FL unter Einbezug aktueller Ergebnisse der vorliegenden Doktorarbeit. DC = dendritische Zellen. Modifiziert nach Leich et al. Blood Adv (2021) 5 (23): 4890–4900. © the American Society of Hematology. Eine generelle Erlaubnis von Blood Advances liegt vor (siehe Anhang).

Diskussion zu klinischen Kaplan-Meier-Korrelationen

Als Endpunkt bzw. eingetretenes Ereignis für die Kaplan-Meier-Schätzungen wurde die Tumorprogression nicht die Tumorsterblichkeit gewählt. Das beruht darauf, dass das FL ein sehr langsam wachsender Tumor ist und so zum Zeitpunkt der Datenerhebung Tumor-bedingte Todesfälle noch nicht eingetreten bzw. die Patienten und Patientinnen auch an anderen Ursachen verstorben sind. Es gilt auch zu beachten, dass das FL zwar langsam fortschreitet, aber als unheilbar gilt und so im weiteren Verlauf unweigerlich zur Progression führt⁴. Die Ergebnisse der Kaplan-Meier-Schätzungen stellen lediglich grobe Tendenzen dar, denn wichtige Daten, welche die Tumortherapie und psychosoziale Faktoren betreffen, sowie die Festlegung von Einschlusskriterien und weitere Studienbedingungen fehlen. Des Weiteren standen nur bei wenigen Fällen klinische Daten zur Verfügung, was eine statistische Aussage stark erschwert. Basierend auf den vorhandenen Daten ergab sich hinsichtlich des Geschlechts sowie des Translokationsstatus über alle Stadien hinweg keine wesentliche Differenz. Diese Beobachtung stimmt auch mit früheren Analysen überein³⁹. Interessanterweise zeigte sich jedoch, dass die Dauer bis zur Progression bei FL Patienten mit neu erworbenen N-Glykosylierungsmotiven im BCR länger ist als bei FL ohne neu erworbene Motive ($p=0.213$). Mit der Erwartungshaltung, dass die angereicherten Motive im *IGHV* dem FL-Tumor einen Überlebensvorteil durch das angeborene Immunsystem verschaffen, scheint die spätere Progression zuerst widersprüchlich. Allerdings gilt zu beachten, dass FL Fälle ohne zugewonnene N-Glykosylierung ihren Selektionsvorteil wahrscheinlich über andere Mechanismen, wie zum Beispiel die Stimulation durch Autoantigene, erwerben. Eine Gegenüberstellung der t(14;18)-positiven und -negativen FL, beschränkt auf die fortgeschrittenen Stadien III/IV hinsichtlich Progression, war aufgrund der kleinen Fallzahlen nicht möglich.

Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen erkennen, dass sich die t(14;18)-negativen FL im Stadium III/IV als eigene Subgruppe, insbesondere von den t(14;18)-positiven FL abheben, aber auch von den t(14;18)-negativen FL Stadium I/II. Dabei ist unter anderem die vermehrte *IGHV* Gennutzung von *IGHV4-34* und die verstärkte Lokalisation der N-Glykosylierungsmotive in FR3 in t(14;18)-negativen FL hervorzuheben, was auf einen autoreaktiven Mechanismus bei der Tumorphathogenese in dieser FL Subgruppe hindeutet. Bemerkenswert ist außerdem, dass sich die Nutzung des *IGHV4-34* Gens auf PD-FL beschränkte und es sich bei diesem Merkmal somit möglicherweise um einen geeigneten prognostischen Marker handeln könnte.

Da es sich bei der aktuellen Kohorte, vor allem aufgrund der Unterteilung in einzelne Subgruppen, um eine relativ kleine Kohorte handelte, sollten die bisherigen Beobachtungen im Rahmen von groß angelegten *IGHV*-Sequenzierstudien möglichst auch im klinischen Kontext validiert werden. Außerdem könnten funktionelle Studien Aufschluss darüber geben, ob beispielsweise bestimmte t(14;18)-negative FL Subgruppen bevorzugt an Autoantigene und weniger an Lektine (DC-SIGN) binden.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde das Vorkommen neu erworbener N-Glykosylierungsmotive in t(14;18)-positiven und -negativen FL der lokalisierten (FL I/II) und fortgeschrittenen Stadien (FL III/IV), sowie zum Zeitpunkt der Primärdiagnose und des Rezidivs untersucht. Dabei wurde der jeweilige Haupttumorklon mit Hilfe von „Next Generation Sequencing“ und unter Verwendung des „LymphoTrack® Assays“ in einer Serie von 68 kryoasservierten FL identifiziert 36 t(14;18)-negative und 32 t(14;18)-positive FL. Die Frequenz neu erworbener N-Glykosylierungsmotive unterschied sich signifikant zwischen t(14;18)-positiven und -negativen PD/R-FL III/IV, während man zwischen t(14;18)-positiven und -negativen PD/R-FL I/II keinen Unterschied beobachten konnte. Des Weiteren zeigten t(14;18)-negative PD/R-FL I-IV im Vergleich zu t(14;18)-positiven PD/R-FL I-IV signifikant häufiger einen Zugewinn neuer N-Glykosylierungsmotive in der FR3 Region des BCL2 Gens, sowie eine vermehrte Nutzung des *IGHV4-34* Keimbahngens. Interessanterweise beschränkte sich die Nutzung des *IGHV4-34* Gens auf PD-FL und konnte in R-FL nicht nachgewiesen werden. Da sowohl das Vorkommen neu erworbener N-Glykosylierungsmotive in FR3 als auch die Nutzung von *IGHV4-34* im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen beschrieben wurden, deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass die Subgruppe der t(14;18)-negativen FL im pathologischen Prozess der Onkogenese mehr auf die Stimulation durch (Auto)-Antigene als durch die Stimulation des B-Zell Rezeptors mit Lektinen (DC-SIGN) angewiesen sein könnte.

Literaturverzeichnis

1. Herold G. *Innere Medizin*. Köln: Herold Gerd; 2016.
2. Leich E, Salaverria I, Bea S, et al. Follicular lymphomas with and without translocation t(14;18) differ in gene expression profiles and genetic alterations. *Blood*. 2009;114(4):826-834.
3. Leich E, Zamo A, Horn H, et al. MicroRNA profiles of t(14;18)-negative follicular lymphoma support a late germinal center B-cell phenotype. *Blood*. 2011;118(20):5550-5558.
4. Carbone A, Roulland S, Gloghini A, et al. Follicular lymphoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2019;5(1):83.
5. Swerdlow S, et al. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. 4th ed: WHO; 2017.
6. e.V. DDGfHuMO, ed *Onkopedia Leitlinien* Follikuläres Lymphom.
7. Buske C, Dreyling M, Herold M, Lohri A, Neumeister P, Willenbacher W. *Onkopedia Leitlinien, Follikuläres Lymphom*. Januar 2017; www.onkopedia.com.
8. Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, et al. Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification. *J Clin Oncol*. 2014;32(27):3059-3068.
9. Feller AC, Diebold J. *Histopathology of Nodal and Extranodal Non-Hodgkin's Lymphomas*. 3rd ed: Springer, Berlin, Heidelberg; 2014.
10. Mason DY, Harris NL. *HUMAN LYMPHOMA: Clinical Implications of the REAL Classification*. London: Springer; 1999.
11. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*. 1994;84(5):1361-1392.
12. Katzenberger T, Ott G, Klein T, Kalla J, Muller-Hermelink HK, Ott MM. Cytogenetic alterations affecting BCL6 are predominantly found in follicular lymphomas grade 3B with a diffuse large B-cell component. *Am J Pathol*. 2004;165(2):481-490.
13. Kridel R, Sehn LH, Gascoyne RD. Pathogenesis of follicular lymphoma. *J Clin Invest*. 2012;122(10):3424-3431.
14. Bende RJ, Smit LA, van Noesel CJ. Molecular pathways in follicular lymphoma. *Leukemia*. 2007;21(1):18-29.
15. Liu Y, Hernandez AM, Shibata D, Cortopassi GA. BCL2 translocation frequency rises with age in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(19):8910-8914.
16. Limpens J, Stad R, Vos C, et al. Lymphoma-associated translocation t(14;18) in blood B cells of normal individuals. *Blood*. 1995;85(9):2528-2536.
17. McDonnell TJ, Korsmeyer SJ. Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14; 18). *Nature*. 1991;349(6306):254-256.
18. Farinha P, Masoudi H, Skinnider BF, et al. Analysis of multiple biomarkers shows that lymphoma-associated macrophage (LAM) content is an

- independent predictor of survival in follicular lymphoma (FL). *Blood*. 2005;106(6):2169-2174.
19. Dave SS, Wright G, Tan B, et al. Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N Engl J Med*. 2004;351(21):2159-2169.
 20. Noppe SM, Heirman C, Bakkus MH, Brissinck J, Schots R, Thielemans K. The genetic variability of the VH genes in follicular lymphoma: the impact of the hypermutation mechanism. *Br J Haematol*. 1999;107(3):625-640.
 21. Murphy K, Casey W. *Janeway Immunologie*. W.W. Norton & Company, Inc.; 2018.
 22. Zelenetz AD, Chen TT, Levy R. Clonal expansion in follicular lymphoma occurs subsequent to antigenic selection. *J Exp Med*. 1992;176(4):1137-1148.
 23. Xu JL, Davis MM. Diversity in the CDR3 region of V(H) is sufficient for most antibody specificities. *Immunity*. 2000;13(1):37-45.
 24. Kuppers R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(4):251-262.
 25. Sachen KL, Strohmman MJ, Singletary J, et al. Self-antigen recognition by follicular lymphoma B-cell receptors. *Blood*. 2012;120(20):4182-4190.
 26. Cha S, Qin H, Kannan S, et al. Nonstereotyped lymphoma B cell receptors recognize vimentin as a shared autoantigen. *J Immunol*. 2013;190(9):(4887–4898).
 27. Zhu D, McCarthy H, Ottensmeier CH, et al. Acquisition of potential N-glycosylation sites in the immunoglobulin variable region by somatic mutation is a distinctive feature of follicular lymphoma. *Blood*. 2002;99(7):(2562–2568).
 28. Mamessier E, Drevet C, Broussais-Guillaumot F, et al. Contiguous follicular lymphoma and follicular lymphoma in situ harboring N-glycosylated sites. *Haematologica*. 2015;100(4):e155-157.
 29. Aebi M. N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1833(11):2430-2437.
 30. Radcliffe CM, Arnold JN, Suter DM, et al. Human follicular lymphoma cells contain oligomannose glycans in the antigen-binding site of the B-cell receptor. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(10):7405-7415.
 31. Coelho V, Krysov S, Ghaemmaghami AM, et al. Glycosylation of surface Ig creates a functional bridge between human follicular lymphoma and microenvironmental lectins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(43):18587-18592.
 32. Linley A, Krysov S, Ponzoni M, Johnson PW, Packham G, Stevenson FK. Lectin binding to surface Ig variable regions provides a universal persistent activating signal for follicular lymphoma cells. *Blood*. 2015;126(16):1902-1910.
 33. Darzentas N, Hadzidimitriou A, Murray F, et al. A different ontogenesis for chronic lymphocytic leukemia cases carrying stereotyped antigen receptors: molecular and computational evidence. *Leukemia*. 2010;24(1):125-132.

34. Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, et al. Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: Pathogenetic implications and clinical correlations. *Blood*. 2007;109(1):259-270.
35. Messmer BT, Albesiano E, Efremov DG, et al. Multiple distinct sets of stereotyped antigen receptors indicate a role for antigen in promoting chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 2004;200(4):519-525.
36. Hadzidimitriou A, Agathangelidis A, Darzentas N, et al. Is there a role for antigen selection in mantle cell lymphoma? Immunogenetic support from a series of 807 cases. *Blood*. 2011;118(11):3088-3095.
37. Potter KN, Li Y, Pascual V, et al. Molecular characterization of a cross-reactive idiotope on human immunoglobulins utilizing the VH4-21 gene segment. *J Exp Med*. 1993;178(4):1419-1428.
38. Richardson C, Chida AS, Adlowitz D, et al. Molecular basis of 9G4 B cell autoreactivity in human systemic lupus erythematosus. *J Immunol*. 2013;191(10):4926-4939.
39. Leich E, Hoster E, Wartenberg M, et al. Similar clinical features in follicular lymphomas with and without breaks in the *BCL2* locus. *Leukemia*. 2016;30(4):854-860.
40. Gagyí E, Balogh Z, Bodor C, et al. Somatic hypermutation of IGVH genes and aberrant somatic hypermutation in follicular lymphoma without BCL-2 gene rearrangement and expression. *Haematologica*. 2008;93(12):1822-1828.
41. Zamo A, Pischmarov J, Horn H, Ott G, Rosenwald A, Leich E. The exomic landscape of t(14;18)-negative diffuse follicular lymphoma with 1p36 deletion. *Br J Haematol*. 2018;180(3):391-394.
42. Kridel R, Mottok A, Farinha P, et al. Cell of origin of transformed follicular lymphoma. *Blood*. 2015;126(18):2118-2127.
43. Gupta NT, Vander Heiden JA, Uduman M, Gadala-Maria D, Yaari G, Kleinstein SH. Change-O: a toolkit for analyzing large-scale B cell immunoglobulin repertoire sequencing data. *Bioinformatics*. 2015;31(20):3356-3358.
44. Vander Heiden JA, Yaari G, Uduman M, et al. pRESTO: a toolkit for processing high-throughput sequencing raw reads of lymphocyte receptor repertoires. *Bioinformatics*. 2014;30(13):1930-1932.
45. Wu TT, Kabat EA. An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *J Exp Med*. 1970;132(2):211-250.
46. Lefranc MP, Pommie C, Ruiz M, et al. IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains. *Dev Comp Immunol*. 2003;27(1):55-77.
47. Luzern H. Pearson-Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstest. 2017; <https://www.empirical-methods.hslu.ch/entscheidbaum/zusammenhaenge/pearson-chi-quadrat/>.
48. McCann KJ, Johnson PW, Stevenson FK, Ottensmeier CH. Universal N-glycosylation sites introduced into the B-cell receptor of follicular lymphoma by somatic mutation: a second tumorigenic event? *Leukemia*. 2006;20(3):530-534.

49. Zabalegui N, de Cerio AL, Inoges S, et al. Acquired potential N-glycosylation sites within the tumor-specific immunoglobulin heavy chains of B-cell malignancies. *Haematologica*. 2004;89(5):541-546.
50. McCann KJ, Ottensmeier CH, Callard A, et al. Remarkable selective glycosylation of the immunoglobulin variable region in follicular lymphoma. *Mol Immunol*. 2008;45(6):1567-1572.
51. Koning MT, Quinten E, Zoutman WH, et al. Acquired N-Linked Glycosylation Motifs in B-Cell Receptors of Primary Cutaneous B-Cell Lymphoma and the Normal B-Cell Repertoire. *J Invest Dermatol*. 2019;139(10):2195-2203.
52. Koers J, Derksen NIL, Ooijevaar-de Heer P, et al. Biased N-Glycosylation Site Distribution and Acquisition across the Antibody V Region during B Cell Maturation. *J Immunol*. 2019;202(8):2220-2228.
53. Kosmidis P, Bonzheim I, Dufke C, et al. Next generation sequencing of the clonal IGH rearrangement detects ongoing mutations and interfollicular trafficking in in situ follicular neoplasia. *PLoS One*. 2017;12(6):e0178503.
54. Bortz J, Christof S. *Statistik für Human- und Sozialwissenschaftler*. 7. Auflage ed: Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2010.
55. Kasturi L, Chen H, Shakin-Eshleman SH. Regulation of N-linked core glycosylation: use of a site-directed mutagenesis approach to identify Asn-Xaa-Ser/Thr sequons that are poor oligosaccharide acceptors. *Biochem J*. 1997;323 (Pt 2):415-419.
56. Vletter EM, Koning MT, Scherer HU, Veelken H, Toes REM. A Comparison of Immunoglobulin Variable Region N-Linked Glycosylation in Healthy Donors, Autoimmune Disease and Lymphoma. *Front Immunol*. 2020;11:241.
57. Visser A, Hamza N, Kroese FGM, Bos NA. Acquiring new N-glycosylation sites in variable regions of immunoglobulin genes by somatic hypermutation is a common feature of autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis*. 2018;77(10):e69.
58. Young RM, Wu T, Schmitz R, et al. Survival of human lymphoma cells requires B-cell receptor engagement by self-antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(44):13447-13454.
59. Sabouri Z, Schofield P, Horikawa K, et al. Redemption of autoantibodies on anergic B cells by variable-region glycosylation and mutation away from self-reactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(25):E2567-2575.
60. Sebastian E, Alcoceba M, Balanzategui A, et al. Molecular characterization of immunoglobulin gene rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma: antigen-driven origin and *IGHV4-34* as a particular subgroup of the non-GCB subtype. *Am J Pathol*. 2012;181(5):1879-1888.
61. Bhat NM, Bieber MM, Spellerberg MB, Stevenson FK, Teng NN. Recognition of auto- and exoantigens by V4-34 gene encoded antibodies. *Scand J Immunol*. 2000;51(2):134-140.
62. Leich E., Maier C., Bomben R, Rosenwald A., Zamo A. Follicular lymphoma subgroups with and without t(14;18) differ in their N-glycosylation pattern and IGHV usage“ *Blood Adv*. 2021 Dec 14;5(23):4890-4900.

Appendix

I. Abkürzungsverzeichnis

ABC-DLBCL = activated B-cell-like DLBCL

AID = aktivierungsinduzierte Cytidin-Desaminase

AKT = Protein Kinase B

AS = Aminosäure

BCR = B-Zell-Rezeptor

BL = Burkitt Lymphom

BCL2-BAP = Vysis LSI *BCL2* Dual Color Break Apart Rearrangement Probe

CDR-Regionen = complementarity determining regions

CH = konstante Region des B-Zell-Rezeptors der schweren Kette

CL = konstante Region des B-Zell-Rezeptors der leichten Kette

CLL = chronisch lymphatische Leukämie

CS = Zitronensäure

CSR = class switch recombination

DC = dendritische Zellen

DC-SIGN = DC-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin

DLBCL = diffus großzelliges B-Zell-Lymphom

ER = Endoplasmatisches Retikulum

ERK = extrazellulären Signal-regulatorischen Kinase

FDC = folliculäre dendritische Zellen

FF = Kryoasserviertes Frischgewebe

FFPE Gewebe = Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe

FISH = Fluorescence In Situ Hybridization

FL = folliculäres Lymphom

FR-Regionen = framework regions

GCB-DLBCL = germinal center B-cell-like DLBCL

HE-Ganzschnitte = Hämatoxylin und Eosin gefärbte Ganzschnitte

Ig = Immunglobulin

IGH/BCL2-Fusion = Vysis LSI *IGH/BCL2* Dual Color Dual Fusion Probe

IGHV = Immunglobulin schwere Ketten

IGVL = Immunglobulin leichte Ketten

IHC = Immunhistochemie

KI = Konfidenzintervall

LS = LymphoTrack Software

MM = Multiples Myelom

MR = Mannose Rezeptor

MTA-1 = Manual Tissue Arrayer

MWU = Mann-Whitney-U-Test

NGS = Next Generation Sequencing

N.S.= Nicht signifikant

ORs = Odds ratios

OT = Objektträger

PCR= Polymerase-Kettenreaktion

PD-FL = Primärdiagnose FL

PLC γ 2 = Phospholipase C- γ -2

RAG = recombination-activating gene

R-FL = Rezidiv FL

SHM = somatische Hypermutation

SYK = Milz Tyrosin Kinase

TMA = Tissue Microarrays

U = unbekanntes Stadium

VH = variable Region des B-Zell-Rezeptors der schweren Kette

VL = variable Region des B-Zell-Rezeptors der leichten Kette

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: vereinfachtes Schema des B-Zell Rezeptors nach „Janeway Immunologie“, Murphy K.16 CH1, CH2, CH3 und CL: konstante Regionen des B-Zell Rezeptors; VH und VL: variable Regionen des B-Zell Rezeptors.....	10
Abbildung 2: Schematische Abbildung der variablen Region VH des B-Zell Rezeptors: Dargestellt sind die drei hypervariablen Regionen CDR1, CDR2 und CDR3. Die variabelste Region CDR3 ist an der Verbindungsstelle zwischen den VH-DH-JH-Gensegmenten lokalisiert.....	10
Abbildung 3: Beispielhafte Darstellung der Karte des TMA 1 mit 29 PD-FL Fällen des Stadiums I/II (TMA 2-4 im Anhang)	21
Abbildung 4: Auswertung der Hybridisierung mit der Sonde „Vysis LSI <i>BCL2</i> Dual Color Break Apart Rearrangement Probe“ (<i>BCL2</i> -BAP).....	24
Abbildung 5: Auswertung der Hybridisierung mit der Sonde „Vysis LSI <i>IGH/BCL2</i> Dual Color Dual Fusion Probe“ (<i>IGH/BCL2</i> -Fusion)	25
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Ansatzstellen der verschiedenen Primer an der <i>IGHV</i> -Region (Leader-, VH-, JH-Region) des B-Zell Rezeptors	27
Abbildung 7: Beispielhafte Darstellung der Auswertung einer <i>IGHV</i> -Sequenz mit dem IgBLAST Tool (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/):.....	30
Abbildung 8: Übersicht der Anzahl der FL Fälle, welche der FISH Analyse unterzogen wurden und daraus resultierende Ergebnisse.	34
Abbildung 9: Übersicht der Anzahl der FL Fälle, welche mit dem LymphoTrack® sequenziert wurden, und daraus resultierende Ergebnisse (Identifizierung des Tumorklons, Detektion von neuen N-Glykosylierungsmotiven).	37
Abbildung 10: Frequenz des Haupttumorklons von PD- und R-FL Stadium I/II und Stadium III/IV: Es zeigte sich ein Unterschied in der mittleren Frequenz des Tumorklons im FL-Gewebe zwischen den Stadien: FL Stadien I/II 51.2% und III/IV 75.4%.....	39
Abbildung 11: Lokale Verteilung der neuen N-Glykosylierungsmotive in der <i>IGHV</i> -Region (x-Achse) mit der jeweiligen Anzahl (y-Achse) der kompletten Studienkohorte(PD+R).	44

Abbildung 12: Lokale Verteilung der neuen N-Glykosylierungsmotive in der <i>IGHV</i> -Region (x-Achse) mit der jeweiligen Anzahl (y-Achse) der PD-FL I/II t(14;18)-negativ und -positiv.....	45
Abbildung 13: Lokale Verteilung der neuen N-Glykosylierungsmotive in der <i>IGHV</i> -Region (x-Achse) mit der jeweiligen Anzahl (y-Achse) der PD-FL III/IV t(14;18)-negativ und -positiv..	46
Abbildung 14 Lokale Verteilung der neuen N-Glykosylierungsmotive in der <i>IGHV</i> -Region (x-Achse) mit der jeweiligen Anzahl (y-Achse) der R-FL I-IV t(14;18)-negativ und -positiv... ..	47
Abbildung 15: Lokale Verteilung der N-Glykosylierungsmotive in der <i>IGHV</i> -Region mit der prozentualen Anzahl (y-Achse) der t(14;18)-positiven FL (PD+R) im Vergleich zu den t(14;18)-negativen FL (PD+R).	48
Abbildung 16: Lokale Verteilung im <i>IGHV</i> (x-Achse) und Anzahl (y-Achse) von neuen potentiellen N-Glykosylierungsmotiven in R-FL t(14;18)-positiv, Datenreihen 1: Stadium I/II, Datenreihen 2: Stadium III/IV, Datenreihen 3: unbekanntes Stadium	49
Abbildung 17: <i>IGHV</i> Gennutzung (y-Achse) sowie deren Häufigkeit (x-Achse) im Vergleich PD-FL I-IV (blau) und R-FL I-IV (gelb).....	51
Abbildung 18: <i>IGHV</i> Gennutzung (y-Achse) sowie deren Häufigkeit (x-Achse). Im Vergleich PD-FL t(14;18)-positiv (blau) und -negativ (orange).	52
Abbildung 19: Kaplan Meier Kurve zur Darstellung des progressionsfreien Überlebens (y-Achse) in Monaten (x-Achse) bei weiblichen (blau) und männlichen (rot) FL Patienten.....	59
Abbildung 20: Kaplan Meier Kurve zur Darstellung des progressionsfreien Überlebens (y-Achse) in Monaten (x-Achse) in t(14;18)-positiven (rot) und -negativen (blau) FLI-IV.	60
Abbildung 21: Kaplan Meier Kurve zur Darstellung des progressionsfreien Überlebens (y-Achse) in Monaten (x-Achse) bei FL Fällen mit (rot) und ohne (blau) neues potentielles N-Glykosylierungsmotiv.....	61
Abbildung 22: Hypothetisches Modell zur Pathogenese der t(14;18)- positiven und -negativen FL unter Einbezug aktueller Ergebnisse der vorliegenden Doktorarbeit.....	70

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Kriterien der Stadien Einteilung im Follikulären Lymphom nach „Innere Medizin“, Herold G.1	4
Tabelle 2: Übersicht der gesamten Studienkohorte unterteilt in die Stadien I-IV, PD- und R-FL sowie der Herkunft der FL-Fälle	16
Tabelle 3: Übersicht der Verteilung der FL-Fälle auf den vier verschiedenen TMAs	20
Tabelle 4: Übersicht der mit dem LymphoTrack® sequenzierten PD- und R-FL Fälle, unterteilt nach Stadium und t(14;18)-Translokationsstatus.	26
Tabelle 5: Übersicht der PD- und R-FL Fälle Stadium I-IV nach t(14;18)-Translokation mit klinischen Daten für die Kaplan Meier Korrelationen.....	32
Tabelle 6: Übersicht der PD- und R-FL I-IV mit klonaler Amplifikation... ..	40
Tabelle 7: Übersicht der PD- und R-FL I-IV bezüglich deren mittlere Frequenz des Hauptklons im Tumorgewebe.....	40
Tabelle 8: Übersicht der Rate der SHM in den PD- und R-FL	41
Tabelle 9: Frequenz von neu hinzugewonnen N-Glykosylierungsmotiven in t(14;18)-positiven und -negativen PD- und R-FL I/II und III/IV. Der Vergleich (p-Wert) zwischen den t(14;18)-positiven und -negativen FL und Stadien I-IV wurde mit dem exakten Test nach Fisher berechnet.....	43
Tabelle 10: Übersicht der Motive in der CDR3-Region des <i>IGHV</i> an den V,D,J-Verbindungsstellen: Fast alle neuen Motive reichern sich am Übergang der Gensegmente des <i>IGHV</i> Gens an, insbesondere am Übergang vom V- zum D-Segment sowie vom D- zum J-Segment.	50
Tabelle 11: Übersicht der Gennutzung von <i>IGHV4-34</i> in Zusammenhang mit dem potentiellen Verlust des natürlichen Motivs sowie der Generierung neuer Motive. Dabei wurden nur Fälle aufgeführt, welche ein neues Motiv dazu gewonnen haben oder Fälle mit der <i>IGVH</i> Sequenz `4-34`.	53
Tabelle 12: Frequenz und Zusammensetzung der Aminosäuresequenz der N-Glykosylierungsmotive in t(14;18)-negativen PD/R-FL I-IV	54
Tabelle 13: Frequenz und Zusammensetzung der Aminosäuresequenz der N-Glykosylierungsmotive in t(14;18)-positiven PD/R-FL I-IV.....	54

Tabelle 14: Darstellung der N-Glykosylierungsmotive in der AS-Sequenz in der jeweiligen *IGHV*-Region mit gelber Hervorhebung der mutierten Aminosäuren bzw. der zu Grunde liegenden mutierten Nukleotidsequenz in t(14;18) – negativen FL nach IMGT Datenbank (http://www.imgt.org/IMGT_vquest/vquest 57

Tabelle 15: Darstellung der N-Glykosylierungsmotive in der AS-Sequenz in der jeweiligen *IGHV*-Region mit gelber Hervorhebung der mutierten Aminosäuren bzw. der zu Grunde liegenden mutierten Nukleotidsequenz in t(14;18) – positiven FL nach IMGT Datenbank (http://www.imgt.org/IMGT_vquest/vquest 58

IV. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen, die auf verschiedene Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, meinen herzlichen Dank aussprechen.

Allen voran möchte ich mich bei PD Dr. Ellen Leich bedanken für die herausragende fachliche Betreuung und persönliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Dissertation. Ihr großes Interesse am Gelingen der Arbeit und die kontinuierliche, tatkräftige Unterstützung ermöglichten erst die Umsetzung dieser Dissertation.

Herrn Prof. Dr. med. Andreas Rosenwald danke ich für die Möglichkeit diese Arbeit am Institut für Pathologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg anzufertigen sowie für seine einwandfreie fachliche Expertise, die diese Arbeit stets begleitet hat.

Weiter gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. German Ott für die kompetente und hilfreiche externe Betreuung der Dissertation.

Außerdem bin ich Herrn Dr. Riccardo Bomben und Herrn Dr. Filippo Vit und deren Team aus dem National Cancer Institute in Aviano (Italien) für die technische Durchführung der DNA-Sequenzierung und Identifizierung des Hauptklons zu großem Dank verpflichtet.

Darüber hinaus danke ich Herrn Prof. Dr. med. Alberto Zamo für die Mithilfe und Aufbereitung bei der Veröffentlichung der Ergebnisse. Bei Herrn Dr. med. Alexander Kerscher möchte ich mich für die Bereitstellung der klinischen Daten bedanken, die zur Bereicherung dieser Arbeit beigetragen haben.

Theodora Nevada, Tina Grieb, Heike Brückner und Eva Bachmann danke ich für die Hilfe bei der technischen Umsetzung sowie für ihr immer offenes Ohr bei fachlichen sowie persönlichen Belangen.

Zuletzt gilt mein Dank meinem privaten Umfeld, meinen guten Freunden, welche für den wohltuenden Freizeitausgleich gesorgt haben und natürlich meiner Familie, die stets an mich geglaubt hat und mir, wie eh und je, selbstverständlich zur Seite gestanden ist.

V. Publikationen in Zusammenhang mit dieser Arbeit

Leich E., Maier C., Bomben R., Vit F., Bosi A., Horn H., Gattei V., Ott G., Rosenwald A., Zamo A.

„Follicular lymphoma subgroups with and without t(14;18) differ in their N-glycosylation pattern and IGHV usage“

Blood advances, final version published online 30 November 2021.

VI. Anhang

Copyright Information

As the open-access journal of the American Society of Hematology, *Blood Advances* makes the full text of every article published in the journal immediately accessible online, www.bloodadvances.org.

All material published in *Blood Advances* represents the opinions of the authors and does not reflect the opinions of the [American Society of Hematology](#), the Editors, or the institutions with which the authors are affiliated. Authors submitting manuscripts to *Blood Advances* do so with the understanding that if a manuscript is accepted, the copyright in the article, including the right to reproduce the article in all forms and media, shall be assigned exclusively to The American Society of Hematology and that the corresponding author and all coauthors will be required to sign their copyright transfer using *Blood Advances eJournalPress*. The American Society of Hematology does not provide a Creative Commons license.

Blood Advances allows authors to retain a number of nonexclusive rights to their published article. The work of the authors who are U.S. Federal Government employees is not protected by the Copyright Act, and copyright ownership will not be transferred in these cases. The online form to sign on *Blood Advances eJournalPress* allows authors to indicate their status as Federal Government employees.

Authors have permission to share their work in the following ways after their article has been published online in *Blood Advances*.

- With students or colleagues for their personal use in presentations and other educational endeavors.
- On the authors' institutional repositories.
- On personal websites.
- As a link to the article on the journal's website anywhere at any time.
- Publicly on non-commercial platforms.

Specific examples of acceptable author reuse and sharing include:

- Reprinting the article in print collections of the author's own writing.
- Reusing figures and tables created by the author in future works.
- Reproducing the article for use in courses the author is teaching. If the author is employed by an academic institution, that institution may also reproduce the article for course teaching.

- Distributing photocopies of the article to colleagues, but only for non-commercial purposes.
- Posting a copy of the article on the author's personal website, departmental website, and/or the university intranet. A hyperlink to the article on the *Blood Advances* website must be included.
- Presenting the work orally in its entirety.
- Using the article in theses and/or dissertation.

Authors reusing their own material in the above ways must include appropriate attribution and do not need to contact Blood Advances for permission. For all other uses, the author must request permission from ASH by [visiting the Copyright Clearance Center](#).

© *Blood Advances* Online by the American Society of Hematology

Nicht selbstständig durchgeführte Anteile der Arbeit:

Die DNA-Sequenzierung mit dem LymphoTrack® sowie die bioinformatischen Analysen zur die Definition des Tumorklons wurden unter der Leitung von Dr. Riccardo Bomben in der „Clinical and Experimental Onco-Hematology Unit des National Cancer Institute“ in Aviano, Italien durchgeführt.

Dr. Riccardo Bomben ist einverstanden mit der Veröffentlichung der Ergebnisse in dieser Doktorarbeit.

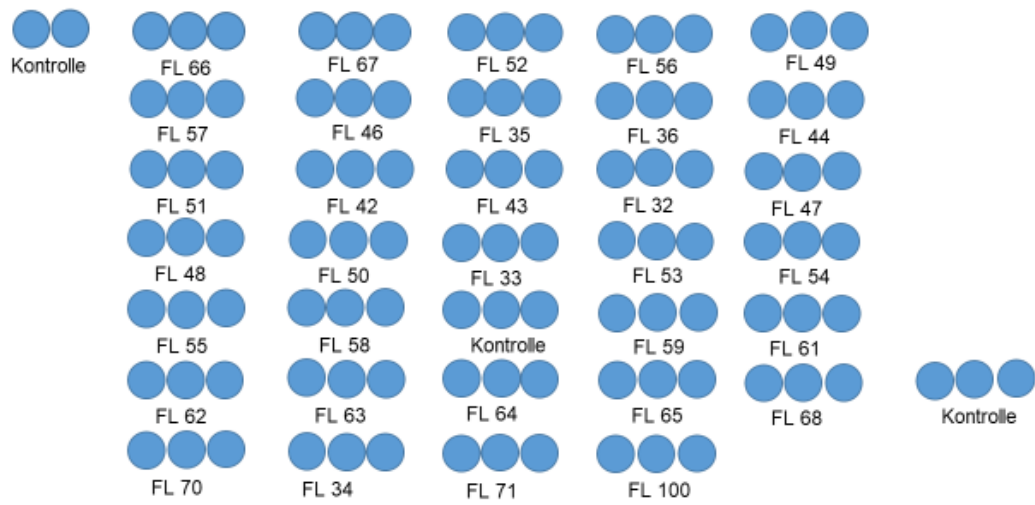


Abbildung S 1: Karte des TMA 2 mit 33 FL Fällen

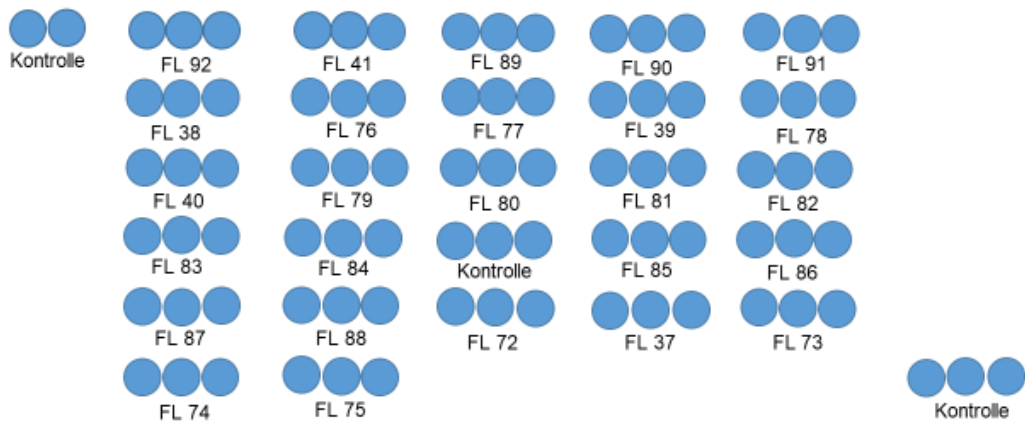


Abbildung S 2: Karte des TMA 3 mit 26 FL Fällen

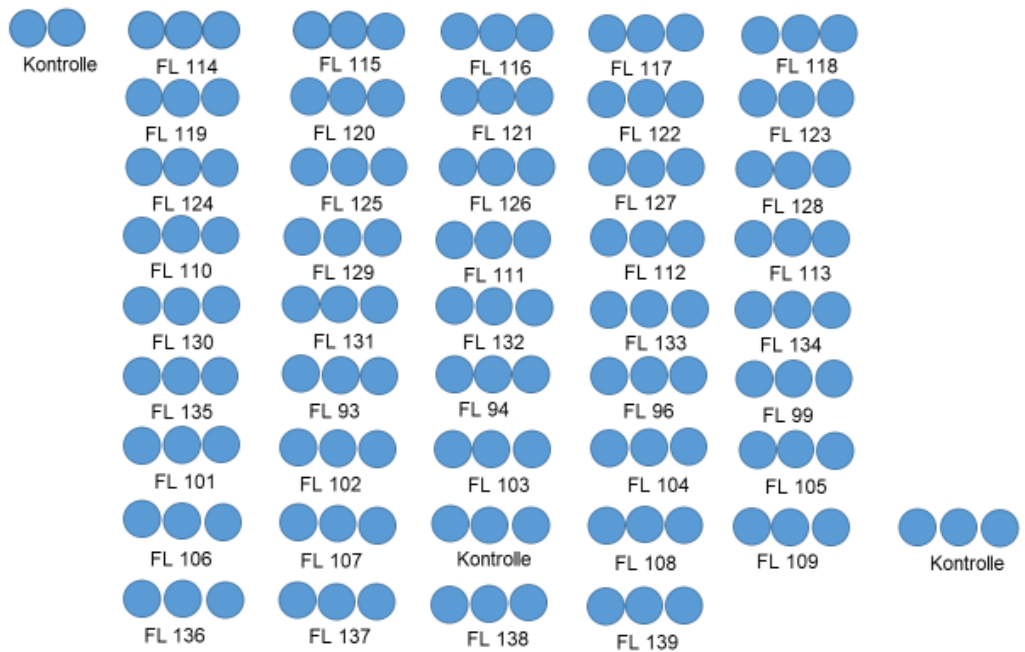


Abbildung S 3: Karte des TMA 4 mit 43 FL Fällen

Lokale Verteilung von Motiven in R-FL t(14;18)-negativ I/II, III/IV und unbekanntem Stadium

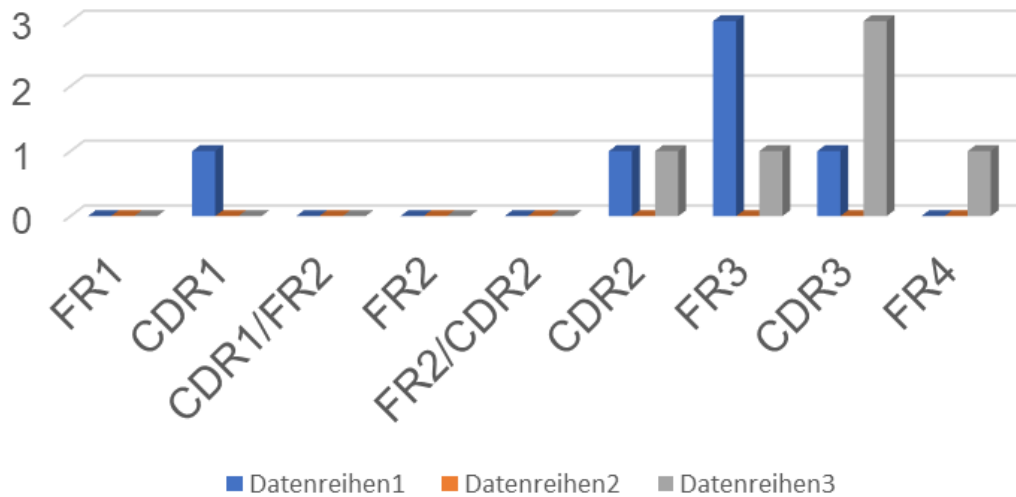


Abbildung S 4: Lokale Verteilung im IGHV (x-Achse) und Anzahl (y-Achse) von neuen potentiellen N-Glykosylierungsmotiven in R-FL t(14;18)-negativ, Datenreihen 1: Stadium I/II, Datenreihen 2: Stadium III/IV, Datenreihen 3: unbekanntes Stadium. R, Rezidiv; I/II, FL im frühen klinischen Stadium, III/IV, FL im fortgeschrittenen klinischen Stadium; CDR, komplementaritäts bestimmende Region; FR, Gerüstregionen („framework region“); R, Rezidiv; Modifiziert nach Leich et al. *Blood Adv* (2021) 5 (23): 4890–4900. © the American Society of Hematology. Eine generelle Erlaubnis von *Blood Advances* liegt vor (siehe Anhang).

Nr	CDR1 (27-38)	FR2 (39-55)	CDR2 (56-65)	FR3 (66-104)	CDR3	FR4
V1-2	G Y T F T G Y Y	M H W V R Q A P G Q G L E W M G R	I N P N S G G T	N Y A Q K Q G R V T M T R D T S I S T A Y M E L S R L R S D D T V V Y Y C	A R	
FL43	G Y S F S D F Y	I Y W V R Q A P G Q G L Q W M G R	I D P Y S G D T	H F A Q R L Q G R V T L T R D A S I N T A Y M E M T S L K S D D T G L Y F C	A R G A S R H G S G C N F T S	W G Q G T L
FL94	G Y N L S D H X	X X X V V H A P G H G L E W M A W	I R P K T D D T	N I S Q R L Q G R L I V R R G S S N N I V Y M Q L S D L T A D D A A S Y F C	A S Q F T N R S H S L L D S	W G Q G T L
V1-8	G Y T F T S Y D	I N W V R Q A T G Q G L E W M G W	M N P N S G N T	G Y A Q K F Q G R V T M T R N T S I S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C	A R G	
FL118	G Y P F S N Y D	I D X X X X X X X X X E W M G W	M K P N S G D T	E L S Q K F Q G R L T L T R N Y S I N M A Y M E L R S L S S E D T A V Y Y C	A R G F I N I T I F G A L I K R P L D P	W G Q G T
V1-18	G Y T F T S Y G	I S W V R Q A P G Q G L E W M G W	I S A Y N G N T	N Y A Q K L Q G R V T M T T D T S T S T A Y M E L R S L R S D D T A V Y Y C	A	
FL 14	G Y P F S N Y D	I T W V R Q A P G Q G L E W M G W	I S V H S G H T	S V A Q K V R G R I T M T T D T S T S T A Y M E L R S L R S D D T A I Y Y C	A R N N S D G H L D S	W G Q G T L
V1-69	G G T F S S Y T	I S W V R Q A P G Q G L E W M G R	I I P I L G I A	N Y A Q K F Q G R V T I T A D K S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C	A	
FL28	G N S F N T Y S	F S W V R Q A P G Q G P E W M G M	V F P G F R L F	T Y A D K F D G R L T L S A N I S T R T A L L E L S N L T S T D T A T Y Y C	A T R Q G L H F I T L L D T T Q Y T S H P L D V	W G Q G T T
FL30	G D T F N E N I	F N C V R Q A P G Q G L E W M	V P L L N S T	A S A Q R S Q D R L T I L A D T S T N I V Y M N L S D L R S D D T A V Y F C	A T H I A D S S S F F F Y S L D V	W G Q G T
FL96	G D T F H S L T	F D X X X X X X Q G L E W M G E	I I P L F G T S	N Y T Q K F Q G R L S I T A D E S T T T I Y M S L N S L R S E D T A I Y Y C	A A K S V G P N R R R P S Y F D F	W G Q G T L
V3-11	G F T F S D Y Y	M S W I R Q A P G K G L E W V S Y	I S S S G S T I	Y Y A D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C	A R	
FL59	G F T F S D Y Y	M N W I R Q A P G K G L E W V S H	I S S S G S V K	N Y T D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L Q M N R L R V D D T A I Y Y C	A R K V S R A A T A D Y	W G Q G T L
FL99	G F I F S D Y D	M N W I R Q A P G K G L E W I S N L T S N T Y T		N Y V D F V K G R F T I S R D N A K K S L Y L Q M N N L R V E D T A V Y F C	A R G A A P R S G D K K T F D S	W G Q G T L
FL 113	G F I F K N Y N M T W I R Q A P G K G L E W I S N I T T T G N T I			S Y A D S V K G R F T I S R D N A K Q S L F L Q M N S L R V A D T A V Y Y C	A R G S G D L I N V H Y Y G M D V	W G R G T T
V3-15	G F T F S N A W	M S W V R Q A P G K G L E W V G R	I K S K T D G G T T	D Y A A P V K G R F T I S R D D S K N T L Y L Q M N S L K T E D T A V Y Y C	T T	
FL15	Q L T F S N A W	V T W V R Q A P G K G L E W V G H	I K S R S D G G T T	D Y A A P V K G R F T I S R D D S E N T L Y L Q M N S L K T D D T A I Y Y C	T T N I S H I V G T A P R D Y	W G Q G T L
V3-21	G F T F S S Y S	M N W V R Q A P G K G L E W V S S	I S S S S S Y I	Y Y A D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C	A	
FL 2	D F I L S X X X	I H W V R Q A P G R G L E W V S S	I G R N A L A Q	Y Y A G S V K G R F T I S R D N A K N S V F L Q L N N L R V Q D T A F Y F C	A Q N S S G M N W S Q G T	
FL13	E F L F G D F S	M T W V R Q A P G G G L E W V S S	I S N H G R Y T	Y Y S K S V K G R F S I S R D N T K N S L F L Q M N N L R I G D T A V Y Y C	A K N Y S R L D S	W G Q G I L
FL136	G F T F T S Y S	M T W V R Q A P G K G L E C V S F	I S P N S S N I	Y Y A D S V K G R F S V S R D N S Q K S L F L Q M S S L R A E D T A V Y Y C	V R A W A N I S D P K V L D S	W G Q G T L
FL131	A F T F S T F S	M N W V R Q A P G K G L E W V S S	I S T T S S Y I	Y Y G D S V R G R F I I S R D N T K N S L Y L Q M N S L T V D D T A I Y Y C	A R N M T R G R S T Y L D S	W G N G T
V3-23	G F T F S S Y A	M S W V R Q A P G K G L E W V S A	I S G S G G S T	Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C	A	
FL27	G F D F K T S S	M T W V R Q A P G K G L E W V S T	I F H T V A R T	H Y A D S V K G R F T V S T D K L R N I M Y L Q M T T L R V D D T A T Y F C	A N A S R S S G A G E W S F P I D P	W S Q G T L
FL101	G F I F S Y Y N	M Y W V R Q A P G K G L E W V S N I S E S G G S T		N Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T M Y L Q L N S L R V E D T A I Y Y C	A K G F L R L G G V E S	W G Q G T L
FL107	G F T F S T N A	M T W V R Q A P G R G L E W V S G	I S G R G E S T	S Y A D S V K G R F T I S R D N T K N T L Y L Q M N S L R I E D T A I Y Y C	A K N I S S S L Y F D R	W G Q G T L

Nr	CDR1 (27-38)	FR2 (39-55)	CDR2 (56-65)	FR3 (66-104)	CDR3	FR4
V3-30	GFTFSSSYG	MHWVRQAPGKGLEWVAV	ISYDGSNK	YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	A	
FL 58	GFTFSSSY <u>NMS</u> WVRQAPGKGLEWVSL		ISDDGRDT	YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNTLRPDDTAVYYC	ASRSRD	WGQGT L
FL 93	GFTFSSSY S <u>MHWVRQAPGRGLEWVSS</u>		ISYDG <u>NNT</u>	DYAAASVKGRVAISRDN SKNTLFLQMS SLRIEDTAVYYC	ARNLKPVTTFELSF DI	WGQGT
V3-48	GFTFSSSY S	MNWVRQAPGKGLEWVSY	ISSSSSTI	YYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYC	AR	
FL 7	GFSFSSYN	MHWVRQAPGKGLEWVA <u>NI</u> SPGFHM		DYGD SVKGRFIISRDN AKNSLFLQMNSLRDEDTAVYYC	ARTNTTHTTFDF	WGQGT L
FL52	GFSFSTYG	MNWVRQAPGKGLEWVS <u>NMS</u> SSGSTV		NYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRDDDTAVYYC	ARVGRSLDGRDYQRPYYFMDV	WGKGT T
FL108	GFSFSTYT	MNWVRQTPGKGLEWLS <u>NI</u> SRGDMK		DYADSVKGRFIISRDN AKNSVYLQMS SLRDDDTALYYC	VTNTGGFDY	WGQGT L
V3-53	GFTVSSNY	MSWVRQAPGKGLEWVSV	IYSGGST	YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	AR	
FL 1	GFRVQIK <u>NMT</u> WIRQFP GKGLEWVSV		AYPDGRS	LCADSVKGRFTVSRDN FKNIVFLQMNRLRVEDTAMYYC	ARGLLEDGNV LDF	WGQG
FL103	GFSVSK <u>NMT</u> WVRQAPAKGLEWVST		VYPSSSQGS S	FYGN SVKGRFIISRDN SKNTLYLQMNSLRVNDTAIYYC	ANGHH <u>NIT</u> S	WGRGT L
FL111	QFDVSVN <u>NMS</u> WVRQAPGKGLEWVSV		IYSGGKP	NYADSVRGRVTISKDN LKNTLYLQMNSLRVEDTAVYYC	ARGFSAMDV	WGQGT T
V3-74	GFTFSSYW	MHWVRQAPGKGLVWVSR	INSDGSS T	SYADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	AR	
FL 3	GFALEKFW	MHWVRQAPGKGLLVVSH	IGVDATHI	TYADYVVRGRFTISRDI VKNTLFLQMNSLRADDTAVYFC	ARTFC <u>NIT</u> SCHNWVDA	WGQGT L
V4-34	GGSFSGYY	WSWIRQPPGKGLEWIGE	INHSGST	NYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLS SVTAADTAVYYC	AR	
FL25	GGSFSGYS	WSWIRQPPEKGLEWIGE	INHSGSS	NYNPSLKS RVTISIDTSKNQLSLNLSVTAADTAIYYC	AR <u>NCT</u> TSTCRSPGAFDI	WGQGT
FL26	GGSLSGY <u>NNT</u> WIRQPPGKGLEWIGN		IDHSGRT	NY <u>NOS</u> LKSR LTM SVDT SKNQFSLKLT SVTAADTAVYYC	ARCSESNEYMDV	WGKGT T
FL29	GGSFSDYY	WTWIRQSPGKGLQWIGQ	ISHYGSV	TY <u>NLS</u> LKSRVTISVDISKNFSLKLSLTAADTARYYC	ARITMPREVIKYYMDV	WGQGT
FL38	GGSSNQYY	WIWIRQPPGKGLEWIGQ	ISHSGST	<u>NYT</u> PSLRTRVTISRDM SKNQFSLTVISLTDADTSVYYC	ATGRQGD LTIHFES	WGQGT L
FL39	GGSFSGSY	WSWIRQPPGKGLEWIGE	INHSEST	NYNPSLKS RVTISVDPSKNQFSL <u>NLS</u> SVTAADTAVYYC	ARRIDYGD LK TPLDY	WGQGT L
V4-39	GGSISSSSYY	GWIRQPPGKGLEWIGS	IYYSGST	YNYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLS SVTAADTAVYYC	AR	
FL 4	GDSITISDFY	GWIRQPPGEGLEWIGS	ISYSGST	YNYNPSLKS RVTMSVDM SKNHFSLRMTSVSAADTAVYYC	ARNGRHS DNN <u>NYS</u> HQFDL	WGQGT L
FL128	GGSISSRY Y	GWIRQPPGKGLEWIGN	IFYSGGA	YNYNPSLKS RVTMSVDT SKNEFSL <u>NLT</u> SVTAADTAIYFC	ARQTTKYSGFWSGYFPLHYSYVAMDV	WGQGT T
V4-59	GGSISSYY	WSWIRQPPGKGLEWIGY	IYYSGST	NYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLS SVTAADTAVYYC	AR	
FL 9	GGSISNN <u>NYT</u> WIRQPPGKLEWIGY		IYS <u>NGS</u> T	NYNPSLKS RLSISL DASKNQFSLRLNSVTAADTAIYYC	ARGTFFWEVGAFDI	WGRGT
FL18	GDSISSDY	WNWIRQPPGKGLEWIGY	IDYSGRT	NY <u>NSS</u> LKSRVTISLDT SKNQFSLRLNSVTAADTAVYFC	ARVPSIVGPRKDWF DL	WGRGT L
V4-61	GGSVSSYY	WSWIRQPPGKGLEWIGY	IYYSGST	NYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLS SVTAADTAVYYC	A	
FL112	GASVGSFY	CSWIRQPPGKGLEWIGN	VYYRGKT	NYNPSLKS RVAISVDASKNQFSLRLNSVTAADTALYYC	AK <u>NNT</u> SSGG LDF	WGQGT L

Abbildung S 5: Aminosäuresequenzen der FL Fälle mit neuem potentiellen N-Glykosylierungsmotiv dem Keimbahngen zugeordnet: neues Motiv: gelb markiert/unterstrichen, natürliches Motive: nur unterstrichen; t(14;18)-positive FL Fälle: schwarze Schrift; t(14;18)-negative FL Fälle: rote Schrift; CDR, komplementaritäts bestimmende Region; FR, Gerüstregionen („framework region“);

Tabelle S 1: Rohdaten der 68 sequenzierten FL Fälle. M, männlich; W, weiblich; PD, Primärdiagnose; R, Rezidiv; I/II, FL im frühen klinischen Stadium, III/IV, FL im späten klinischen Stadium;

FL Nr.	Geschlecht	Alter	Datum Diagnose	Zeitpunkt Tod/ Progress/ Zuletzt gesehen	Tod/ Progress	Status bei Biopsie 0=PD-FL 1= R-FL	Klinisches Stadium 0 = I/II 1 = III/IV	t(14;18)-Status 0=negativ 1=positiv	BCL2-Bruchpunkt 0=negativ 1=positiv	BCL2-Expression DAKO+E17 1=positiv 0=negativ	Sequenzier Strategie
2	M	58.55	15.03.2011	48,13	0	0	0	1	1	1	FR, <u>IGHV</u>
3	M	65.48	15.10.2005	58,16	0	0	0	1	1	1	<u>FR</u>
4	M	67.05	12.10.2006	31,07	1	0	0	1	1	1	<u>FR</u>
6	W	64.46	20.04.2010	3,32	1	0	0	1	1	1	<u>FR</u> , <u>FR2</u> , <u>FR3</u>
7	W	51.85	14.07.2010	36,62	0	0	0	1	1	1	<u>FR</u>
9	W	68.34	15.07.2013	19,13	0	0	0	1	1	1	<u>FR</u>
12						0	0	1	1	1	<u>FR</u> , <u>FR2</u> , <u>FR3</u> , <u>IGHV</u>
13						1	0	1	1	1	<u>FR</u>
14						1	0	1	1	1	<u>FR</u>
15						1	0	1	1	1	<u>FR</u>
17						0	0	1	1	1	<u>FR</u> , <u>IGHV</u>
18	/	/	12.12.2007			0	0	0	0	1	<u>FR</u>
22	W	65.1	19.12.2008	72,85	0	0	0	0	0	1	<u>FR</u> , <u>FR2</u> , <u>FR3</u> , <u>IGHV</u>
24	W	73.27	27.08.2013	14,93	0	0	0	0	0	1	<u>FR</u> , <u>IGHV</u>
25						0	0	0	0	1	<u>FR</u>
26						0	0	0	0	1	<u>FR</u>
27						0	0	0	0	1	<u>FR</u>
28						0	0	0	0	0	<u>FR</u> , <u>IGHV</u>
29						0	0	0	0	1	<u>FR</u>

30						0	0	0	0	1	FR, <u>FR2</u> , FR3, IGHV
31						0	0	/	0		<u>FR</u>
32	M	67.5	15.10.2010	14,83	1	0	1	0	0	1	<u>FR</u>
33	M	43.46	15.02.2014	4,21	0	0	1	0	0	1	<u>FR</u>
35			15.06.2007			0	1	0	0	1	<u>FR</u>
36	W	64.74	17.08.2007	81,01	0	0	1	0	0	1	<u>FR</u>
37	M	65.68	11.08.2010	17,06	1	0	1	0	0	1	<u>FR</u>
38						0	1	0	0	1	<u>FR</u>
39						0	1	0	0	1	<u>FR</u>
40						0	1	0	0	0	<u>FR</u>
43	M	42.39	17.09.2010	50,14	0	0	1	1	1	1	<u>FR</u>
44			15.04.2008			0	1	1	1	1	<u>FR</u>
50	W	63.84	25.01.2013	22,52	0	0	1	1	1	1	FR, <u>FR2</u> , FR3, IGHV
52	M	56.92	15.04.2006	100,5	0	0	1	1	1	1	<u>FR</u>
56	W	63.6	15.08.2007	51,81	0	0	1	1	1	1	FR, <u>FR2</u> , FR3, IGHV
58	M	59.74	13.06.2008	37,48	0	0	1	1	1	1	<u>FR</u>
59	W	82.78	15.11.2008	74,7	0	0	1	1	1	1	<u>FR</u>
68			10.08.2012			0	1	1	1	1	<u>FR</u> , <u>FR2</u> , FR3, IGHV
72	w	68.47	28.08.2006	16,6	1	0	1	1	1	1	<u>FR</u>
93	M	63.07	10.02.2005	115,73	1	1	0	0	0	1	<u>FR</u>
94	W	61.46	15.03.2009	25,61	1	1	0	0	0	1	FR, IGHV
95	W	47.25	25.06.2007	74,6	1	1	0	0	0	1	FR
96	M	38.31	15.03.2007	56,09	1	1	0	0	0	1	<u>FR2</u> , FR3, IGHV

99			15.01.2004			1	1	1	1	1	FR
100	M	71.69	15.07.2010	29,19	1	1	1	0	0	1	FR2, FR3, IGHV
101	W	56.85	15.11.2005	62,93	1	1	1	1	1	1	FR
103	M	53.48	18.01.2007	11,9	1	1	1	1	1	1	FR
104	M	59.73	15.01.2006	33,01	1	1	1	1	1	1	FR
106	W	78.72	15.07.2009	22,13	1	1	1	1	1	1	FR
107	W	36.39	15.04.2005	39,02	1	1	1	1	1	1	FR
108	M	53.14	15.01.2007	25,38	1	1	1	1	1	1	FR
111	M	60.98	15.05.2000	1,91	1	1	0	1	1	1	FR, IGHV
112	W	49.88	15.10.2002	33,01	1	1	1	1	1	1	FR
113						1		1	1	1	FR
114						1		0	0	0	FR, IGHV
118						1		0	0	1	FR, IGHV
122	M	55.26	15.09.2001	51,02	1	1	0	1	1	0	FR, IGHV
128						1		0	0	1	FR
131											FR, FR2, FR3, IGHV
135						1	1	0	0	1	FR
136	M	40.01	15.04.2011	27,25	1	1		0	0	1	FR
1	M	51.05	15.10.2008			0	0	/	1		FR
5	M	59.99	16.07.2009			0	0	1	1	1	FR, FR2, FR3, IGHV
11						0	0	1	1	1	FR, FR2, FR3, IGHV
16						0	0	1	1	1	FR, FR2, FR3, IGHV
21	W	42.19	04.12.2006			0	0	0	0	1	FR, FR2, FR3, IGHV

23	M	50.61	15.07.2012			0	0	0	0	1	FR, FR2, FR3, IGHV
41						0	1	0	0	0	FR, FR2, FR3, IGHV
105	M	39.87	15.02.2007			1	1	1	1	1	FR, IGHV

FL Nr.	Kommentar	Exklusion 0=nein, 1=ja	Klonal 0=nein, 1=ja	SHM (%)	Klonale Frequenz (%)	VH-Gen Nutzung	VH4-34	Anzahl an neuen Motiven	Motiv	Natürliches Motiv 0=nein, 1=ja	Verlust des natürlichen Motivs	Region des neuen Motivs
1		0	1	21,76	1	65	`3-53	0	1	NMT	0	CDR1/FR2
2		0	1	19,3	1	69	`3-21	0	2	NSS, NWS	0	CDR3; CDR3/FR4
3		0	1	21,46	1	55	`3-74	0	1	NIT	0	CDR3
4		0	1	12,39	0	28	`4-39	0	1	NYS	0	CDR3
5	polyklonal	1	0									/
6		0	1	19,35	1	6	`1-3	0	0		0	0
7		0	1	12,79	1	97	`3-48	0	2	NIS, NTT	0	FR2/CDR2; CDR3
9		0	1	15	1	67	`4-59	0	2	NYT, NGS	0	CDR1/FR2; CDR2
11	polyklonal	1	0									/
12		0	1	10,91	0	31,4	`3-74	0	0		0	0
13		0	1	19,63	1	40,27	`3-21	0	1	NYS	0	CDR3
14		0	1	11,93	0	43	`1-18	0	1	NNS	0	CDR3
15		0	1	8,89	0	89	`3-15	0	1	NIS	0	CDR3
16	polyklonal	1	0									/
17		0	1	25,22	1	86	`4-39	0	0		1	0
18		0	1	6,95	0	74	`4-59	0	1	NSS	0	FR3

21	polyklonal	1	0									/
22		0	1	8,29	0	5,2	`3-20	0	0		0	0
23	polyklonal	1	0									/
24		0	1	13,78	1	94	`4-4	0	0		0	0
25		0	1	7,91	0	12	`4-34	1	1	NCT	0	CDR3
26		0	1	8,64	0	99	`4-34	1	2	NWT, NQS	1 (CDR2: NHS)	CDR1/FR2, FR3
27		0	1	22,83	1	73	`3-23	0	1	NAS	0	CDR3
28		0	1	38,3	1	21	`1-69	0	2	NIS, NLT	0	FR3, FR3
29		0	1	13,99	1	92	`4-34	1	1	NLS	1 (CDR2: NHS)	FR3
30		0	1	27,67	1	17,9	`1-69	0	2	NST, NLS	0	CDR2; FR3
31		0	1	3,65	0	33	`3-7	0	0		0	0
32		0	1	15,45	1	87	`4-59	0	0		0	
33		0	1	5,48	0	95	`3-48	0	0		0	
35		0	1	19,28	1	79	`4-4	0	0		0	
36		0	1	4,13	0	100	`1-2	0	0		0	
37		0	1	7,73	0	38	`4-34	1	0		0	
38		0	1	15,45	1	97	`4-34	1	1	NYT	1 (CDR2: NHS)	FR3
39		0	1	3,64	0	95	`4-34	1	1	NLS	0	FR3
40		0	1	1,84	0	61	`1-18	0	0		0	
41	polyklonal	1	0									
43		0	1	17,89	1	22	`1-2	0	1	NFT	0	CDR3
44		0	1	13,7	1	91	`3-30	0	0		0	
50		0	1	20,5	1	6.8	3- 49*02	0	0		0	0
52		0	1	7,76	0	80	`3-48	0	1	NMS	0	FR2/CDR2
56	Exkludiert, nur Klon mit sehr	1	1	10,69	0		`4-59	0	0		0	

	geringem Prozentsatz											
58		0	1	9,13	0	100	`3-30	0	1	NMS	0	CDR1/FR2
59		0	1	7,76	0	98	`3-11	0	1	NYT	0	FR3
68		0	1	4,55	0	14	`4-34	1	0		0	
72		0	1	12,27	0	91	`4-34	1	0		1 (CDR2: NHS)	
93		0	1	10,96	0	29,2	`3-30	0	1	NNT	0	CDR2
94		0	1	23,96	1	45	`1-2	0	4	NLS, NIS, NNT, NRS	0	CDR1, FR3, FR3, CDR3
95		0	1	12,22	0	63,9	`4-59	0	0		0	/
96		0	1	13,89	1	90,6	`1-69	0	1	NYT	0	FR3
99		0	1	12,96	1	42,4	`3-11	0	1	NLT	0	FR2/CDR2
100		0	1	7,64	0	92	`1-3	0	0		0	/
101		0	1	19,18	1	81,93	`3-23	0	1	NIS	0	FR2/CDR2
103		0	1	17,13	1	92,85	`3-53	0	2	NMT, NIT	0	CDR1/FR2; CDR3
104		0	1	16,06	1	99,2	`3-11	0	0		0	/
105	Nur Klone mit Stopp Codon oder „out of frame“, keine produktiven Klone	1	0									/
106		0	1	11,93	0	16,01	`7-4-1	0	0		0	/
107		0	1	8,32	0	77,75	`3-23	0	1	NIS	0	CDR3
108		0	1	13,7	1	79,33	`3-48	0	1	NIS	0	FR2/CDR2
111		0	1	11,23	0	17,07	`3-53	0	1	NMS	0	CDR1/FR2
112			1	14,09	1	82,24	`4-61	0	1	NNT	0	CDR3
113		0	1	12,79	1	86,11	`3-11	0	2	NMT, NIT	0	CDR1/FR2; FR2/CDR2

114		0	1	11,87	0	84,13	`3-23	0	0		0	/
118		0	1	12,5	0	79,15	`1-8	0	1	NIT	0	CDR3
122		0	1	13,24	1	61,01	`3-21	0	0		0	/
128		0	1	12,63	1	27,72	`4-39	0	1	NLT	0	FR3
131		0	1	11,42	0	19,5	`3-21	0	2	NMT, NGT	0	CDR3; FR4
135		0	1	11,42	0	79,71	`3-23	0	0		0	/
136		0	1	11,67	0	36,44	`3-21	0	2	NSS, NIS	0	CDR2; CDR3

