Universitätsklinikum Ulm
Klinik für Innere Medizin III
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Hartmut Döhner

Prognostische und prädiktive Bedeutung von Mutationen der nicht-codierenden 3‘ Region im *NOTCH1* Gen bei der CLL: Eine Untersuchung im Rahmen der CLL11 Studie der Deutschen CLL Studiengruppe

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der
Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Verfasst von Martin Geppert
Geboren in Tübingen
2021

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Stephan Stilgenbauer
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Holger Barth

Tag der Promotion: 12.01.2023

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis III

1 Einleitung 1

1.1 Die chronische lymphatische Leukämie 1

1.1.1 Klinik und Diagnostik 1

1.1.2 Stadieneinteilung 2

1.1.3 Therapie 3

1.2 Prognostische und prädiktive Marker 8

1.2.1 Genomische Aberrationen und *TP53* Mutation 8

1.2.2 IGHV-Status 10

1.2.3 Internationaler CLL-Prognoseindex 10

1.3 Rekurrente Mutationen 11

1.3.1 *NOTCH1* 12

1.3.2 *NOTCH1 3'-UTR* 15

1.4 Zielsetzung 16

2 Material und Methoden 18

2.1 Patientenkollektiv: CLL11 Studie 18

2.2 Verwendete Materialien 20

2.3 Probengewinnung 23

2.4 Isolierung der DNA 23

2.5 Sanger-Sequenzierung 24

2.5.1 PCR: Polymerase-Kettenreaktion 25

2.5.2 Agarose-Gelelektrophorese 26

2.5.3 Aufreinigung der PCR-Produkte 27

2.5.4 Sequenzreaktion 28

2.5.5 Aufreinigung der Sequenzreaktions-Produkte 29

2.5.6 Sequenzierung 29

2.6 Statistische Methoden 30

3 Ergebnisse 32

3.1 *NOTCH1 3'-UTR* Mutation 32

3.1.1 Klinische und genetische Marker 34

3.1.2 Therapieansprechen und molekulare Remission 36

3.1.3 Progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben 39
3.1.4 Progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben in den Therapiearmen 42
3.1.5 Klonale Evolution 44
3.2 *NOTCH1 3'-UTR* Mutation und die codierende *NOTCH1* Mutation 45
3.2.1 Nicht-exklusives Auftreten 46
3.2.2 Progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben 47
4 Diskussion 51
4.1 Einführung 51
4.2 Wahl der Studienkohorte 51
4.3 *NOTCH1 3'-UTR* Mutation 53
4.3.1 Klinische und genetische Marker 56
4.3.2 Prognostische Bedeutung 59
4.3.3 Prädiktive Bedeutung 60
4.4 Ausblick 63
5 Zusammenfassung 65
6 Literaturverzeichnis 67
Danksagung 83
Lebenslauf 84

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ATM	*Ataxia Telangiectasia Mutated gene*
BAX	engl. *BCL-2 associated X protein*
BCL-2	engl. *B-cell lymphoma 2*
bp	Basenpaar
BR	Bendamustin-Rituximab
BTKi	Bruton-Tyrosinkinaseinhibitor
C	Cytosin
CD	engl. *Cluster of Differentiation*
Chr	Chromosom
CIRS	engl. *Total Cumulative Illness Rating Scale*
Clb	Chlorambucil
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CLL-IPI	Internationaler CLL-Prognoseindex
cod	codierend
DCLLSG	Deutsche CLL Studiengruppe
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
Del	Deletion
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E	Ereignis
ECOG	engl. *Eastern Cooperative Oncology Group*
Fa	Firma
FC	Fludarabin-Cyclophosphamid
FCR	Fludarabin-Cyclophosphamid-Rituximab
G	Guanin
G, GA101	Obinutuzumab
G-Clb	Obinutuzumab-Chlorambucil
GSI	γ-Secretase-Inhibitor
Hb	Hämoglobin
HR	Hazard Ratio
i. v.	intravenös
IGHV	Variable Regionen der Immunglobulinschwerketten

iwCLL	engl. *International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia*
JÜ	Jahresüberleben
KG	Körpergewicht
LRF	engl. *Leukemia Research Fund*
MRD	Minimale Resterkrankung
mut	mutiert
n	Patientenzahl
NaOH	Natriumhydroxid
NICD	engl. *NOTCH1 intracellular domain*
NOTCH1	*NOTCH Rezeptor 1*
p	p-Wert
p. o.	per os
Pat	Patient
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEST	Prolin-Glutamat-Serin-Threonin
R	Rituximab
RBPJ	engl. *Recombination Signal Binding Protein for Immunoglobulin Kappa J Region*
R-Clb	Rituximab-Chlorambucil
RPS15	*Ribosomal Protein S15 gene*
SF3B1	*Splicing Factor 3B Subunit 1 gene*
T	Thymin
T-ALL	T-Zell akute lymphatische Leukämie
TP53	*Tumor protein 53 gene*
VAF	engl. *Variant Allele Frequency*
vs.	versus
WHO	engl. *World Health Organization*
wt	Wildtyp
3'-UTR	3'-untranslatierte Region

1 Einleitung

1.1 Die chronische lymphatische Leukämie

Mit einer prognostizierten Inzidenz von mehr als 21000 Fällen in den USA im Jahr 2020 bleibt die chronische lymphatische Leukämie (CLL) die häufigste Leukämie der westlichen Hemisphäre. Charakteristischerweise tritt die CLL vermehrt beim männlichen Geschlecht auf (Siegel et al. 2020). Mit einem Median von 72 Jahren ist die CLL eine Erkrankung des höheren Lebensalters (Goldin et al. 2004). Demnach ist aufgrund des demographischen Wandels eine steigende Prävalenz der CLL und eine dadurch bedingte erhöhte Mortalität zu erwarten (Dores et al. 2007). Gleichwohl liegt das Erkrankungsalter bei 20 % der Patienten unter 55 Lebensjahren. Die CLL scheint sich in dieser Altersgruppe im Vergleich zu einem höheren Erkrankungsalter nachteilig auf das Gesamtüberleben auszuwirken (Mauro et al. 1999).

1.1.1 Klinik und Diagnostik

Die World Health Organization (WHO) klassifiziert die CLL als niedrigmalignes, leukämisches Non-Hodgkin-Lymphom. Der klinische Verlauf der CLL ist heterogen. Während der größere Teil der Patienten über einen langen Zeitraum klinisch asymptomatisch bleibt, kommt es bei einem Teil der Patienten zu einem schnellen Progress und einem damit verbundenen verkürzten Überleben (Hallek 2019). Bei den meisten Patienten wird eine Lymphozytose als Zufallsbefund festgestellt, zudem besteht häufig eine Lymphadenopathie, eine Hepatosplenomegalie und eine Anämie oder eine Thrombozytopenie aufgrund einer Knochenmarksinsuffizienz. Auch zeigt sich ein gehäuftes Auftreten von rekurrenten Infektionen und Autoimmunphänomenen wie einer hämolytischen Anämie (Zenz et al. 2010).

Die Diagnose einer CLL wird nach den Leitlinien des International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (iwCLL) durch ein Differentialblutbild, einen Blutausstrich und eine Immunphänotypisierung gestellt. Im Differentialblutbild ist der Nachweis einer B-Lymphozyten-Zahl über 5 x 10^9 /l über einen Zeitraum von mindestens drei Monaten gefordert. Im Blutausstrich lässt sich eine absolute Lymphozytose darstellen, die aus einer erhöhten Anzahl von kleinen, reifzelligen

Lymphozyten besteht. Charakteristisch, jedoch nicht beweisend, ist das Auftreten von Gumprecht-Kernschatten (Hallek et al. 2018). In der Immunphänotypisierung exprimieren die CLL-typischen B-Lymphozyten - neben der obligaten Leichtkettenrestriktion vom κ- oder λ-Typ - aberrant das T-Zell-Oberflächenantigen Cluster of Differentation (CD) 5 zusammen mit den B-Zell typischen CD19, CD20 und CD23 (Hallek 2019).

1.1.2 Stadieneinteilung

Zur Abbildung der heterogenen Krankheitsverläufe der CLL haben sich die Stadieneinteilungen nach Binet und Rai etabliert. In der Stadieneinteilung nach Binet wird je nach Anzahl der befallenen Lymphknotenregionen und dem Vorliegen einer Anämie oder Thrombozytopenie zwischen drei verschiedenen Risikogruppen unterschieden. Im Stadium A sind maximal zwei Lymphknotenregionen vergrößert, wohingegen im Stadium B drei oder mehr Lymphknotenregionen betroffen sind. Das Stadium C liegt unabhängig von der Zahl der Lymphknotenregionen bei einem Hb-Wert von unter 10 g/dl oder einer Thrombozytenzahl von unter 100000 /µl vor (Binet et al. 1981).

Die Stadieneinteilung nach Rai basiert auf der fortschreitenden Akkumulation von B-CLL-Zellen in den unterschiedlichen Organsystemen im Krankheitsverlauf und differenziert zwischen fünf verschiedenen Stadien (Rai et al. 1975). Die modifizierte Einteilung nach Rai trägt der Erkenntnis Rechnung, dass die Lebenserwartung im Stadium I und II sowie im Stadium III und IV annähernd gleich hoch ist und unterscheidet daher nur noch zwischen drei verschiedenen Stadien (Rai 1987).

Tabelle 1: Klassische und modifizierte Stadieneinteilung der chronischen lymphatischen Leukämie nach Rai (Rai et al. 1975, Rai 1987)

Klassisches Stadium	Befund	Modifiziertes Stadium
0	Lymphozytose (> 5 x 10^9 /l)	Niedrige Risikogruppe
I	+ Lymphadenopathie	Mittlere Risikogruppe
II	+ Hepato- und / oder Splenomegalie	
III	+ Anämie (Hämoglobin < 11 g/dl)	Hohe Risikogruppe
IV	+ Thrombozytenzahl (< 100.000 /µl)	

Sowohl das klinische Stadium nach Binet als auch die modifizierte Einteilung nach Rai korreliert mit der medianen Lebenserwartung der Patienten. Während diese in der niedrigen Risikogruppe der Lebenserwartung der Normalbevölkerung entspricht, verkürzt sich die mediane Lebenserwartung in der mittleren Risikogruppe auf sieben Jahre und in der hohen Risikogruppe auf zwei Jahre (Binet et al. 1981, Rai et al. 2004).

1.1.3 Therapie

Nahezu 70 % der Patienten mit einer CLL befinden sich bei der Diagnosestellung in einem Frühstadium der Erkrankung und zeigen daher keine Symptome. Bei diesen asymptomatischen Patienten ist bei der CLL im Gegensatz zu anderen Leukämieformen keine Therapie angezeigt. Das Vorgehen der Wahl ist eine „Watch and Wait"-Strategie, die regelmäßige Kontrolluntersuchungen beinhaltet (Pepper et al. 2012). Bisher konnte für keine Risikogruppe der CLL ein Vorteil einer frühen Behandlung bei asymptomatischen Patienten nachgewiesen werden (Hoechstetter et al. 2017).

Eine Therapie wird im Binet-Stadium C und bei aktiver Erkrankung auch im Stadium B oder A eingeleitet. Eine aktive Erkrankung ist nach den iwCLL-Leitlinien 2018 definiert durch das Auftreten einer

- Anämie (Hb < 10 g/dl) oder Thrombozytopenie (< 100000 /µl),
- Lymphozytenverdopplungszeit von unter sechs Monaten oder einer Erhöhung der Lymphozytenzahl um 50 % innerhalb von zwei Monaten,
- steroidrefraktären autoimmunhämolytischen Anämie oder Thrombozytopenie,
- progredienten oder symptomatischen Splenomegalie,
- dynamischen oder über 10 cm großen Lymphknotenvergrößerung,
- B-Symptomatik (Hallek et al. 2018).

Besteht eine Therapieindikation, so werden zur Planung der Behandlung unterschiedliche Kriterien erhoben. Dabei stellt für die Auswahl des therapeutischen Regimes heutzutage - neben patientenspezifischen Charakteristika - die Genetik der CLL das wichtigste Kriterium dar. Analysiert wird hierbei der Mutationsstatus

variabler Regionen der Immunglobulinschwerketten (IGHV), das Vorliegen einer 17p Deletion und / oder einer *TP53* Mutation.
Es gilt zu berücksichtigen, dass die Behandlung von CLL-Patienten in den letzten sechs Jahren große Veränderungen erfahren hat. Mehrere neue oral verfügbare Substanzen wurden zugelassen, die zwischenzeitlich die Immunchemotherapie weitgehend verdrängt haben. Daher treten die früher bedeutsamen Unterscheidungskriterien, wie die Fitness und das Patientenalter, zunehmend in den Hintergrund und müssen im Gesamtkontext der Therapie mit weiteren patientenbezogenen Faktoren gesehen werden, beispielsweise der jeweiligen Komedikation und der Patientenpräferenz (Eichhorst et al. 2021).
Bei der Fitness der Patienten wird nach wie vor zwischen den Kategorien fit, unfit und gebrechlich unterschieden. Als fit gilt ein Patient mit einer normalen Nierenfunktion und weniger als sechs Punkten auf der Total Cumulative Illness Rating Scale (CIRS). Diese quantifiziert anhand der Abfrage verschiedener Organsysteme die kumulative Krankheitslast des Patienten. Als unfit gilt ein Patient, der auf der CIRS mehr als sechs Punkte erreicht oder eine eingeschränkte Nierenfunktion mit einer Kreatininclearance zwischen 30 ml/min und 50 ml/min besitzt. Ein als gebrechlich kategorisierter Patient kann aufgrund seines erheblich eingeschränkten Allgemeinzustandes nur unterstützend therapiert werden (Stilgenbauer 2015).

Für Patienten mit einem mutierten IGHV-Status, einem fitten Allgemeinzustand und speziell einem (biologischen) Alter unter 65 Jahren kann aufgrund der Ergebnisse der CLL8 Studie weiterhin eine Immunchemotherapie mit Fludarabin, Cyclophosphamid und Rituximab (FCR) erwogen werden. In dieser Subgruppe kann ein Überlebensvorteil erreicht werden (Fischer et al. 2016). In der E1912 Studie wurde das FCR-Schema der Kombinationstherapie mit Ibrutinib, einem Inhibitor der Bruton-Tyrosinkinase (BTKi), und dem CD20-Antikörper Rituximab gegenübergestellt. Die Kombinationstherapie war in den analysierten Subgruppen vor allem in der Patientengruppe mit einem unmutierten IGHV-Status überlegen. Folglich sollte die Behandlung bei Patienten mit einem unmutierten IGHV-Status mit einer modernen Substanz wie Ibrutinib erfolgen (Shanafelt et al. 2018).
Bei fitten Patienten mit einem (biologischen) Alter von über 65 Jahren wurde in der Vergangenheit die Therapie mit Bendamustin und Rituximab (BR) dem FCR-

Schema aufgrund der geringeren toxischen Begleiterscheinungen vorgezogen (Eichhorst et al. 2016). Die ALLIANCE Studie, die BR mit Ibrutinib mit oder ohne Rituximab verglich, kam zu dem Ergebnis, dass die Interventionsarme gegenüber dem Standard aus BR das progressionsfreie Überleben verlängerten. Allerdings wurde durch die Hinzunahme von Rituximab zu Ibrutinib kein weiterer Vorteil erzielt, sodass heutzutage eine Monotherapie mit dem BTKi bei fitten Patienten über 65 Jahren empfohlen wird (Woyach et al. 2018).

Bedingt durch das Erkrankungsalter der CLL-Patienten fällt ein großer Teil der Patienten in die Kategorie unfit. Diese Patientengruppe wurde lange Zeit standardmäßig mit Chlorambucil oder alternativ mit Bendamustin behandelt (Eichhorst et al. 2009, Knauf et al. 2009). Die damalige Erstlinientherapie bei unfitten Patienten mit Chlorambucil wurde in der CLL11 Studie mit der Kombination von Chlorambucil (Clb) entweder mit Rituximab (R) oder Obinutuzumab (GA101, G) verglichen (Goede et al. 2015). Da sich die letztere Kombination mit einem verbesserten Gesamtüberleben als überlegen erwiesen hatte, diente sie über mehrere Jahre hinweg als Standard für dieses Patientenkollektiv. Zudem wurde sie als Standard für die CLL14 Studie gegen Obinutuzumab und Venetoclax, einem Inhibitor des anti-apoptotischen Proteins B-cell lymphoma 2 (BCL-2), herangezogen, wie auch für die iLLUMINATE Studie gegen Ibrutinib und Obinutuzumab (Fischer et al. 2019, Moreno et al. 2019). In der CLL14 Studie wurde die Therapie mit Obinutuzumab und Venetoclax auf einen Zeitraum von zwölf Zyklen begrenzt. Dieser zeitlich limitierte und Chemotherapie-freie Ansatz war der Kombination aus Obinutuzumab und Chlorambucil in Bezug auf das progressionsfreie Überleben sowohl bei einem mutierten als auch bei einem unmutierten IGHV-Status überlegen, sodass in der Gruppe der unfitten Patienten bei Favorisierung einer zeitlich begrenzten Therapie Venetoclax Chlorambucil als Partner von Obinutuzumab weitgehend abgelöst hat (Fischer et al. 2019).
Ebenso wurde der BTKi Ibrutinib in der RESONATE-2 Studie als Therapieoption in der unfitten Patientengruppe der CLL etabliert, da ein signifikanter Überlebensvorteil gegenüber der damaligen Erstlinientherapie mit Chlorambucil gezeigt werden konnte (Burger et al. 2015). Kürzlich wurde in der iLLUMINATE Studie Ibrutinib mit Obinutuzumab kombiniert und mit Chlorambucil und Obinutuzumab verglichen. Im Ergebnis führten Ibrutinib und Obinutuzumab zu einer

Verlängerung des progressionsfreien Überlebens. Allerdings war der Vorteil einer Hinzunahme von Obinutuzumab zu Ibrutinib aufgrund des Fehlens eines Therapiearms mit einer Monotherapie mit Ibrutinib nicht zu beurteilen (Moreno et al. 2019).

Neben dem IGHV-Status wird bei der Therapieplanung eine vorliegende 17p Deletion und / oder eine *TP53* Mutation berücksichtigt, die mit einer besonders ungünstigen Prognose und einer geringeren Ansprechrate auf die herkömmliche Immunchemotherapie assoziiert ist (Stilgenbauer et al. 2014). Bei Vorliegen dieser Veränderungen wird keine Chemotherapie empfohlen und damit die Indikation für Ibrutinib oder Venetoclax und Obinutuzumab gestellt. Bei Refraktärität gegenüber den genannten Substanzen kann auch der Einsatz des Phosphoinositid-3-Kinaseinhibitors Idelalisib und Rituximab erfolgen (Hallek 2019). Die einzig kurative Behandlungsmöglichkeit der CLL ist nach aktuellem Kenntnisstand weiterhin die Durchführung einer allogenen Stammzelltransplantation (Dreger et al. 2007). Diese wird jedoch aufgrund der neuen Therapiemöglichkeiten und des hohen Morbiditäts- und Mortalitätsrisikos auch in der Hochrisikogruppe der Patienten mit einer 17p Deletion und / oder einer *TP53* Mutation zunehmend zurückhaltend eingesetzt. Eine allogene Stammzelltransplantation kann jedoch insbesondere bei Patienten unter 70 Jahren, bei einem niedrigen Transplantationsrisiko, einem Therapieversagen der neuen Substanzen und bei Auftreten einer Richter-Transformation erwogen werden (Dreger et al. 2018).

Da die CLL11 Studie die Studienpopulation dieser Dissertation darstellt, wird im Folgenden näher auf die Medikamente der Therapiearme eingegangen. Dazu gehören das Chemotherapeutikum Chlorambucil, der Typ-I-CD20-Antikörper Rituximab und der Typ-II-CD20-Antikörper Obinutuzumab.
Chlorambucil als klassisches Chemotherapeutikum gehört zur Gruppe der Alkylanzien. Es entfaltet seine zytotoxische Wirkung über die Quervernetzung und Bildung kovalenter Bindungen zwischen den DNA-Basen und über eine direkte Induktion von Apoptose (Begleiter et al. 1996). Bedingt durch die Vorteile der geringen Toxizität, der Möglichkeit einer oralen Einnahme und der niedrigen Therapiekosten wurde Chlorambucil über viele Jahrzehnte in der Erstlinientherapie der CLL eingesetzt (CLL Trialists' CollaborativeGroup 1999). Aufgrund der

Nachteile einer geringen Remissionsrate, der Nebenwirkungen (Zytopenien, Myelodysplasien, sekundäre Leukämien) und vor allem infolge der neuen, zielgerichteten Therapieoptionen wird Chlorambucil nur noch selten eingesetzt (Hallek 2019).

Rituximab als chimärer, monoklonaler Antikörper richtet sich gegen das CD20-Antigen, das auf fast allen B-Zellen exprimiert wird. Die biologische Funktion von CD20 ist nicht abschließend geklärt, wobei generell eine T-Zell-unabhängige Immunantwort der B-Zelle initiiert wird (Cragg et al. 2005). Je nach Bindungsverhalten an die Epitope von CD20 werden Antikörper wie Rituximab und Obinutuzumab in zwei verschiedene Typen mit teils unterschiedlichen Wirkweisen unterteilt. Rituximab gehört zu den Typ-I-CD20-Antikörpern und führt vor allem über eine Aktivierung des Komplementsystems und eine antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizität zu einer Depletion der B-Zellen (Cragg et al. 2003). Als Bestandteil des FCR-Schemas verlängerte Rituximab als erstes Medikament in der Therapie der CLL das Gesamtüberleben der Patienten (Hallek et al. 2009). Die Etablierung von Rituximab in der Therapie der CLL und die damit einhergehende Umstellung von Chemotherapie auf Immunchemotherapie markierte den Einstieg in eine zielgerichtete Therapie der Erkrankung (Hallek et al. 2010).

Obinutuzumab gehört aufgrund der Bindung an ein anderes Epitop zu den Typ-II-CD20-Antikörpern und stellt eine Weiterentwicklung der CD20-Antikörper dar. Durch die Humanisierung des murinen CD20-Antikörpers B-LY1 und ein Glykoengineering der Fc-Region des Antikörpers konnte im Vergleich zu Rituximab eine erhöhte direkte und antikörperabhängige, zellvermittelte Depletion der B-Zellen erreicht werden (Mössner et al. 2010). In der CLL11 Studie zeigte sich die Therapie mit Obinutuzumab und Chlorambucil gegenüber Rituximab und Chlorambucil als überlegen, da sie das progressionsfreie Überleben der Patienten nahezu verdoppelte und die Ansprechrate erhöhte. Unter der Kombination von Obinutuzumab und Chlorambucil kam es zu mehr Infusions-assoziierten Reaktionen und Neutropenien, jedoch zu keiner erhöhten Infektionsrate der Patienten. Damit wurde Obinutuzumab und Chlorambucil als damalige Standardtherapie bei unfitten Patienten etabliert (Goede et al. 2015). Im weiteren Beobachtungszeitraum wurde in einer vorläufigen Analyse auch ein

Überlebensvorteil von Obinutuzumab gegenüber Rituximab als Kombinationspartner von Chlorambucil gezeigt (Goede et al. 2018).

In der Auswahl der verschiedenen Behandlungsmöglichkeiten der CLL ist die Tumorgenetik ein entscheidendes Kriterium. Dabei hat die Bestimmung des IGHV-Status und die Untersuchung auf eine 17p Deletion und / oder eine *TP53* Mutation Eingang in den klinischen Alltag gefunden, da beide Veränderungen als prognostische und prädiktive Marker der CLL identifiziert und etabliert wurden.

1.2 Prognostische und prädiktive Marker

Prognostische Marker ermöglichen eine Vorhersage, wie der individuelle Krankheitsverlauf eines Patienten aussehen könnte und erlauben somit eine Einteilung von Patienten in unterschiedliche Risikogruppen. Im Rahmen der Erforschung der CLL wurde bereits eine Vielzahl an prognostischen Markern identifiziert und validiert. Diese umfassen neben laborchemischen Parametern und genomischen Aberrationen vor allem den IGHV-Status und rekurrent mutierte Gene, beispielsweise *TP53* (Döhner et al. 2000, Rossi et al. 2009).
Demgegenüber zeigen prädiktive Marker auf, inwieweit ein Patient auf eine bestimmte Behandlung ansprechen könnte und lassen daher einen Rückschluss auf geeignete Therapieregime zu. Die Identifizierung prädiktiver Marker der CLL ist bisher vergleichsweise selten gelungen. In der CLL8 Studie konnte jedoch ein mutiertes *NOTCH Rezeptor 1* (*NOTCH1)* Gen als prädiktiver Marker identifiziert werden, da Patienten mit dieser genetischen Läsion nicht von einer Hinzunahme von Rituximab zum FC-Schema profitierten (Stilgenbauer et al. 2014).

1.2.1 Genomische Aberrationen und *TP53* Mutation

Bei über 80 % der Patienten mit einer CLL treten genomische Aberrationen auf, die einen hohen prognostischen Stellenwert besitzen. Der Nachweis von genomischen Aberrationen ist unter anderem durch eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) möglich. Zu den häufigsten chromosomalen Aberrationen der CLL gehören die Deletion 13q, die Deletion 11q, die Trisomie 12 und die Deletion 17p.
Die Deletion 13q ist mit einem Anteil von über 50 % die häufigste genomische Aberration der CLL. Dabei handelt es sich um einen günstigen prognostischen

Marker, da das mediane behandlungsfreie Intervall über dem durchschnittlichen Wert eines Patienten mit einem normalen Karyotyp liegt (Döhner et al. 2000). Damit kongruent stellt die Deletion 13q im Zeitverlauf der CLL ein frühes Ereignis dar (Wang et al. 2014). Pathophysiologisch folgt der genomischen Aberration eine Deletion oder Herunterregulierung der nicht-codierenden, regulatorischen microRNA Gene miR15 und miR16, die auf Chromosom 13q14 liegen (Calin et al. 2002).

Bei ca. 20 % bis 25 % der behandlungsbedürftigen Patienten mit einer CLL liegt eine Deletion 11q vor. Diese entspricht einem ungünstigen prognostischen Marker. Die Deletion 11q geht mit einem kürzeren progressionsfreien Überleben und einem hohen Risiko eines frühen Rückfalls der Patienten einher (Grever et al. 2007). Sie umfasst den Lokus des *ATM* Gens, das bei Vorliegen eines normalen Karyotyps über die Serin-Proteinkinase ATM die zellulären Antworten auf DNA-Schäden reguliert (Eclache et al. 2004).

Eine Trisomie 12 tritt bei rund 15 % der Patienten mit einer CLL auf, wobei die prognostische Aussagekraft letztlich nicht geklärt ist. In der prospektiven CLL8 Studie war das Therapieansprechen und Gesamtüberleben der Patienten mit einer Trisomie 12 tendenziell positiv (Hallek et al. 2010).

Die Deletion 17p und der damit einhergehende *TP53* Defekt sind mit einer besonders ungünstigen Prognose assoziiert. Infolgedessen hat deren genetische Analyse vor Beginn einer Therapie Eingang in den klinischen Alltag gefunden. Bei der Erstdiagnose einer CLL schwankt die Prävalenz der Deletion 17p zwischen 5 % und 12 % und die der *TP53* Mutation zwischen 8 % und 10 %. In der überwiegenden Mehrzahl der Patienten mit einer Deletion 17p führt diese zu einer begleitenden Mutation des *TP53* Gens, wohingegen 40 % bis 50 % der Patienten mit einer *TP53* Mutation keine begleitende 17p Deletion aufweisen (Rossi et al. 2009, Zenz et al. 2010). Als prädiktive Marker gehen beide Veränderungen mit einem schlechteren Ansprechen auf Immunchemotherapie einher (Hallek et al. 2010). Empfohlen wird daher eine Therapie mit einem BTKi, wobei die Langzeitergebnisse der Zulassungsstudie zeigten, dass eine Deletion 17p und / oder eine *TP53* Mutation auch unter der Therapie mit dem Kinaseinhibitor zu einem verkürzten progressionsfreien Überleben der Patienten führt (Munir et al. 2019). Dies wurde ebenso für die Kombination von Obinutuzumab und Venetoclax nachgewiesen (Tausch et al. 2020b). Damit bleiben eine Deletion 17p und / oder eine *TP53*

Mutation auch unter Anwendung der neuen, zielgerichteten Therapiemöglichkeiten prognostische Hochrisiko-Marker.

1.2.2 IGHV-Status

Neben den genomischen Aberrationen und einer *TP53* Mutation ist der IGHV-Status ein wichtiges Einteilungsmerkmal der CLL. Beurteilt wird hierbei die schwere Kette des membrangebundenen Immunglobulins des B-Zell-Rezeptors. Liegen dort unter 2 % somatische Hypermutationen vor, gilt der IGHV-Status als unmutiert, während der IGHV-Status bei über 2 % Mutationen als mutiert gilt (Damle et al. 1999). Bei etwa der Hälfte der Patienten mit einer CLL ist der Risikofaktor eines unmutierten IGHV-Status nachweisbar. Dieser führt zu einem deutlich verkürzten medianen Überleben von knapp acht Jahren im Vergleich zu fast 25 Jahren bei einem mutierten IGHV-Status (Hamblin et al. 1999). Daher hat die Erhebung des IGHV-Status Eingang in die klinische Praxis gefunden. Nach den iwCLL-Leitlinien wird die Bestimmung bei Vorliegen einer Therapieindikation empfohlen (Hallek et al. 2018). Insbesondere fitte Patienten mit einem Alter von unter 65 Jahren und einem mutierten IGHV zeigen lange Remissionen unter einer Therapie mit dem FCR-Schema, wohingegen Patienten dieser Gruppe mit einem unmutierten IGHV mit Ibrutinib ein signifikant längeres progressionsfreies Überleben aufweisen (Fischer et al. 2016, Shanafelt et al. 2018).

1.2.3 Internationaler CLL-Prognoseindex

Die Abbildung der heterogenen Krankheitsverläufe der CLL ist durch die Unterscheidung von maximal drei verschiedenen Risikogruppen in den Stadieneinteilungen nach Binet und Rai limitiert. Eine Lösungsmöglichkeit stellt die Hinzunahme von prognostischen und prädiktiven Markern dar. Mit diesem Ansatz wurde unter Berücksichtigung des klinischen Stadiums, der Deletion 17p und / oder einer *TP53* Mutation, des IGHV-Status und weiterer unabhängiger prognostischer Marker aus den Patientendaten von acht Phase-III-Studien der Internationale CLL-Prognoseindex entwickelt. Durch eine unterschiedliche Gewichtung der fünf unabhängigen prognostischen Marker konnten somit vier Risikogruppen der CLL differenziert werden, die eine Aussage über die Prognose und mögliche Therapie des Patienten zulassen (International CLL-IPI working group 2016). F

Tabelle 2: Unterschiedliche Gewichtung der fünf unabhängigen prognostischen Marker im Internationalen CLL-Prognoseindex

IGHV: Variable Regionen der Immunglobulinschwerketten

Prognostischer Marker	Ausprägung	Punkte
Deletion 17p und / oder *TP53* Mutationsstatus	Deletiert oder mutiert	4
IGHV-Status	Unmutiert	2
Serum β2-Mikroglobulin	> 3,5 mg/l	2
Klinisches Stadium	Binet B / C oder Rai I - IV	1
Alter	> 65 Jahre	1

Tabelle 3: Unterschiedliche Risikogruppen im Internationalen CLL-Prognoseindex und deren klinische Konsequenz

JÜ: Jahresüberleben

Risikogruppe	Punkte	5-JÜ	10-JÜ	Klinische Konsequenz
Niedrig	0 - 1	93 %	79 %	„Watch and Wait"-Strategie
Mittel	2 - 3	79 %	39 %	Nur bei schweren Symptomen behandeln
Hoch	4 - 6	63 %	22 %	Behandlung indiziert, außer bei asymptomatischen Patienten
Sehr hoch	7 - 10	23 %	4 %	Behandlung innerhalb klinischer Studien mit zielgerichteten Substanzen

1.3 Rekurrente Mutationen

Auf der Suche nach weiteren prognostischen und prädiktiven Markern konnten durch Fortschritte im Bereich der DNA-Sequenzierung rekurrente Mutationen bei der CLL entdeckt werden. Unter der Fragestellung, welches Ausmaß diese genetischen Veränderungen bei der CLL annehmen, identifizierten Landau et al. 44 rekurrent mutierte Gene. Darunter befanden sich 26 Gene, die bisher nicht in Zusammenhang mit der CLL gebracht wurden und bei dieser möglicherweise regelhaft mutiert sind. Insgesamt drei dieser Genmutationen (*TP53*, *SF3B1* und *RPS15*) wurden als unabhängige prognostische Marker der CLL identifiziert (Landau et al. 2015). In der CLL8 Studie wurden Mutationen im *TP53* und *SF3B1* Gen als ungünstige prognostische Marker bestätigt und waren mit einem relativen Anteil zwischen 10 % und 20 % häufig innerhalb der CLL vertreten. In derselben Studie wurde eine Mutation im *NOTCH1* Gen bei 10 % der Patienten gefunden und als prädiktiver Marker der CLL identifiziert, da Patienten mit einem mutierten

NOTCH1 nicht von der Hinzunahme von Rituximab zum FC-Schema profitierten (Stilgenbauer et al. 2014).

1.3.1 *NOTCH1*

Der *NOTCH1* Signalweg ist an vielfältigen Aufgaben der Zelldifferenzierung beteiligt, beispielsweise an der Aufrechterhaltung der hämatopoetischen Stammzellen oder an der Differenzierung der B- und T-Lymphozyten (Duncan et al. 2005, Han et al. 2002). Der Signalweg ist stark konserviert und besteht aus einem im Kern einfachen molekularen Aufbau. Über diesen versetzt der *NOTCH1* Signalweg verschiedene Zelltypen in die Lage, auf extrazelluläre Liganden zu reagieren, indem eine Transkriptionsantwort im Zellkern erzeugt wird (Andersson et al. 2011).

Das *NOTCH1* Gen codiert für einen Rezeptor, der den entscheidenden Baustein des Signalweges darstellt. Dieser transmembranöse *NOTCH1* Rezeptor besteht aus einem N-terminalen extra- und einem C-terminalen intrazellulären Anteil. Der extrazelluläre Anteil reguliert die Ligandenbindung. Diese findet an einer Domäne statt, die aus 29 bis 36 dem Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) ähnlichen Wiederholungen besteht (Cordle et al. 2008). Eine Liganden-unabhängige Aktivierung des *NOTCH1* Rezeptors verhindert die sich daran anschließende negative regulatorische Region, die sich in eine Stabilisierungsdomäne LIN-12/NOTCH und eine Heterodimerisierungsdomäne unterteilt (Chiang et al. 2006). Die Verbindung zur intrazellulären *NOTCH1* Domäne (NICD) erfolgt über eine singuläre Transmembranregion. Die NICD besteht unter anderem aus einer Transaktivierungsdomäne und einer C-terminalen PEST-Domäne, welche reich an Prolin, Glutamat, Serin und Threonin ist. Die PEST-Domäne ist an der Regulation der Rezeptorstabilität beteiligt (Weng et al. 2004). Bei der irreversiblen Rezeptoraktivierung von *NOTCH1* wird durch Proteolyse unter anderem durch die γ-Secretase die NICD abgespalten und wandert in den Zellkern. Dort entfaltet sie ihre Wirkung über Transkriptionsfaktoren wie RBPJ an der DNA (Kopan, Ilagan 2009).

Durch die wichtige Rolle des Signalweges können Mutationen im *NOTCH1* Gen zur Entstehung von Tumoren beitragen, wobei das *NOTCH1* Gen eine bifunktionale Rolle als Onkogen oder Tumorsuppressor einnehmen kann (Lobry et al. 2014).

Zusammengefasst lassen sich drei verschiedene Wege der *NOTCH1* Mutation unterscheiden:

- Bei der Entstehung von Plattenepithelkarzinomen treten Punkt-, Nonsense- und Frameshift-Mutationen am N-terminalen Ende des *NOTCH1* Gens auf. Infolgedessen kommt es zu einem Funktionsverlust des *NOTCH1* Rezeptors als Tumorsuppressor und damit zur Bildung von Plattenepithelkarzinomen der Haut und der Lunge (Wang et al. 2011).
- Die T-Zell akute lymphatische Leukämie (T-ALL) entsteht in 50 % der Fälle mit Beteiligung eines konstitutiv aktiven *NOTCH1* Rezeptors, der in diesem Fall als Onkogen das Gewebewachstum und die Tumorentwicklung fördert. Zum einen kann der *NOTCH1* Rezeptor aufgrund der seltenen chromosomalen Translokation t(7;9) dereguliert werden. Diese Translokation führt über die Bildung eines chimären Fusionsgens zu einem konstitutiv aktiven *NOTCH1* Rezeptor (Ellisen et al. 1991). Zum anderen gehen die weitaus häufigeren Punktmutationen, Deletionen und Insertionen in der Heterodimerisierungsdomäne des *NOTCH1* Rezeptors mit einer Instabilität der negativen regulatorischen Region einher und führen wiederum zu einem deregulierten *NOTCH1* Rezeptor (Malecki et al. 2006).
- Im Jahr 2009 wurde die Rolle des *NOTCH1* Signalweges in der Entstehung der CLL erkannt. Die Arbeitsgruppe um Rosati et al. beschrieb, dass bestimmte B-CLL-Zellen den *NOTCH1* Rezeptor konstitutiv exprimieren und dies zu einer Apoptoseresistenz und einem damit einhergehenden Überlebensvorteil der Zelle führt (Rosati et al. 2009). Als Ursache wurde eine Deletion der Basen Cytosin und Thymin im C-terminalen Exon 34 des *NOTCH1* Gens gefunden (Di Ianni et al. 2009). Diese Deletion führt über die Entstehung eines vorzeitigen Stopcodons zu einem Fehlen der regulierenden PEST-Domäne. Dadurch kommt es zur Umwandlung des *NOTCH1* Rezeptors zu einem Onkogen in den CLL-Zellen (Fabbri et al. 2011).

Bei der CLL tritt diese codierende *NOTCH1* Mutation im Exon 34 bei 10 % bis 18 % der Patienten auf und ist damit eines der am häufigsten mutierten Gene der Erkrankung (Puente et al. 2011, Oscier et al. 2013, Stilgenbauer et al. 2014, Sutton et al. 2015). Das Auftreten einer *NOTCH1* Mutation korreliert mit dem Vorliegen

einer Trisomie 12 und einem unmutierten IGHV-Status (Fabbri et al. 2011, Del Giudice et al. 2012). Patienten mit einer codierenden *NOTCH1* Mutation sind mit einem aggressiveren Krankheitsverlauf und einem schlechteren Krankheitsausgang der CLL assoziiert (Oscier et al. 2013, Willander et al. 2013).

Zur prognostischen Aussagekraft einer *NOTCH1* Mutation als unabhängigem Marker liegen unterschiedliche Daten vor. In einer retrospektiven Analyse zeigten Patienten mit einer *NOTCH1* Mutation ein ähnliches kurzes Gesamtüberleben wie Patienten mit einer *TP53* Mutation. Innerhalb dieser Kohorte wurde eine *NOTCH1* Mutation in der multivariaten Analyse als unabhängiger prognostischer Marker identifiziert und ging mit einem häufigeren Auftreten einer Richter-Transformation einher (Rossi et al. 2012). Als unabhängiger prognostischer Marker in Bezug auf das Gesamtüberleben bestätigt wurde eine *NOTCH1* Mutation in der prospektiven Leukemia Research Fund (LRF) CLL4 Studie, allerdings nicht in Bezug auf das progressionsfreie Überleben (Oscier et al. 2013). In der bislang größten retrospektiven Studie mit knapp über 3300 Patienten bestätigte sich *NOTCH1* nicht als unabhängiger prognostischer Marker einer verkürzten Zeit bis zur ersten Behandlung. Die *NOTCH1* Mutation wurde allerdings mit einer fortgeschrittenen Erkrankung assoziiert (Baliakas et al. 2014).
In der prospektiven CLL8 Studie der Deutschen CLL Studiengruppe (DCLLSG) mit über 600 Patienten wurde *NOTCH1* ebenfalls nicht als unabhängiger prognostischer Marker identifiziert. Darüber hinaus war die Mutation mit einem frühen klinischen Stadium der CLL assoziiert und zeigte kein erhöhtes Auftreten von Richter-Transformationen. In derselben Studie wurden Mutationen im *NOTCH1* Gen erstmals als prädiktiver Marker der CLL identifiziert, wobei Patienten mit einer *NOTCH1* Mutation nicht von einer Hinzunahme des CD20-Antikörpers Rituximab zu einer FC-Behandlung profitierten (Stilgenbauer et al. 2014). Auch in der Therapie mit dem CD20-Antikörper Ofatumumab ist eine *NOTCH1* Mutation ein prädiktiver Marker, da die Hinzunahme von Ofatumumab zu einer Behandlung mit Chlorambucil in der COMPLEMENT1 Studie in der Gruppe der Patienten mit einer *NOTCH1* Mutation keine Verbesserung brachte (Tausch et al. 2020a). Dieses verminderte Ansprechen auf die CD20-Antikörper Rituximab und Ofatumumab kann auf ein niedrigeres CD20-Expressionslevel in CLL-Zellen mit einer *NOTCH1* Mutation zurückgeführt werden, das epigenetisch vermittelt auftritt (Pozzo et al.

2016). Bezüglich der codierenden *NOTCH1* Mutation konnte in der CLL11 Studie gezeigt werden, dass die Substitution von Rituximab durch Obinutuzumab zu Chlorambucil in der Lage ist, das verminderte Ansprechen der Patienten mit einer *NOTCH1* Mutation zu überwinden (Estenfelder et al. 2016).

Dem bisher bekannten relativen Anteil der *NOTCH1* Mutationen steht die Erkenntnis gegenüber, dass ungefähr 50 % der Patienten mit einer CLL eine aktive Form der NICD aufweisen. Dies könnte dafürsprechen, dass *NOTCH1* Mutationen eine weitaus größere Rolle in der Pathogenese der CLL spielen als bisher angenommen (Fabbri et al. 2017). Die bisher gefundenen Mutationen im menschlichen Genom liegen vor allem in Protein-codierenden Exonen, wie beispielsweise im Exon 34 des *NOTCH1* Gens und an Spleißstellen, welche den Übergang vom Exon zum Intron markieren. Jedoch können auch die nicht-codierenden Abschnitte der DNA rekurrente Mutationen aufweisen (Huang et al. 2013).

1.3.2 *NOTCH1 3'-UTR*

Im Jahr 2015 haben Puente et al. mittels Tumorgenom-Sequenzierung von CLL-Patienten erstmals rekurrente Mutationen des nicht-codierenden Bereichs der DNA beschrieben. Mit einem relativen Anteil von 2,6 % lag die am häufigsten gefundene Mutation im nicht-codierenden *3'-UTR* Bereich des *NOTCH1* Gens. Diese *NOTCH1 3'-UTR* Mutation führte zu einem alternativen Spleißen der prä-mRNA. Durch die Entstehung einer neuen Akzeptorstelle in der *3'-UTR* Region kam es über die Verbindung mit einer Donorstelle im Exon 34 der *NOTCH1* Region zu einem Verlust von fast 160 codierenden Basen. Die daraus folgende kleinere Proteingröße des *NOTCH1* Rezeptors bei Vorliegen einer *NOTCH1 3'-UTR* Mutation konnte im Western Blot nachgewiesen werden. Die C-terminal herausgespleißte Stelle beinhaltete die regulierende PEST-Domäne des *NOTCH1* Rezeptors, weshalb es, ähnlich wie bereits bei den codierenden Mutationen beschrieben, zu einer konstitutiv erhöhten Aktivität des Rezeptors als Onkogen kam. Dementsprechend zeigten Patienten mit einer *NOTCH1 3'-UTR* Mutation in einer ersten Analyse einen ähnlichen Krankheitsverlauf wie Patienten mit einer codierenden *NOTCH1* Mutation mit einer verkürzten Zeit bis zum Einleiten einer ersten Behandlung und einem verminderten Gesamtüberleben (Puente et al. 2015).

Auf diese Erkenntnisse aufbauend untersuchte die Arbeitsgruppe um Larrayoz et al. die *NOTCH1 3'-UTR* Mutation innerhalb der LRF CLL4 Studienkohorte mit 489 Patienten. Hierbei wiesen Larrayoz et al. bei elf Patienten (2,2 %) eine *NOTCH1 3'-UTR* Mutation nach. Diese trat exklusiv zu den codierenden *NOTCH1* Mutationen auf und erweiterte die Kohorte der *NOTCH1* Mutationen um knapp 20 %. In der univariaten Analyse konnte bei Patienten mit einer *NOTCH1 3'-UTR* oder einer codierenden *NOTCH1* Mutation ein verkürztes progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben nachgewiesen werden. In der multivariaten Analyse konnte die *NOTCH1 3'-UTR* Mutation nicht als ein unabhängiger prognostischer Marker etabliert werden. Die zusammengefasste *NOTCH1* Kohorte blieb jedoch ein prognostischer Marker für ein vermindertes Gesamtüberleben. Da sich in der LRF CLL4 Studie die Analyse der Therapiearme auf eine Chemotherapie mit Chlorambucil oder Fludarabin oder Fludarabin mit Cyclophosphamid beschränkte, warfen die Autoren die Frage auf, inwiefern sich eine *NOTCH1 3'-UTR* Mutation hinsichtlich einer Therapie mit CD20-Antikörpern auswirken würde (Larrayoz et al. 2017). Bei in-vitro Versuchen konnte gezeigt werden, dass eine *NOTCH1 3'-UTR* Mutation zu einer verminderten CD20-Expression führt und damit zu einer relativen Resistenz der B-CLL-Zelle gegenüber den CD20-Antikörpern Rituximab und Ofatumumab (Bittolo et al. 2017). In Studienkohorten konnte dies nicht reproduziert werden (Stilgenbauer et al. 2014, Tausch et al. 2020).

1.4 Zielsetzung

Die zentrale Zielsetzung dieser Dissertation war die Untersuchung der *NOTCH1 3' UTR* Mutation in einer prospektiven Studie mit einer großen Fallzahl hinsichtlich ihrer prognostischen und prädiktiven Bedeutung. Dafür wurde die CLL11 Studie der DCLLSG ausgewählt. Die 700 vorliegenden Patientenproben wurden zum Zeitpunkt des Studieneintritts mittels Sanger-Sequenzierung auf Mutationen der nicht-codierenden 3‘ Region von *NOTCH1* untersucht, um die Mutationsprävalenz zu erheben. Weitere 367 Patientenproben wurden im Studienverlauf bei Vorliegen eines Progresses sequenziert, um die Inzidenz und die klonale Evolution der *NOTCH1 3'-UTR* Mutationen zu beschreiben. Die gefundenen *NOTCH1 3'-UTR* Mutationen sollten durch eine Korrelation mit vorliegenden klinischen und genetischen Markern der CLL11 Studie genauer charakterisiert werden. Eine zentrale Fragestellung der Dissertation war die Auswirkung der

NOTCH1 3'-UTR Mutation auf die klinischen Endpunkte der CLL11 Studie. Dabei konnten Analysen hinsichtlich des Therapieansprechens, der molekularen Remission, des progressionsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens vollzogen werden. In den Therapiearmen der CLL11 Studie wurde eine Monotherapie aus Chlorambucil einer Kombinationstherapie aus Chlorambucil und einem der CD20-Antikörper Rituximab oder Obinutuzumab gegenübergestellt. Daher wäre mit diesem Studienaufbau theoretisch auch eine Bestimmung des prädiktiven Werts einer *NOTCH1 3'-UTR* Mutation im Zusammenhang mit einer Immunchemotherapie möglich. In einem nächsten Schritt sollte die *NOTCH1 3'-UTR* Mutation als nicht-codierende *NOTCH1* Mutation in Bezug zu der codierenden *NOTCH1* Mutation gesetzt werden. Die Untersuchung sollte beantworteten, ob beide Arten der *NOTCH1* Mutation gemeinsame klinische und genetische Merkmale aufweisen und sich hinsichtlich der klinischen Endpunkte der CLL11 Studie ähnlich verhielten. Unter dieser Voraussetzung galt es zu ermitteln, in welchem Ausmaß die Kohorte der *NOTCH1* Mutationen gesteigert werden könnte und ob ein prognostischer und prädiktiver Wert der *NOTCH1* Mutationen im Rahmen der CLL11 Studie identifiziert werden könnte.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv: CLL11 Studie

Die untersuchten Proben stammten aus dem Patientenkollektiv der CLL11 Studie der Deutschen CLL Studiengruppe, die diese in Kooperation mit Genentech (USA) und Hoffmann La Roche (außerhalb der USA) ausführte. Es handelte sich um eine offene, multizentrische, dreiarmig randomisierte Phase-III-Zulassungsstudie für den Typ-II-CD20-Antikörper Obinutuzumab, dieser wurde zunächst als GA101 (G) bezeichnet. In der CLL11 Studie wurde die Wirksamkeit und Sicherheit der Hinzunahme von entweder Rituximab oder Obinutuzumab zu Chlorambucil mit dem damaligen Standard, der Chlorambucil Monotherapie, verglichen (siehe Abbildung 1). Die Rekrutierung erfolgte in die Therapiearme Obinutuzumab und Chlorambucil (G-Clb), Rituximab und Chlorambucil (R-Clb) und Chlorambucil (Clb) im Verhältnis 2 : 2 : 1. Die CLL11 Studie wurde von den Ethikkommissionen in Köln und Ulm genehmigt (Ethikkommission Köln 09-229, Ethikkommission Ulm 280/09). Einschlusskriterien waren eine unbehandelte B-CLL mit CD20-Antigen-Nachweis auf der Zelloberfläche und eine Therapieindikation. Ein zusätzliches Einschlusskriterium war das Vorliegen einer Komorbidität, die definiert wurde als eine Kreatininclearance unter 70 ml/min oder eine CIRS mit einem Gesamtwert von über sechs Punkten. Weitere Voraussetzungen des Studieneinschlusses waren eine Volljährigkeit und eine verbleibende Lebenserwartung des Patienten von über sechs Monaten. Die Rekrutierung der Studienteilnehmer erfolgte im Zeitraum zwischen April 2010 und Juli 2012. Primärer Endpunkt der Studie war die Zeitspanne des progressionsfreien Überlebens. Hierbei lag der mediane Beobachtungszeitraum ab Randomisierung der Studienteilnehmer bei 62,5 Monaten. Sekundäre Endpunkte waren das Gesamtüberleben der Patienten, das Therapieansprechen und die molekulare Remission. Verlaufskontrolluntersuchungen der CLL11 Studie erfolgten jeweils 28 Tage nach der letzten Medikamentengabe. Nach dem letzten Therapiezyklus schlossen sich weitere Kontrolluntersuchungen an, die alle drei Monate in den ersten drei Jahren und danach alle sechs Monate für insgesamt fünf Jahre stattfanden. Das Ende der Studie wurde im August 2017 erreicht. Bei Studieneinschluss der Patienten wurden sowohl klinische Untersuchungen als auch die zentrale Diagnostik im Institut für Klinische Chemie der Uniklinik Köln erhoben. Referenzlabor bezüglich Molekular-

und Zytogenetik der CLL11 Studie war die Arbeitsgruppe CLL der Klinik für Innere Medizin III des Universitätsklinikums Ulm. Von 781 teilnehmenden Patienten waren 700 Proben (89,6 %) zur Auswertung in ausreichend guter Qualität eingegangen. In der Arbeitsgruppe erfolgten Untersuchungen auf genomische Aberrationen, den IGHV-Status sowie auf *TP53*, *SF3B1* und codierende *NOTCH1* Mutationen. Im Verlauf erfolgten bei Progress eines Patienten in einer der Kontrolluntersuchungen weitere Probeentnahmen, hiervon lagen weitere 367 Proben zur Analyse vor.

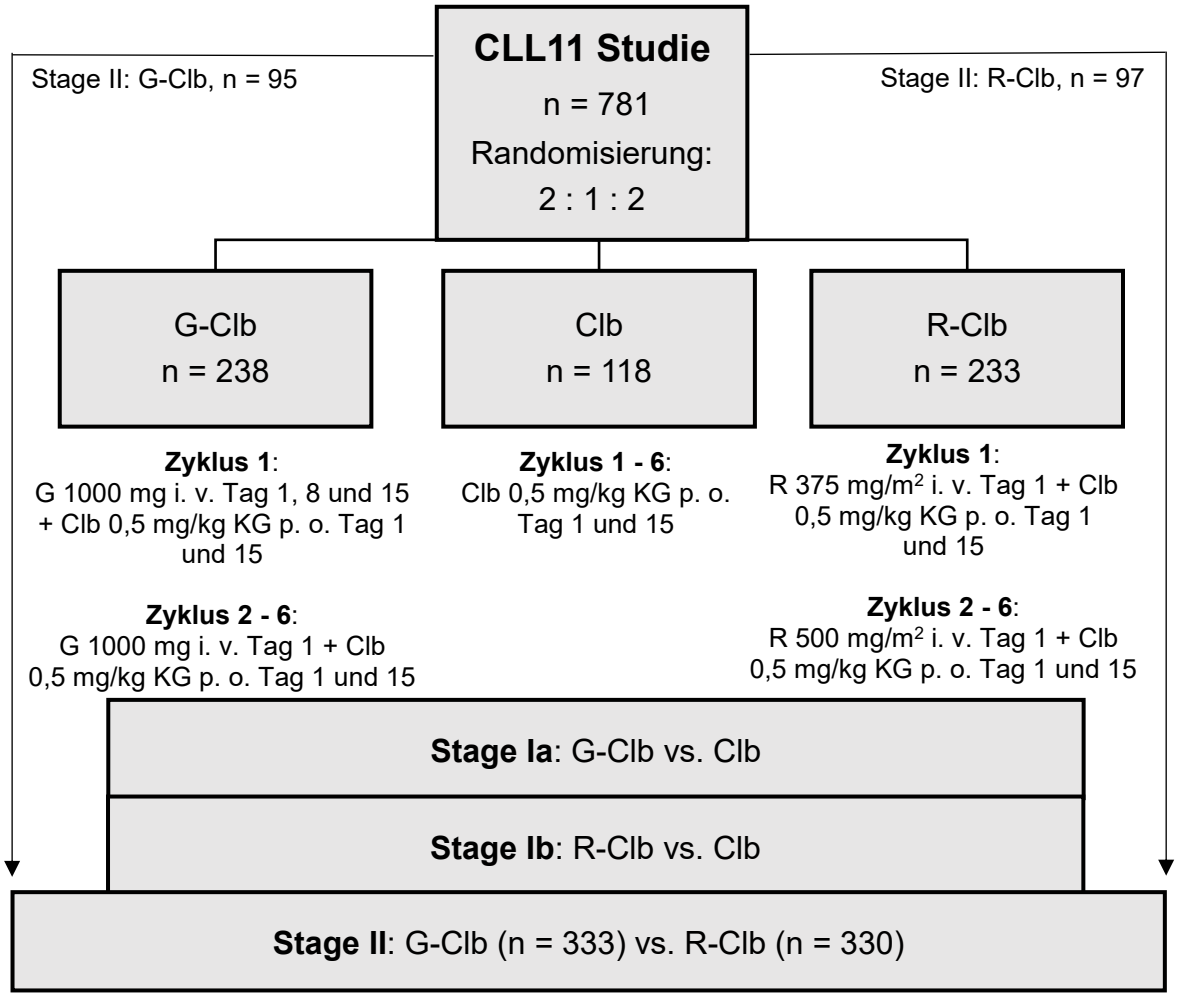

Abbildung 1: Studiendesign der CLL11 Studie

Darstellung der randomisierten Zuteilung der CLL11 Studienpopulation in die Interventionsarme (G-Clb oder R-Clb) oder in den Kontrollarm (Clb) mit den entsprechenden Therapiezyklen. Hiernach Primäranalyse (Stage Ia und Ib) und Sekundäranalyse (Stage II) der CLL11 Studie in Hinblick auf den primären Endpunkt des progressionsfreien Überlebens und die sekundären Endpunkte des Gesamtüberlebens, des Therapieansprechens und der molekularen Remission.

Clb: Chlorambucil, G: Obinutuzumab, G-Clb: Obinutuzumab-Chlorambucil, i. v.: intravenös, KG: Körpergewicht, n: Patientenzahl, p. o.: per os, R: Rituximab, R-Clb: Rituximab-Chlorambucil, vs.: versus

2.2 Verwendete Materialien

Tabelle 4: Oligonukleotide: Primer *NOTCH1 3'-UTR*

Primer *NOTCH1 3'-UTR*	**Hersteller und Herkunft**
Vorwärts: 5' *CCTAACAGGCAGGTGATGCT 3'*	Eurofins Genomics, Val Fleuri, Luxemburg
Rückwärts: 5' *ATCTGGCCCCAGGTAGAAAC 3'*	Eurofins Genomics, Val Fleuri, Luxemburg

Tabelle 5: Enzyme

Enzyme	**Hersteller und Herkunft**
DNA-Polymerase 1 (10000 U/ml)	Fa. New England Biolabs Inc., Ipswich, USA
HotStarTaq DNA-Polymerase 1000 units	Fa. Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

Tabelle 6: Verwendete Kits

Kits	**Hersteller und Herkunft**
AllPrep DNA/RNA Mini Kit	Fa. Qiagen Gmbh, Hilden, Deutschland
BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Fa. Applied Biosystems, FosterCity, USA
DyeEx 2.0 Spin Kit	Fa. Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
DyeEx 96 Kit	Fa. Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAquick PCR Purification Kit	Fa. Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

Tabelle 7: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	**Hersteller und Herkunft**
15 ml konische Röhrchen (15 ml Falcon)	Fa. BD Falcon, New Jersey, USA
96 Well Plate Septa	Fa. Applied Biosystems, Foster City, USA
Alufolie	Fa. Ecopla, Andenne, Belgien
Aluminum foil seal	Fa. Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
ART Aerosol Resitant Tips, 10, 20, 100, 200, 1000	Fa. Fisher Scientific, Waltham, USA
Combitips plus 1,0 ml, 5,0 ml	Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Einmalhandschuhe Dermaclean (Größe M)	Fa. Ansell, Iselin, USA
Einmaltücher	Fa. Kimberly Clark, Dallas, USA
Entsorgungsbeutel 200 x 300 mm	Fa. Ratiolab, Dreiech, Deutschland
Eppendorf Safe-Lock Microcentrifuge Tubes	Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Half Skirt 96 Well PCR Plate	Fa. VWR, Darmstadt, Deutschland
Kryo-Box, beschichtet 136 x 136 x 50	Fa. Ratiolab, Dreiech, Deutschland
Messzylinder 1 l	Fa. Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
MicroAmp 8-Cap Strip	Fa. Applied Biosystems, FosterCity, USA

Fortsetzung auf Seite 21

Verbrauchsmaterialien	Hersteller und Herkunft
MicroAmp 8-Tube Strip	Fa. Applied Biosystems, FosterCity, USA
MicroAmp Adhesive Film Applicator	Fa. Applied Biosystems, FosterCity, USA
MicroAmp Optical 96 Well Reaction Plate	Fa. Applied Biosystems, FosterCity, USA
Multi-Safe 0,7 l	Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitze 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Fa. Kinesis GmbH, Langenfeld, Deutschland
QIAquick 96 Plates	Fa. Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Rastereinsatz für Kryo-Box	Fa. Ratiolab, Dreiech, Deutschland
Safe-Lock Reaktionsgefäß 1,5 ml, 2 ml	Fa. Ratiolab, Dreiech, Deutschland
Skirted 96-Well PCR Plate	Fa. Biorad, Hercules, USA
Sondermüllbehälter 60 l	Fa. Infa Lentjes, Herdecke, Deutschland
Stabpipetten 10 ml	Fa. BD Falcon, New Jersey, USA

Tabelle 8: Verwendete Reagenzien

Reagenzien	Hersteller und Herkunft
10 N NaOH	Fa. Fluka, Seelze, Deutschland
100 bp DNA Ladder (500 µg/ml)	Fa. New England Biolabs Inc, Ipswich, USA
10 x BlueJuice Loading Buffer	Fa. Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
10 x PCR-Puffer	Fa. Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
5 x Sequencing Buffer	Fa. Applied Biosystems, FosterCity, USA
Aqua ad iniectabilia Braun Mini Plasco	Fa. Braun, Melsungen, Deutschland
AW1 Puffer (Konzentrat)	Fa. Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
AW2 Puffer (Konzentrat)	Fa. Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Deoxynucleoside Triphosphate Set, PCR Grade	Fa. Roche, Basel, Schweiz
EB Puffer	Fa. Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
EDTA Puffer 0,5 M EDTA	Fa. Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure 100 %	Fa. AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ethanol absolut	Fa. VWR, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid 0,07 %	Fa. AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ficoll Separating Solution	Seromed Biochrom KG, Berlin
Hi-Di Formamid	Fa. Applied Biosystems, FosterCity, USA
RPMI 1640 Kulturmedium	Fa. Seromed Biochrom KG, Berlin, Deutschland
RLT Plus Puffer	Fa. Qiagen Gmbh, Hilden, Deutschland
TrackIt 100 bp Ladder	Fa. Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
TRIS EDTA Buffer Solution pH 7,4	Fa. Fluka, Seelze, Deutschland

Tabelle 9: Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller und Herkunft
2720 Thermal Cycler	Fa. Applied Biosystems, FosterCity, USA
37 °C Wasserbad	Fa. Heraeus, Hanau, Deutschland
Abfallständer für Vernichtungsbeutel	Fa. Ratiolab, Dreiech, Deutschland
Abschlussschiene des Gelschlittens	Wissenschaftliche Werkstatt Uniklinik Ulm
Bechergläser (50 ml, 200 ml, 500 ml)	Fa. DWK Life Sciences, Wertheim, Deutschland
Biofuge Fresco	Fa. Heraeus, Hanau, Deutschland
Biofuge Pico	Fa. Heraeus, Hanau, Deutschland
Chemikalienlöffel, beidseitig	Fa. RSG Solingen, Solingen, Deutschland
Cytospin 3	Fa. Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Einkanalpipetten 0,5 - 10 µl, 2 - 20 µl, 20 - 200 µl, 200 - 1000 µl	Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eismaschine MF22	Fa. Scotsman, Vernon Hills, USA
Elektronische 8-Kanal-Pipette 100 - 1250 µl	Fa. VWR, Darmstadt, Deutschland
Elektrophoresekammern (4617)	Fa. MBT Brand, Gießen, Deutschland
Eppendorf Tubes Ständer	Fa. VWR, Darmstadt, Deutschland
Erlenmeyerkolben 500 ml	Fa. DWK Life Sciences, Wertheim, Deutschland
Gel Doc XR	Fa. Biorad, Hercules, USA
Gelschlitten	Wissenschaftliche Werkstatt Uniklinik Ulm
Heat Block, 96-well SciGene, Hybex Microsample Incubator	Fa. SciGene, Sunnyvale, USA
Heizblock	Fa. Liebisch GmbH & Co. KG Labortechnik, Bielefeld, Deutschland
Kühlzentrifugen GS-15R, J2-21ME	Fa. Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Magnetrührer	Fa. IKA, Staufen, Deutschland
Magnetrührstäbchen	Fa. VWR, Darmstadt, Deutschland
Mehrkanal-Pipetten, variable Volumeneinstellung, 8-Kanal (0,5 - 10 µl)	Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikrowelle	Fa. Siemens, München, Deutschland
Minizentrifuge	Fa. Qualitron, Rescaldina, Italien
Multipette plus	Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Multipette stream	Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Qubit 2.0 Fluorometer	Fa. Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Sequencer 3130xl	Fa. Applied Biosystems, FosterCity, USA
Spectrophotometer NanoDrop 1000	Fa. Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Thermomixer comfort	Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Fortsetzung auf Seite 23

Geräte	Hersteller und Herkunft
Vortexer	Fa. Scientific Industries, Bohemia, USA
Waage Precisa 400 M	Fa. PAG Oerlikon AG, Pfäffikon, Schweiz
Zellzählgerät XS 800i	Fa. Sysmex, Norderstedt, Deutschland

2.3 Probengewinnung

In der Präanalytik werden mittels Dichtegradientenzentrifugation als physikalischem Trennverfahren aus dem peripheren Blut der CLL11 Studienteilnehmer mononukleäre Zellen gewonnen. Dabei macht man sich die Eigenschaft von Ficoll, einem Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer, zunutze. Dieses hat mit einer spezifischen Dichte von 1,077 g/ml eine höhere Dichte als die mononukleären Zellen, aber eine geringere Dichte als andere Bestandteile des Blutes wie Erythrozyten oder Granulozyten bei gleichzeitigem Fehlen einer osmotischen Aktivität. Durch die Zentrifugation erfolgt eine Trennung aufgrund der Dichte der Partikel. Mononukleäre Zellen, die eine geringere Dichte als die Ficolllösung haben, verbleiben oberhalb der Ficolllösung. Andere Blutbestandteile wie Erythrozyten und Granulozyten haben eine höhere Dichte als die Trennlösung und sinken nach unten ab. In ein 50 ml Probenröhrchen wird die Ficoll Separating Solution vorgelegt und mit der gleichen Menge heparinisiertem Patienten-Vollblut vorsichtig überschichtet. Nach einer Zentrifugation von 30 Minuten bei 400 g ohne Bremse lagern sich die mononukleären Zellen oberhalb des Ficolls als Interphase ab. Diese kann mit einer sterilen Pasteurpipette abpipettiert werden. Um die Ficoll Restbestände zu entfernen, erfolgt ein zweifacher Waschschritt mit RPMI 1640 Medium und eine erneute Zentrifugation bei 1200 U/min über 10 Minuten. Zur Zellzahlbestimmung wird das Zellzählgerät der Firma Sysmex Modell XS 800i verwendet.

2.4 Isolierung der DNA

Aus den Zellpellets wird die genomische DNA unter Verwendung des AllPrep DNA/RNA Mini Kits extrahiert und aufgereinigt. Zur Lyse der mononukleären Zellen werden die Zellpellets mit RLT-Puffer resuspendiert. Dieser enthält β-Mercaptoethanol, welches über die Reduzierung von Disulfidbrücken zu freien Thiolen denaturiende Effekte auf Proteine hat. Zudem enthält der Puffer Guanidin-Isothiocyanat, welches den gleichen Effekt über die Zerstörung von Wasserstoffbrückenbindungen ausübt. Es erfolgt eine mechanische Zerstörung der

Zellpellets mit einer Injektionsnadel durch mehrmaliges Resuspendieren der Zellpellets mit dem 600 µl RLT-Puffer. Das homogenisierte Lysat wird im nächsten Schritt auf die AllPrep DNA-Säulen überführt mit der Zielsetzung, die DNA zu isolieren. Dies erfolgt über die Silicagel-Membran der AllPrep DNA-Säulen, welche nach Zentrifugation bei 13000 U/min für 30 s bis zu 100 µg DNA binden kann. Das entspricht ungefähr der DNA von 1 x 10^7 Zellen. Bei den zwei folgenden Waschschritten (Hinzugabe von 500 µl AW1 Puffer und Zentrifugation bei 13000 U/min für 30 s, Hinzugabe von 500 µl AW2 Puffer und Zentrifugation bei 13000 U/min für zwei Minuten) werden erneut verbleibende Proteine denaturiert, ausgewaschen und übrig gebliebene Salze entfernt. Zur Eluierung der DNA werden die AllPrep DNA-Säulen in 1,5 ml Eppendorf Tubes gestellt und 100 µl EB-Puffer auf die Säulenmembran pipettiert. Durch den salzarmen Puffer kann nach fünfminütiger Inkubationsphase die DNA abzentrifugiert werden (13000 U/min für eine Minute). Dieser Schritt wird mit einer Menge von 50 µl EB-Puffer wiederholt, danach werden die AllPrep DNA-Säulen verworfen und das DNA-Eluat befindet sich in den 1,5 ml Eppendorf Tubes. Von der eluierten DNA werden 1 µl zur DNA-Konzentrationsmessung am Qubit 2.0 Fluorometer entnommen und 2 µl zur Gelbandenerfolgskontrolle in der Agarose-Gelelektrophorese. Durch die Zugabe von Wasser können je nach Konzentration Arbeitslösungen mit einer Konzentration der DNA von 200 ng/µl hergestellt werden. Die hergestellte DNA wird bei -20 °C in der Tumorbank gelagert.

2.5 Sanger-Sequenzierung

Zur Sequenzierung des *NOTCH1 3'-UTR* Bereichs wird die Methode nach Sanger verwendet, die eine Bestimmung der Nukleotidabfolge und damit eine Mutationsanalyse ermöglicht. Sie lässt sich in sechs aufeinanderfolgende Schritte unterteilen: 1. Polymerase-Kettenreaktion, 2. Agarose-Gelelektrophorese, 3. Aufreinigung der PCR-Produkte, 4. Sequenzreaktion, 5. Aufreinigung der Sequenzreaktions-Produkte, 6. Sequenzierung.

2.5.1 PCR: Polymerase-Kettenreaktion

Tabelle 10: Mastermix der *NOTCH1 3'-UTR*-PCR

dNTP: Desoxyribonukleosidtriphosphat, PCR: Polymerase-Kettenreaktion

Mastermix	**Menge in µl**
PCR-Puffer, 5 x ($MgSO_4$)	6,0
dNTP (10 mM)	2,4
Primer 1 (vorwärts)	0,3
Primer 2 (rückwärts)	0,3
DNA-Polymerase	0,6
H_2O	19,2
PCR-Mastermix gesamt	**28,8**
Probe (Patient)	1,2
Gesamtmenge	30,0

Ziel einer Polymerase-Kettenreaktion ist die Amplifikation eines ausgewählten DNA-Abschnittes. Als DNA-Abschnitt wird ein Teilbereich der nicht-translatierten 3' Region des *NOTCH1* Gens auf Chromosom 9 gewählt. Das Amplicon umfasst 306 Basen, in denen die bisher beschriebenen *NOTCH1 3-'UTR* Mutationen liegen. Das Primerdesign entspricht dem von Puente et al. 2015. Die PCR-spezifischen Temperaturen und Zeitabschnitte werden durch den Thermocycler ermöglicht. Die initiale Denaturierung erfolgt zum Aufbrechen der DNA-Doppelhelix der Patientenprobe bei 94 °C, um die entstehenden Einzelstränge der DNA für das Annealing der Primer zugänglich zu machen. Im nächsten Schritt erfolgt die Primerhybridisierung, wobei sich die Primer an die entsprechende Basensequenz der Templates anlagern. Die Annealingtemperatur ist primerspezifisch und liegt bei der *NOTCH1 3'-UTR*-PCR bei 57,8 °C. Die Primer liegen sowohl in der 3' nach 5' als auch in der 5' nach 3' Richtung vor und markieren beim Amplicon den Start- und Endpunkt der DNA-Polymerase. Im Polymerisation genannten Arbeitsschritt setzt die DNA-Polymerase an die Primer an und nimmt eine Kettenverlängerung von 5' nach 3' vor. Als Bausteine der DNA werden Desoxyribonucleosidtriphosphate verwendet, die von der DNA-Polymerase zur Erstellung der Amplifikate benutzt werden. Die Schritte Denaturierung, Primerhybridisierung und Polymerisation werden als zyklischer Prozess 30 Mal wiederholt. Da die zuvor gewonnenen Produkte erneut als Matrize dienen, führt dies zur exponentiellen Amplifikation.

Nach dem abschließenden Schritt der Extension kühlt der Thermocycler auf 4 °C ab, wodurch die Amplifikation beendet wird. Zur Kontrolle auf unspezifische Amplifikationen oder Kontaminationen wird bei jedem PCR-Ansatz eine Negativkontrolle bestehend aus dem Mastermix ohne Patientenmaterial mitgeführt.

Tabelle 11: Ablauf der *NOTCH1 3'-UTR*-PCR im Thermocycler
PCR: Polymerase-Kettenreaktion

Schritte	Zeit in Sekunden	Temperatur in °C	Zyklen
Initiale Denaturierung	30	94,0	1
Denaturierung	**30**	**94,0**	**30**
Primerhybridisierung	**60**	**57,8**	**30**
Polymerisation	**60**	**68,0**	**30**
Extension	300	68,0	1
Abkühlung	∞	4,0	1

2.5.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient als Erfolgskontrolle der vorangegangenen Polymerase-Kettenreaktion. Mithilfe einer angelegten Spannung erfolgt die Größenbestimmung und somit der Nachweis der amplifizierten PCR-Produkte in der Elektrophoresekammer. Dazu wird ein Agarosegel (1,5 %) angefertigt, indem 100 ml 1x Tris-Acetat-EDTA Puffer und 1,5 g Agarosegel in einem Erlenmeyerkolben gemischt und in der Mikrowelle erhitzt werden. Diese Mischung wird unter ständigem Rühren mittels eines Rührfisches abgekühlt und zusätzlich wird Ethidiumbromid hinzugegeben. Das Gel wird in einen Gelschlitten überführt, worin es durch Abkühlung erstarrt.

Zur Probenvorbereitung werden 3 µl Aqua Braun mit 2 µl BlueJuice Loading Buffer (10 x) vermischt und dazu 5 µl PCR-Produkt gegeben. Die Probe wird in eine Geltasche überführt. Als Längenvergleich wird eine Probe aus 1 µl 100 bp DNA Ladder, 3 µl Aqua Braun und 2 µl BlueJuice Loading Buffer verwendet. An den Gelschlitten wird in der Elektrophoresekammer für 30 Minuten eine Spannung von 150 V angelegt. Die kürzeren Abschnitte der DNA wandern schneller zur Anode als die längeren Abschnitte. Aufgrund der positiven Ladung des Ethidiumbromids interkaliert dieses in die negativ geladene DNA. Dies lässt sich mittels UV-Licht darstellen, da das Ethidiumbromid die DNA sichtbar macht.

Durch einen Vergleich mit dem 100 bp DNA Ladder lässt sich die Länge der Amplifikate der Proben bestimmen. Als Qualitätskontrolle wird die Negativprobe der PCR mitgeführt, die kein Patientenmaterial enthält. Bei dieser ergibt sich im Erfolgsfall keine Bande, bei einer Kontamination des Mastermixes der PCR käme diese zur Darstellung.

2.5.3 Aufreinigung der PCR-Produkte

Das Ziel der QIAquick-Aufreinigung ist die Aufbereitung der Produkte der PCR. Die überflüssigen Bestandteile wie Oligonukleotidprimer, ungebundene Nukleotide und Enzyme werden entfernt. Als Substrate werden PCR-Produkte verwendet, die bei der Agarose-Gelelektrophorese eine Bande in der erwarteten Fragmentlänge zeigen. Die Aufreinigung erfolgt durch die speziellen Bindungseigenschaften einer Silicagel-Membran. Das PCR-Produkt adsorbiert unter einer hohen Salzkonzentration an die Membran, während die unerwünschten Bestandteile durch sie hindurchfließen. Nach einem Waschschritt mit PE-Buffer, um die Salze zu entfernen, kann die DNA mit einem salzarmen EB-Puffer aus der Membran eluiert werden.

Dafür werden in einem 2 ml Eppendorf Tube pro Patient 45 µl PCR-Produkt und 225 µl PB-Puffer durchmischt. Dies wird auf die Qiagen-Säule aufgetragen, die die Silicagel-Membran enthält. Die Säule wird für eine Minute bei 13000 U/min zentrifugiert und der durchgelaufene Puffer verworfen. Als nächstes folgt ein Waschschritt mit 750 µl PE-Puffer. Nach erneuter Zentrifugation, um die Membran zu trocken und von überschüssigem Ethanol zu befreien, wird die Säule in einem neuem 2 ml Eppendorf Tube platziert. Zum Eluieren werden 50 µl des salzarmen EB-Puffers aufgetragen. Dieser wird für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend erneut bei 13000 U/min für eine Minute zentrifugiert. Das Eluat wird in 1,5 ml Eppendorf Tubes überführt und enthält das aufgereinigte PCR-Produkt.

2.5.4 Sequenzreaktion

Tabelle 12: Mastermix der *NOTCH1 3'-UTR*-Sequenzreaktion

PCR: Polymerase-Kettenreaktion

Mastermix	**Menge in µl**
Sequenzreaktions-Puffer	1,0
Primer	0,6
BigDye	2,0
H_2O	9,9
Mastermix gesamt	**13,5**
Aufgereinigtes PCR-Produkt	1,5
Gesamtmenge	15,0

Die Sequenzreaktion schafft die Voraussetzung für die Dekodierung der Basensequenz durch die Markierung einzelner Basen. Das PCR-Produkt wird unter Zugabe von Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTP), der DNA-Polymerase und einem Primer in Analogie der Polymerase-Kettenreaktion im Thermocycler amplifiziert. Bei der Sequenzreaktion wird jedoch eine lineare PCR-Amplifikation angestrebt, daher erfolgt diese mit nur jeweils einem Primer pro Ansatz. Der verwendete BigDye-Ready-Reaction-Mix enthält zusätzlich Didesoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTP), die eine Funktion als Stopnukleotid ausüben und mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind. Aufgrund der fehlenden 3'-OH-Gruppe der ddNTP im Vergleich zu den dNTP führen diese bei zufälligem Einbau durch die DNA-Polymerase zu einem Kettenabbruch, da keine Phosphodiesterbindungen zwischen den Basen ausgebildet werden können. Dadurch entstehen unterschiedlich lange DNA-Fragmente, die sich aufgrund der großen gebildeten Anzahl in einer Basenlänge unterscheiden. Diese DNA-Amplifikate können nach ihrer unterschiedlichen Größe durch eine hochauflösende Kapillarelektrophorese separiert und das Fluoreszenzsignal der Stopnukleotide detektiert werden.

Tabelle 13: Ablauf der *NOTCH1 3'-UTR*-Sequenzreaktion im Thermocycler

Schritte	Zeit in Sekunden	Temperatur in °C	Zyklen
Initiale Denaturierung	45	96,0	1
Denaturierung	**15**	**96,0**	**25**
Primerhybridisierung	**10**	**52,0**	**25**
Polymerisation	**240**	**60,0**	**25**
Abkühlung	∞	4,0	1

2.5.5 Aufreinigung der Sequenzreaktions-Produkte

Die Aufreinigung der Sequenzreaktions-Produkte erfolgt durch das Prinzip der Gel-Chromatographie und ermöglicht die abschließende Sequenzanalyse. Es können, je nach Probenanzahl, entweder Säulen der Firma Qiagen verwendet werden, die es erlauben, einzelne Proben aufzureinigen oder DyeEx Platten, welche die Aufreinigung von bis zu 96 Proben in einem Schritt ermöglichen. Das Grundprinzip beider Kits ist dasselbe. Zunächst wird der überschüssige Puffer durch Zentrifugation (3 Minuten bei 2350 U/min oder 2800 U/min für einzelne Säulen) entfernt, sodass die Gelmatrix als Säule zurückbleibt. Anschließend werden 10 µl des Produkts kontaktfrei mittig auf die Säule pipettiert. Die überschüssigen Stopnukleotide werden bei einem weiteren Zentrifugationsschritt unter denselben Einstellungen wie im vorherigen Schritt zurückgehalten. Das Eluat enthält das aufgereinigte Sequenzreaktionsprodukt. Dieses wird mit weiteren 10 µl Hi-Di Formamid verdünnt, um die Einzelstränge für die Sequenzierung zu stabilisieren.

2.5.6 Sequenzierung

In der vorangegangenen Sequenzreaktion entstehen DNA-Kettenabbruchfragmente, deren Basensequenzen in einem nächsten Schritt computergestützt ausgelesen werden. Der DNA-Sequencer 3130xl der Firma Applied Biosystems trennt die Kettenabbruchfragmente elektrophoretisch ihrer Länge nach auf. Die Auftrennung erfolgt in den Kapillaren des Sequencers, die mit einem polymeren Gel gefüllt sind. Durch Anlegen einer Spannung wandern die DNA-Fragmente im elektrischen Feld und durchtreten das Detektionsfenster im Polyamidfilm der Kapillaren. Hier erfolgt die Identifikation der einzelnen Basen über eine Laseranregung der Fluoreszenzfarbstoffe, die an die Stopnukleotide gebunden sind. In diesem Schritt wird Base für Base das Fluoreszenzsignal dekodiert. Die

Sequenzanalysesoftware übersetzt die gewonnenen Rohdaten in eine graphische Sequenz. Alle Sequenzen werden zur Validierung in Vorwärts- und Rückwärts-Richtung produziert. Anschließend erfolgt die manuelle Auswertung, indem die Sequenzen mit der Wildtyp-Zelllinie verglichen werden.

Als Referenzgenom wird das Human Reference Sequence GRCh37/hg19 des Genome Reference Consortiums verwendet. Eine Mutation wird als solche gewertet, wenn sie in beiden Richtungen auftritt und eine Variant Allele Frequency (VAF) über 10 % hat.

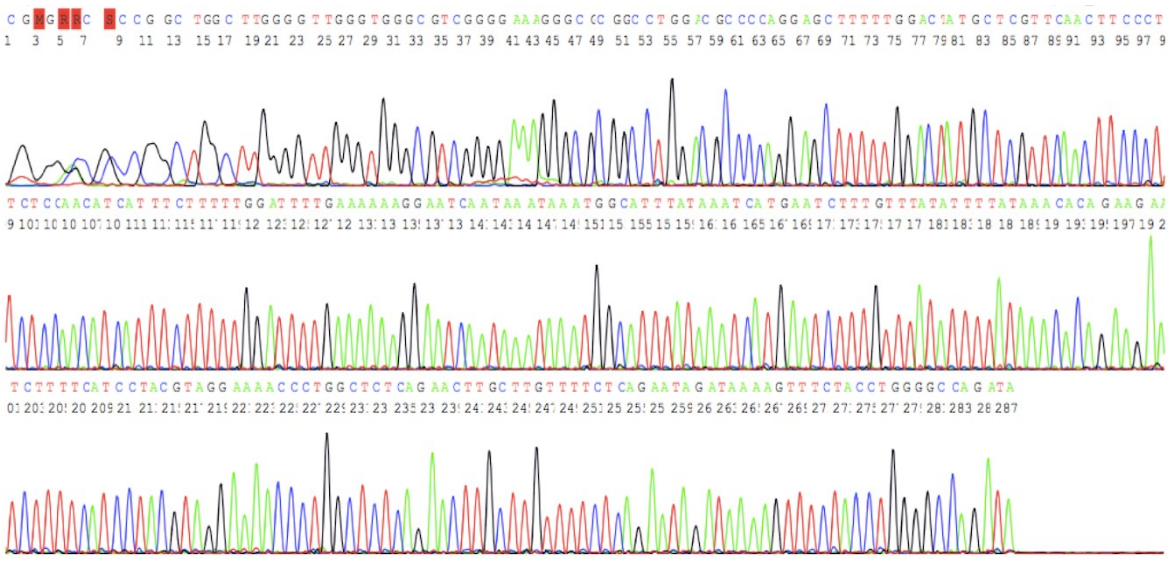

Abbildung 2: Vorwärts-Sequenz *NOTCH1 3'-UTR* Wildtyp

A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin

2.6 Statistische Methoden

Nach Erhebung der Mutationsprävalenz der *NOTCH1 3'-UTR* Mutation wurde diese mit genetischen und klinischen Daten der CLL11 Studie korreliert. Bei der statistischen Auswertung bestand eine enge Kooperation mit der DCLLSG. Es wurden univariate und multivariate Analysen zur prädiktiven und prognostischen Bedeutung der *NOTCH1 3'-UTR* Mutation erhoben. Das Signifikanzlevel wurde bei allen statistischen Untersuchungen auf 5 % festgelegt. Dichotome Variablen wurden mithilfe des Exakten Tests nach Fisher auf unabhängiges Auftreten getestet. Dies erfolgte über die Bildung einer Vier-Felder-Kontingenztafel (Mehta, Patel 1986). Wurde eine Korrelation mit kontinuierlichen Variablen (z. B. Leukozytenzahl) untersucht, erfolgte dies mit dem Wilcoxon-Test (Wilcoxon 1945).

Zur deskriptiven Darstellung des progressionsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens mit und ohne *NOTCH1 3'-UTR* Mutation der CLL11 Studie wurde die Kaplan-Meier-Methode verwendet. Bei dieser Methode konnten anhand der eingetretenen Ereignisse über die Zeit unter Berücksichtigung der zensierten Beobachtung der CLL11 Studie die Überlebensraten der Patienten gebildet werden. Wenn bei mehr als 50 % der Studienteilnehmer innerhalb des fünfjährigen Beobachtungszeitraums ein Ereignis eintrat, wurde der Median bestimmt. Beim Median handelt es sich um den Wert, der bei Auflistung der Zeitspannen des progressionsfreien Überlebens oder des Gesamtüberlebens der Studienteilnehmer nach der Größe in der Mitte zum Liegen kommt (Kaplan, Meier 1958). Zum statistischen Vergleich der Kaplan-Meier-Überlebenskurven der Patienten mit *NOTCH1 3'-UTR* Mutation und der Vergleichsgruppe ohne Mutation über den gesamten Beobachtungszeitraum wurde der Log-Rank-Test verwendet (Mantel 1966). Die Rate, mit der bei verschiedenen Patientengruppen ein Ereignis eintritt, wurde durch das Hazard beschrieben. Wenn man diese in ein Verhältnis setzt, erhält man die Hazard Ratio (HR) zweier Gruppen. Bei einem HR-Wert kleiner eins ist das Ereignisrisiko in der ersten Gruppe im Vergleich zur zweiten Gruppe geringer, bei einem Wert von eins gleich und bei einem Wert größer eins höher. Bei der Untersuchung des Einflusses von mehreren Variablen, wie der *NOTCH1 3'-UTR* Mutation und der codierenden *NOTCH1* Mutation auf das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben der Studienpopulation, wurde die Cox-Regression verwendet. Diese lässt bei konstanten HRs zwischen den Gruppen eine Aussage über die Signifikanz zu (Cox 1972).

3 Ergebnisse

3.1 *NOTCH1 3'-UTR* Mutation

Das *NOTCH1* Gen liegt auf dem Chromosom 9 und enthält 34 Exons und 33 Introns. Ein Exon repräsentiert einen Abschnitt der DNA, der über die Schritte der Transkription und Translation für ein Protein codiert. Ein Intron wird hingegen nach der Transkription aus der mRNA herausgespleißt und ist damit nicht-codierend. Nach einem Stopcodon auf Exon 34 beginnt die nicht-translatierte 3' Region des *NOTCH1* Gens. Diese umfasst insgesamt 1637 Nukleinbasen, in denen vor allem regulatorische Sequenzen liegen, die vielfältige Aufgaben in der Stabilität und Translation der mRNA haben. Durch Puente et al. wurden 2015 erstmals an drei verschiedenen Positionen auftretende DNA-Mutationen in der *NOTCH1 3'-UTR* Region bei der CLL beschrieben. Diese liegen in einem umschriebenen Bereich von zehn Basenpaaren (DNA-Abschnitt: Chr9:139390143 – 139390152). Zum Nachweis der Mutationen wurde im Rahmen dieser Dissertation eine Sanger-Sequenzierung der umliegenden, aus 306 Basenpaaren bestehenden Region durchgeführt.

Von den vorliegenden 700 Patientenproben der CLL11 Studie konnte bei 18 Patienten eine *NOTCH1 3'-UTR* Mutation nachgewiesen werden. Dies entsprach einem relativen Anteil von 2,6 %. Die Mutationen befanden sich an zwei charakteristischen DNA-Positionen. An der DNA-Position Chr9:139390152 waren 15 der 18 (83,3 %) Mutationen zu finden, 3 der 18 (16,7 %) Mutationen befanden sich an der Stelle Chr9:139390145. Keine Mutation wurde an der zuvor beschriebenen DNA-Position Chr9:139390143 gefunden. Bei den nachgewiesenen *NOTCH1 3'-UTR* Mutationen wurde jeweils die Purinbase Adenin durch die Purinbase Guanin substituiert, was der Definition einer Transition, einer Unterform der Punktmutation, entspricht.

Zusätzlich fanden sich zwei bisher nicht beschriebene Punktmutationen innerhalb der sequenzierten *NOTCH1 3'-UTR* Region. Bei einem Patienten ließ sich eine Substitution eines Guanins durch ein Cytosin an der DNA-Position Chr9:139390225 nachweisen. In der weiteren Abklärung fand sich die gleiche Substitution in der Keimbahn-DNA, die aus CD19-negativen Zellen des Patienten gewonnen wurde, sodass von einem nicht-tumorspezifischen Basenaustausch auszugehen ist. Da

bisher kein Einzelnukleotid-Polymorphismus an dieser DNA-Position beschrieben wurde, handelt es sich am wahrscheinlichsten um eine seltene nicht-pathogene Sequenzvariation. Eine weitere Patientenprobe zeigte an der DNA-Position Chr9:139390099 eine Substitution von Thymin durch Cytosin. Zur Spezifizierung wurde eine tumorfreie Probe aus CD19-negativen Zellen dieses Patienten sequenziert, in der keine Mutation nachgewiesen wurde. Infolgedessen ist von einer erworbenen, tumorspezifischen Veränderung auszugehen, die einer weiteren Abklärung bedarf. Da eine Auswirkung auf das Spleißen an dieser Position unklar ist und weitere Funktionsanalysen den Umfang dieser Arbeit überschreiten würden, wurde davon abgesehen, diese Probe in die nachfolgende Statistik aufzunehmen.

Tabelle 14: Aufstellung aller *NOTCH1 3'-UTR* Mutationen zum Startpunkt der CLL11 Studie
A: Adenin, G: Guanin, VAF: Variant Allele Frequency

Patient	DNA-Position	Basenaustausch	Mutationsart	VAF
1	Chr9:139390152	A > G	Punktmutation	100 %
2	Chr9:139390152	A > G	Punktmutation	50 %
3	Chr9:139390152	A > G	Punktmutation	50 %
4	Chr9:139390152	A > G	Punktmutation	50 %
5	Chr9:139390152	A > G	Punktmutation	50 %
6	Chr9:139390152	A > G	Punktmutation	50 %
7	Chr9:139390152	A > G	Punktmutation	50 %
8	Chr9:139390152	A > G	Punktmutation	50 %
9	Chr9:139390152	A > G	Punktmutation	50 %
10	Chr9:139390152	A > G	Punktmutation	50 %
11	Chr9:139390152	A > G	Punktmutation	30 %
12	Chr9:139390152	A > G	Punktmutation	25 %
13	Chr9:139390152	A > G	Punktmutation	25 %
14	Chr9:139390152	A > G	Punktmutation	20 %
15	Chr9:139390152	A > G	Punktmutation	15 %
16	Chr9:139390145	A > G	Punktmutation	30 %
17	Chr9:139390145	A > G	Punktmutation	25 %
18	Chr9:139390145	A > G	Punktmutation	20 %

3.1.1 Klinische und genetische Marker

Um die *NOTCH1 3'-UTR* Mutation zu charakterisieren, wurde sie mit klinischen und genetischen Markern der Patientenkohorte der CLL11 Studie assoziiert. Dabei wurden im Folgenden zum besseren Überblick die Begriffe *NOTCH1 3'-UTR^{mut}* bei einem mutierten (mut) und *NOTCH1 3'-UTR^{wt}* bei einem unmutierten (Wildtyp, wt) *NOTCH1 3'-UTR* Gen verwendet. In den Therapiearmen der CLL11 Studie waren jeweils neun Patienten mit einer *NOTCH1 3'-UTR* Mutation im R-Clb-Arm und im G-Clb-Arm zu finden. Im Clb-Arm fand sich kein Patient mit einer *NOTCH1 3'-UTR* Mutation.

Keine Korrelation zeigte sich zwischen dem Auftreten einer *NOTCH1 3'-UTR* Mutation und dem Alter, dem Geschlecht, dem klinischen Stadium nach Binet, dem ECOG-Status, dem CIRS-Score oder dem Vorhandensein einer B-Symptomatik. Hinsichtlich der absoluten Leukozytenzahl oder einer erhöhten Thymidinkinase als Laborparameter ließ sich ebenfalls kein Unterschied zwischen *NOTCH1 3'-UTR^{mut}*-Patienten und *NOTCH1 3'-UTR^{wt}*-Patienten feststellen. Bei Patienten mit einer *NOTCH1 3'-UTR* Mutation war signifikant häufiger ein erhöhtes β_2-Mikroglobulin nachweisbar. Einen Wert über 3,5 mg/l wiesen 11 der 18 (61,1 %) *NOTCH1 3'-UTR^{mut}*-Patienten auf, wohingegen das β_2-Mikroglobulin lediglich bei 257 der 673 (38,2 %) *NOTCH1 3'-UTR^{wt}*-Patienten erhöht war ($p = 0,049$).

Mit Blick auf die häufigen und prognostisch relevanten genomischen Aberrationen der CLL fanden sich weitere Assoziationen. Ein Zusammenhang präsentierte sich mit einem verminderten Vorkommen der günstigen prognostischen Deletion 13q bei Patienten mit einer *NOTCH1 3'-UTR* Mutation. Während die Deletion 13q bei 339 von 658 (51,5 %) *NOTCH1 3'-UTR^{wt}*-Patienten zu finden war, trat sie bei lediglich 5 von 18 (27,8 %) *NOTCH1 3'-UTR^{mut}*-Patienten auf ($p = 0,047$). Bei Patienten mit einer *NOTCH1 3'-UTR* Mutation war die Trisomie 12 überrepräsentiert. Bei insgesamt 126 der 658 (19,1 %) *NOTCH1 3'-UTR^{wt}*-Patienten wurde eine Trisomie 12 nachgewiesen, wohingegen 6 der 18 (33,3 %) *NOTCH1 3'-UTR^{mut}*-Patienten eine Trisomie 12 aufwiesen ($p = 0,138$).
Das Auftreten einer *TP53* Mutation und / oder einer Deletion 17p führt zu einer besonders ungünstigen Prognose der CLL. Hierbei zeigte sich ein nicht signifikantes, häufigeres gemeinsames Auftreten der beiden Veränderungen. Der

relative Anteil der Patienten mit einer *NOTCH1 3'-UTR* Mutation und einer *TP53* Mutation und / oder einer 17p Deletion von 22,2 % (4 von 18 Patienten) lag über dem Anteil der Wildtyp-Gruppe mit einer *TP53* und / oder 17p Deletion von 11,5 % (78 von 679 Patienten, p = 0,151). Keine Korrelation fand sich zwischen einer *NOTCH1 3'-UTR* Mutation und einer Deletion 11q, einer alleinigen Deletion 17p oder einer *TP53* Mutation.

Alle *NOTCH1 3'-UTR^{mut}*-Proben waren in der Patientengruppe mit einem unmutierten IGHV-Status zu finden (100 %). In der *NOTCH1 3'-UTR^{wt}*-Gruppe waren hingegen lediglich 410 der 656 Patienten im IGHV-Gen unmutiert, was einem Anteil von 62,5 % entspricht. Das exklusive Auftreten der *NOTCH1 3'-UTR* Mutation mit der höheren Risikogruppe eines unmutierten IGHV-Status war signifikant (p = 0,002). Der IGHV-Status und das β_2-Mikroglobulin gehen als etablierte prognostische Marker in den Internationalen CLL-Prognoseindex ein und waren beide signifikant mit einer *NOTCH1 3'-UTR* Mutation assoziiert. Dies führte mit dem gehäuften gemeinsamen Vorkommen mit einer *TP53* Mutation und / oder einer 17p Deletion dazu, dass Patienten mit einer *NOTCH1 3'-UTR* Mutation im Internationalen CLL-Prognoseindex häufiger in der hohen und sehr hohen Risikogruppe zu finden waren (p = 0,047).

Bezüglich der rekurrenten Mutationen imponierte bei allen 18 *NOTCH1 3'-UTR^{mut}*-Patienten eine Exklusivität zu einer *SF3B1* Mutation (0 %). Im Gegensatz hierzu trat die *SF3B1* Mutation bei 89 der 670 (13,3 %) *NOTCH1 3'-UTR^{wt}*-Patienten auf (p = 0,150). Die *NOTCH1 3'-UTR* Mutation trat nicht exklusiv zu den codierenden *NOTCH1* Mutationen auf. Bei 5 der 18 (27,8 %) *NOTCH1 3'-UTR^{mut}*-Patienten ließ sich eine codierende *NOTCH1* Mutation nachweisen, im Vergleich hierzu präsentierten 123 der 670 (18,4 %) *NOTCH1 3'-UTR^{wt}*-Patienten eine codierende *NOTCH1* Mutation (p = 0,353).

In der Übersicht lässt sich feststellen, dass alle *NOTCH1 3'-UTR^{mut}*-Patienten zu der Risikogruppe eines unmutierten IGHV-Status gehörten (p = 0,002). Unter anderem durch die Assoziation mit einem erhöhten β_2-Mikroglobulin (p = 0,049) waren die Patienten mit einer *NOTCH1 3'-UTR* Mutation häufiger in der hohen und sehr hohen Risikogruppe im Internationalen CLL-Prognoseindex zu finden.

Tabelle 15: Übersicht der Korrelation der *NOTCH1 3'-UTR* Mutation mit klinischen und genetischen Markern in der CLL11 Studie

CLL-IPI: Internationaler CLL-Prognoseindex, cod.: codierend, Del.: Deletion, IGHV: Variable Regionen der Immunglobulinschwerketten

Klinische und genetische Marker	Patienten ohne *NOTCH1 3'-UTR* Mutation	Patienten mit *NOTCH1 3'-UTR* Mutation	p-Wert
β_2-Mikroglobulin > 3,5 mg/l	257 / 673 (38,2 %)	11 / 18 (61,1 %)	0,049
Del. 13q	339 / 658 (51,5 %)	5 / 18 (27,8 %)	0,047
Del. 17p + / - *TP53* Mutation	78 / 679 (11,5 %)	4 / 18 (22,2 %)	0,151
IGHV-Status	410 / 656 (62,5 %)	17 / 17 (100 %)	0,002
SF3B1 Mutation	89 / 670 (13,3 %)	0 / 18 (0,0 %)	0,150
Cod. *NOTCH1* Mutation	123 / 670 (18,4 %)	5 / 18 (27,8 %)	0,353
CLL-IPI hoch	348 / 670 (51,9 %)	12 / 18 (66,7 %)	0,047
CLL-IPI sehr hoch	59 / 670 (8,8 %)	4 / 18 (22,2 %)	

3.1.2 Therapieansprechen und molekulare Remission

Aufgrund des prospektiven und dreiarmig randomisierten Studiendesigns der CLL11 Studie konnten Daten über das Therapieansprechen und die molekulare Remission der Patienten sowohl in der gesamten Studienpopulation als auch in den einzelnen Therapiearmen gewonnen werden. Es wurde zwischen einer vollständigen Remission, einer partiellen Remission und einem Nicht-Ansprechen unterschieden.

In der gesamten Studienpopulation konnte kein Einfluss einer *NOTCH1 3'-UTR* Mutation auf das Therapieansprechen festgestellt werden (p = 0,487). Bei Patienten mit einer *NOTCH1 3'-UTR* Mutation erreichten 25 % (n = 4) eine vollständige und 62,5 % (n = 10) eine partielle Remission. Bei Patienten ohne eine *NOTCH1 3'-UTR* Mutation wurde eine vollständige Remission bei 18,1 % (n = 603) und eine partielle Remission bei 57,2 % (n = 345) der Patienten erreicht. Bei einem relativen Anteil von 24,7 % (n = 149) der *NOTCH1 3'-UTR*^{wt}-Patienten und von 12,5 % (n = 2) der *NOTCH1 3'-UTR*^{mut}-Patienten kam es zu keinem Ansprechen auf die Therapie. Bei 11,6 % (n = 79) der *NOTCH1 3'-UTR*^{wt}-Gruppe und 11,1 % (n = 2) der *NOTCH1 3'-UTR*^{mut}-Gruppe lagen keine Daten zum Therapieansprechen vor. Innerhalb der Therapiearme ließ sich ebenfalls kein Einfluss einer *NOTCH1 3'-UTR* Mutation auf das Therapieansprechen nachweisen. Im direkten Vergleich der

Interventionsarme war das Therapieansprechen der Patienten unter der Behandlung mit Obinutuzumab und Chlorambucil im Vergleich zu Rituximab und Chlorambucil zwar verbessert, dieser Zusammenhang war allerdings nicht signifikant (p = 0,223, siehe Tabelle 16).

Tabelle 16: Darstellung des Therapieansprechens der *NOTCH1 3'-UTR^{mut}*-Patienten in den Interventionsarmen der CLL11 Studie

Keine Daten: R-Clb-Arm: 1 von 9 Patienten (11,1 %), G-Clb-Arm: 1 von 9 Patienten (11,1 %)

G-Clb: Obinutuzumab-Chlorambucil, mut: mutiert, n: Patientenzahl, R-Clb: Rituximab-Chlorambucil

Therapieansprechen	**R-Clb n = 9**	**G-Clb n = 9**	**p-Wert**
Vollständige Remission	1 / 8 (12,5 %)	3 / 8 (37,5 %)	0,223
Partielle Remission	5 / 8 (62,5 %)	5 / 8 (62,5 %)	
Nicht-Ansprechen	2 / 8 (25,0 %)	0 / 8 (0,0 %)	

Ein definierter sekundärer Endpunkt der CLL11 Studie war der Anteil der Patienten in molekularer Remission. Die molekulare Remission wurde über die Bestimmung der minimalen Resterkrankung (MRD) definiert. Als MRD-negativ wurde ein Patient bei einem Nachweis von weniger als einer CLL-Zelle in 10000 Leukozyten eingestuft. Untersucht wurde dies in einer Blutprobe des Patienten oder bei Vorliegen einer vollständigen Remission in einer Knochenmarksprobe.

In der gesamten Studienpopulation erreichten Patienten mit einer *NOTCH1 3'-UTR* Mutation signifikant häufiger eine MRD-Negativität (p = 0,043). Zu dieser kam es bei 6 von 17 (35,3 %) *NOTCH1 3'-UTR^{mut}*-Patienten, im Vergleich zu 77 von 492 (15,7 %) *NOTCH1 3-UTR^{wt}*-Patienten. In der *NOTCH1 3'-UTR^{mut}*-Gruppe fehlten Daten zu einer (5,6 %) Probe und in der *NOTCH1 3-UTR^{wt}*-Gruppe zu 190 (27,9 %) Proben.

Nach Behandlung mit Rituximab und Chlorambucil wurde bei 1 von 9 (11,1 %) der *NOTCH1 3'-UTR^{mut}*-Patienten und bei 7 von 212 (3,3 %) der *NOTCH1 3'-UTR^{wt}*-Patienten eine MRD-Negativität festgestellt. Damit zeigte sich mit einem p-Wert von 0,287 kein Einfluss einer *NOTCH1 3'-UTR* Mutation auf das Erreichen einer MRD-Negativität im R-Clb-Arm. Eine Tendenz zu einer erhöhten Rate an MRD-Negativität der Patienten mit einer *NOTCH1 3'-UTR* Mutation im Vergleich zu der Wildtyp-Gruppe konnte unter der Therapie mit Obinutuzumab und Chlorambucil festgestellt werden. So erreichten im G-Clb-Arm 5 von 8 (62,5 %) der *NOTCH1 3'-UTR^{mut}*-

Patienten eine MRD-Negativität im Vergleich zu 70 von 203 (34,5 %) der *NOTCH1 3'-UTR*^{wt}-Patienten (p = 0,136). Dies spiegelte sich auch im direkten Vergleich der Therapiearme wieder. Bei Vorliegen einer *NOTCH1 3'-UTR* Mutation wurde im G-Clb-Arm im Vergleich zum R-Clb-Arm signifikant häufiger eine MRD-Negativität erreicht (62,5 % vs. 11,1 %, p = 0,050). Zu berücksichtigen ist, dass auch in der Gesamtzahl der Patienten der CLL11 Studie der G-Clb-Arm im Vergleich zum R-Clb-Arm eine signifikant höhere Rate an MRD-negativen Patienten aufwies (37,7 % vs. 3,3 %, p < 0,001).

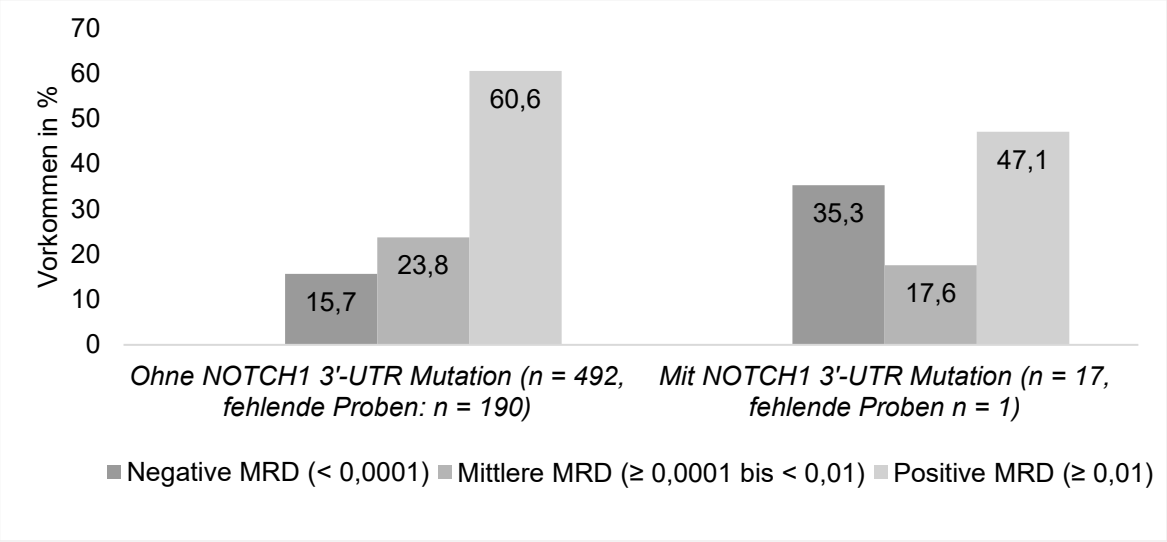

Abbildung 3: Säulendiagramm zur Darstellung der minimalen Resterkrankung mit und ohne *NOTCH1 3'-UTR* Mutation in der CLL11 Studie (p = 0,0098)

Definiert ist eine negative MRD als Nachweis von weniger als einer CLL-Zelle in 10000 Leukozyten. CLL: chronische lymphatische Leukämie, MRD: Minimale Resterkrankung, n: Patientenzahl

Zusammenfassend hatte eine *NOTCH1 3'-UTR* Mutation keinen Einfluss auf das Therapieansprechen in der gesamten Studienpopulation. Demgegenüber wurde bei Patienten mit einer *NOTCH1 3'-UTR* Mutation im Vergleich zur Wildtyp-Gruppe signifikant häufiger eine MRD-Negativität erreicht (p = 0,043). Diese war vor allem bei G-Clb nachweisbar (p = 0,050).

3.1.3 Progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben

Das progressionsfreie Überleben war der primäre Endpunkt und das Gesamtüberleben ein sekundärer Endpunkt der CLL11 Studie. Das progressionsfreie Überleben war definiert als die Zeitspanne zwischen der Randomisierung der Patienten bis zum Auftreten der Ereignisse Progression, Rückfall oder Tod. Dabei lag die mediane Beobachtungszeit der CLL11 Studie bei 62,5 Monaten.

Das mediane progressionsfreie Überleben der Patienten mit einer *NOTCH1 3'-UTR* Mutation lag bei 15,3 Monaten, im Vergleich zu einem progressionsfreien Überleben von 19,2 Monaten in der Wildtyp-Gruppe (HR: 1,019, Konfidenzintervall: 0,610 - 1,702, p = 0,943). Damit hatten *NOTCH1 3'-UTR* Mutationen als ein alleiniger Faktor keinen signifikanten Einfluss auf das progressionsfreie Überleben. Da *NOTCH1 3'-UTR* Mutationen in der univariaten Analyse nicht mit einem signifikant verkürzten progressionsfreien Überleben assoziiert waren, wurden diese nicht in eine multivariate Analyse eingeschlossen. Die *NOTCH1 3'-UTR* Mutationen wurden nicht als ein unabhängiger prognostischer Marker des progressionsfreien Überlebens der CLL identifiziert.

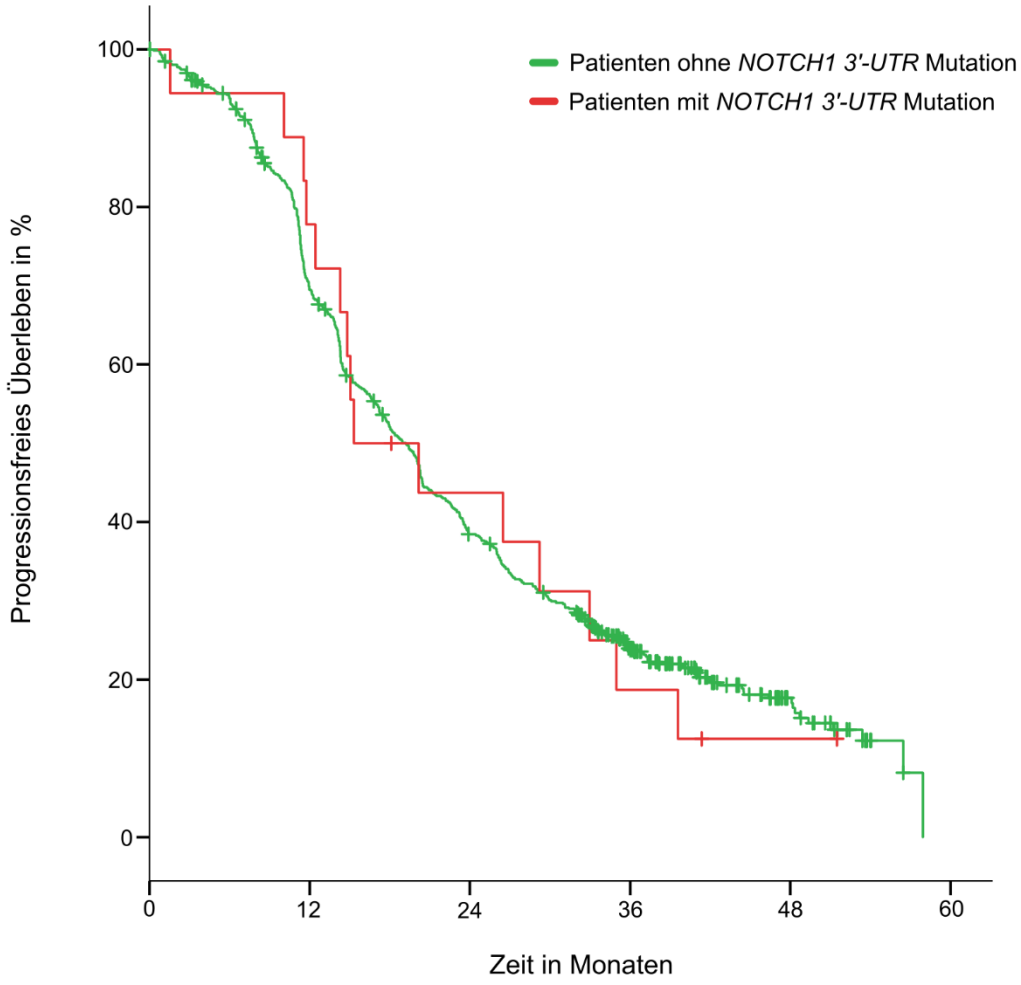

Abbildung 4: Kaplan-Meier-Kurve des progressionsfreien Überlebens der CLL11 Studienpopulation mit und ohne *NOTCH1 3'-UTR* Mutation

CLL11 Studienpopulation: n = 700, davon mit *NOTCH1 3'-UTR* Mutation: n = 18, ohne *NOTCH1 3'-UTR* Mutation: n = 682, p = 0,943 (log-rank)

n: Patientenzahl

Das Gesamtüberleben war definiert als Zeitraum in Monaten zwischen der Randomisierung der Patienten bis zum Tod. Das mediane Überleben der *NOTCH1 3'-UTR*^{wt}-Gruppe lag bei 58,5 Monaten und wurde in der *NOTCH1 3'-UTR*^{mut}-Gruppe nicht erreicht. Von 18 Patienten in der *NOTCH1 3'-UTR*^{mut}-Gruppe lebten nach drei Jahren noch 63,2 %, in der *NOTCH1 3'-UTR*^{wt}-Gruppe von 682 Patienten noch 77,8 % (HR: 1,476, Konfidenzintervall: 0,694 – 3,139, p = 0,312). Damit hatte eine *NOTCH1 3'-UTR* Mutation in der univariaten Analyse bei einem Nachbeobachtungszeitraum von fünf Jahren keinen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patienten der CLL11 Studie (p = 0,309). Bei fehlender univariater Signifikanz wurde keine multivariate Analyse durchgeführt. Die *NOTCH1*

3'-UTR Mutationen waren kein unabhängiger prognostischer Marker des Gesamtüberlebens.

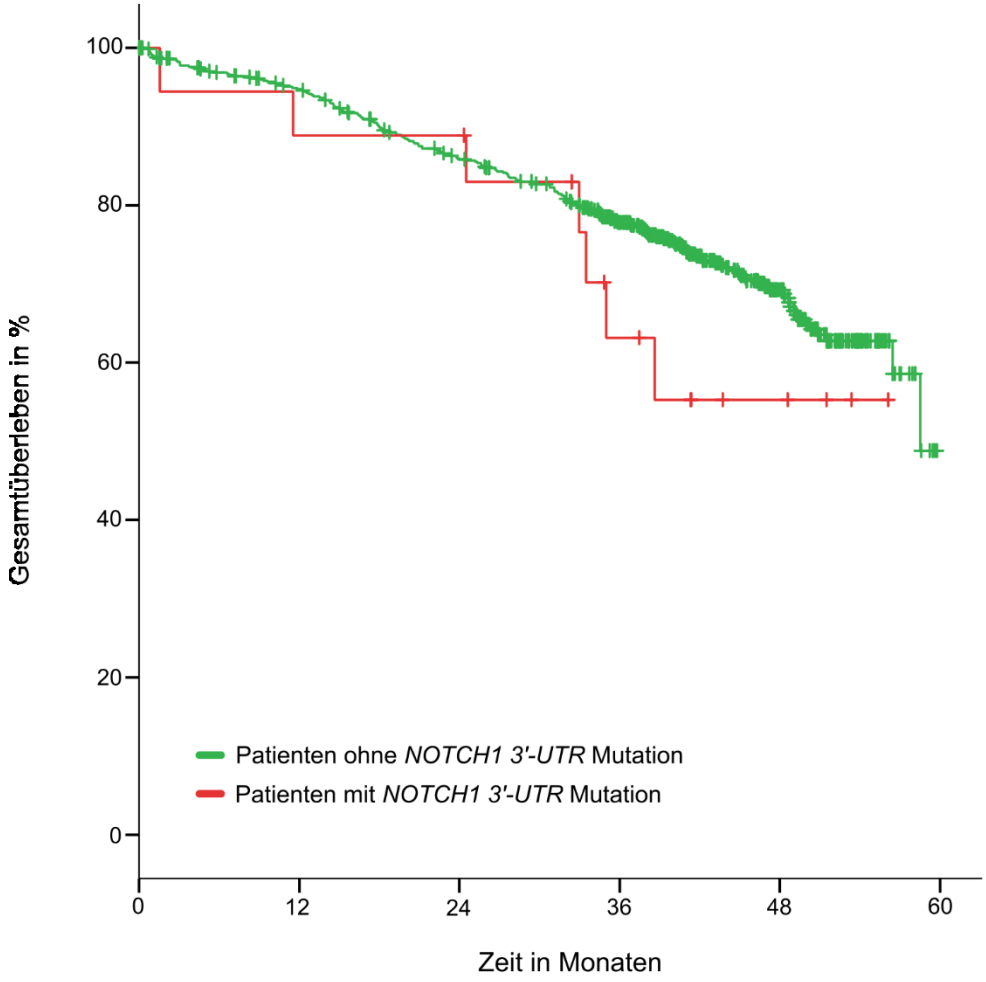

Abbildung 5: Kaplan-Meier-Kurve des Gesamtüberlebens der CLL11 Studienpopulation mit und ohne *NOTCH1 3'-UTR* Mutation

CLL11 Studienpopulation: n = 700, davon mit *NOTCH1 3'-UTR* Mutation: n = 18, ohne *NOTCH1 3'-UTR* Mutation: n = 682, p = 0,309 (log-rank)

n: Patientenzahl

Zusammengefasst hatten *NOTCH1 3'-UTR* Mutationen als alleiniges Merkmal weder einen signifikanten Einfluss auf das progressionsfreie Überleben noch auf das Gesamtüberleben der CLL11 Studienpopulation.

3.1.4 Progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben in den Therapiearmen

Der Einfluss einer *NOTCH1 3'-UTR* Mutation auf das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben konnte innerhalb der drei Therapiearme G-Clb, R-Clb und Clb der CLL11 Studie untersucht werden.

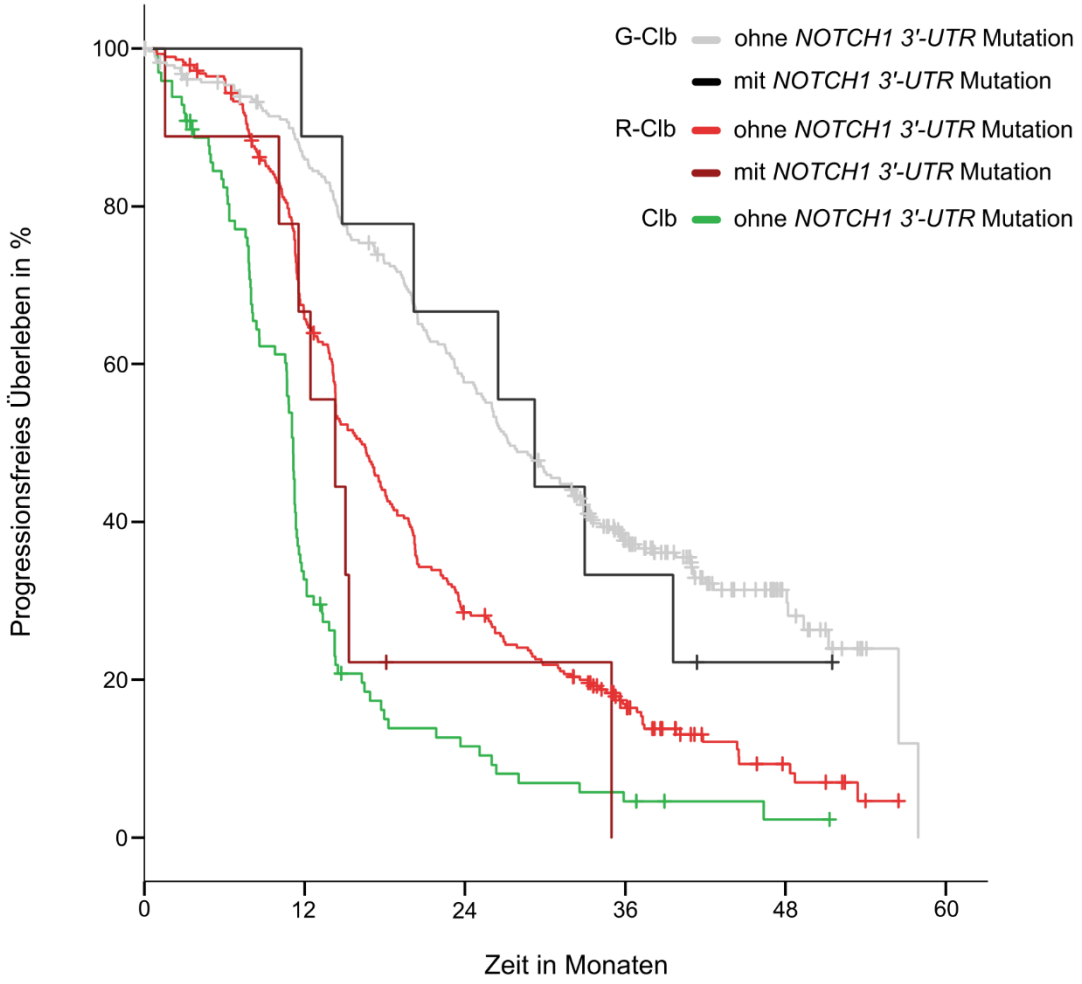

Abbildung 6: Kaplan-Meier-Kurve des progressionsfreien Überlebens der CLL11 Studienpopulation mit und ohne *NOTCH1 3'-UTR* Mutation in den Therapiearmen G-Clb, R-Clb und Clb

CLL11 Studienpopulation: n = 700, davon in G-Clb ohne *NOTCH1 3'-UTR* Mutation: n = 294, G-Clb mit *NOTCH1 3'-UTR* Mutation: n = 9, R-Clb ohne *NOTCH1 3'-UTR* Mutation: n = 288, R-Clb mit *NOTCH1 3'-UTR* Mutation: n = 9, Clb ohne *NOTCH1 3'-UTR* Mutation: n = 100, $p < 0{,}001$ (log-rank) Clb: Chlorambucil, G-Clb: Obinutuzumab-Chlorambucil, n: Patientenzahl, R-Clb: Rituximab-Chlorambucil

Das mediane progressionsfreie Überleben von *NOTCH1 3'-UTR*^{wt}-Patienten im R-Clb-Arm lag bei 16,3 Monaten im Vergleich zu 14,3 Monaten in der *NOTCH1 3'-UTR*^{mut}-Gruppe (HR: 1,479, Konfidenzintervall: 0,730 - 3,000, p = 0,278). Damit zeigte sich unter der Behandlung mit Rituximab und Chlorambucil durch die *NOTCH1 3'-UTR* Mutation kein prognostischer Einfluss auf das progressionsfreie Überleben. Im G-Clb-Therapiearm ließ sich bei einer HR von 1,064 (Konfidenzintervall: 0,500 - 2,265) ebenfalls kein Unterschied hinsichtlich des progressionsfreien Überlebens bei einem *NOTCH1 3'-UTR*^{mut}-Patienten oder *NOTCH1 3'-UTR*^{wt}-Patienten feststellen (p = 0,872). Wie in der Gesamtkohorte wurde innerhalb der Subgruppe der Patienten mit einer *NOTCH1 3'-UTR* Mutation eine Überlegenheit der Behandlung mit G-Clb gegenüber der Behandlung mit R-Clb erkannt (HR: 0,325, Konfidenzintervall: 0,107 - 0,984, p = 0,047).

Unter der Therapie mit Rituximab und Chlorambucil hatten Patienten mit *NOTCH1 3'-UTR* Mutation ein ähnliches Gesamtüberleben wie Patienten ohne Mutation. In der Tendenz verkürzte eine *NOTCH1 3-UTR* Mutation unter der Behandlung mit Rituximab und Chlorambucil zwar das Gesamtüberleben der Patienten, für signifikante Unterschiede war allerdings die Fallzahl zu niedrig. Unter der Therapie mit Obinutuzumab und Chlorambucil ließ sich kein Einfluss einer *NOTCH1 3'-UTR* Mutation auf das Gesamtüberleben darstellen. Im R-Clb-Arm lag die HR bezüglich eines mutierten oder unmutierten *NOTCH1 3'-UTR* Status bei 2,144 (Konfidenzintervall: 0,722 - 5,787, p = 0,145), im G-Clb-Arm bei 1,190 (Konfidenzintervall: 0,374 - 3,787, p = 0,768). Im direkten Vergleich der beiden Therapiearme (R-Clb vs. G-Clb) in der *NOTCH1 3'-UTR*^{mut}-Patientengruppe war das Ereignisrisiko im R-Clb-Arm erhöht, allerdings ohne dass eine signifikante Assoziation festgestellt wurde (HR: 2,145, Konfidenzintervall: 0,469 - 9,814, p = 0,325).

Tabelle 17: Übersicht des Gesamtüberlebens der Patienten mit und ohne *NOTCH1 3'-UTR* Mutation in den Therapiearmen der CLL11 Studie

E: Ereignisse, G-Clb: Obinutuzumab-Chlorambucil, HR: Hazard Ratio, JÜ: Jahresüberleben, n: Patientenzahl, R-Clb: Rituximab-Chlorambucil, Th.-Arm: Therapiearm

Th.-Arm	*NOTCH1 3'-UTR*	n	E	1-JÜ	2-JÜ	3-JÜ	HR	p-Wert
R-Clb	mit	9	4	77,8 %	77,8 %	51,9 %	2,144 (0,722 - 5,787)	0,145
	ohne	288	83	95,1 %	83,2 %	76,2 %		
G-Clb	mit	9	3	100 %	100 %	75 %	1,190 (0,374 - 3,787)	0,768
	ohne	294	68	94,3 %	89,6 %	81,6 %		

Zusammenfassend verkürzte das Vorliegen einer *NOTCH1 3'-UTR* Mutation im R-Clb-Arm tendenziell das Gesamtüberleben der Patienten im Vergleich zur *NOTCH1 3'-UTR^{wt}*-Gruppe, dieser Zusammenhang ergab sich jedoch nicht für das progressionsfreie Überleben. Im G-Clb-Arm ließ sich kein Einfluss einer *NOTCH1 3'-UTR* Mutation auf diese beiden klinischen Endpunkte darstellen. Innerhalb der *NOTCH1 3'-UTR^{mut}*-Patientengruppe verlängerte die Behandlung mit G-Clb im Vergleich zur Behandlung mit R-Clb das progressionsfreie Überleben signifikant (HR: 0,325, p = 0,047). Für das Gesamtüberleben konnte bei Vorliegen einer *NOTCH1 3'-UTR* Mutation keine signifikante Überlegenheit nachgewiesen werden (HR: 0,466, p = 0,325).

3.1.5 Klonale Evolution

In der CLL11 Studie erfolgte die Gewinnung von Tumormaterial aus peripherem Blut zum Zeitpunkt des Screenings bei Studieneintritt der Patienten und erneut bei Auftreten eines möglichen Progresses. Es lagen 367 Proben von Patienten mit einem aufgetretenen Progress vor. Diese Proben wurden mittels Sanger-Sequenzierung auf eine Mutation im *NOTCH1 3'-UTR* Bereich des *NOTCH1* Gens untersucht. Hierbei wurde bei 6 von 367 (1,6 %) Patienten eine *NOTCH1 3'-UTR* Mutation gefunden, verglichen mit 18 von 700 (2,6 %) *NOTCH1 3'-UTR^{mut}*-Patienten zum Zeitpunkt des Screenings. Folglich zeigte sich innerhalb dieser Vergleichskollektive eine abnehmende Prävalenz im Zeitverlauf der CLL11 Studie. Bei allen sechs Patienten, die zu diesem späteren Zeitpunkt der CLL11 Studie eine

NOTCH1 3'-UTR Mutation aufwiesen, ließ sich diese bereits zum Zeitpunkt des Studieneintritts nachweisen. Es traten keine neuen *NOTCH1 3'-UTR* Mutationen im CLL11 Studienverlauf auf. Von den zum Studieneintritt gefundenen 18 *NOTCH1 3'-UTR* Mutationen lag von neun Patienten eine Probe bei Progress vor. Sechs dieser Patienten wiesen auch zu diesem späteren Zeitpunkt eine *NOTCH1 3'-UTR* Mutation auf. Bei allen sechs Patienten zeigte sich eine abnehmende VAF im Zeitverlauf. Bei drei Patienten (Pat. 11, 13 und 15), die zum Studieneintritt eine *NOTCH1 3'-UTR* Mutation aufwiesen, ließ sich zum Zeitpunkt des Progresses keine Mutation mehr nachweisen (VAF unter 10 %).

Tabelle 18: Darstellung der klonalen Evolution der *NOTCH1 3'-UTR* Mutation anhand der VAF zum Zeitpunkt des Studieneintritts und bei Progress in der CLL11 Studie

Von 18 *NOTCH1 3'-UTR*^{mut}-Patienten zum Zeitpunkt des Studieneintritts lagen bei der Hälfte (n = 9) Proben zum Zeitpunkt des Progresses vor und wurden anhand der VAF verglichen.

A: Adenin, G: Guanin, mut: mutiert, n: Patientenzahl, VAF: Variant Allele Frequency

Patient	DNA-Position	Punktmutation	VAF zum Studieneintritt	VAF bei Progress
1	Chr9:139390152	A > G	100 %	10 %
2	Chr9:139390152	A > G	50 %	40 %
3	Chr9:139390152	A > G	50 %	15 %
4	Chr9:139390152	A > G	50 %	50 %
11	Chr9:139390152	A > G	30 %	< 10 %
12	Chr9:139390152	A > G	25 %	20 %
13	Chr9:139390152	A > G	25 %	< 10 %
15	Chr9:139390152	A > G	15 %	< 10 %
18	Chr9:139390145	A > G	20 %	10 %

3.2 *NOTCH1 3'-UTR* Mutation und die codierende *NOTCH1* Mutation

Bei der CLL sind *NOTCH1* Mutationen bisher vor allem im codierenden Exon 34 des *NOTCH1* Gens beschrieben und charakterisiert worden. Diese codierenden *NOTCH1* Mutationen fanden sich in der CLL11 Studie bei 128 von 688 (18,6 %) Patienten. Die nicht-codierenden *NOTCH1 3'-UTR* Mutationen wurden bei 18 von 700 (2,6 %) Patienten nachgewiesen. Die nicht-codierenden *NOTCH1 3'-UTR*

Mutationen erweiterten die Gruppe der codierenden *NOTCH1* Mutationen in der CLL11 Studie um knapp 10 %. Damit stieg die relative Zahl der *NOTCH1* Mutationen in der CLL11 Studie von 18,6 % auf 20,5 %.

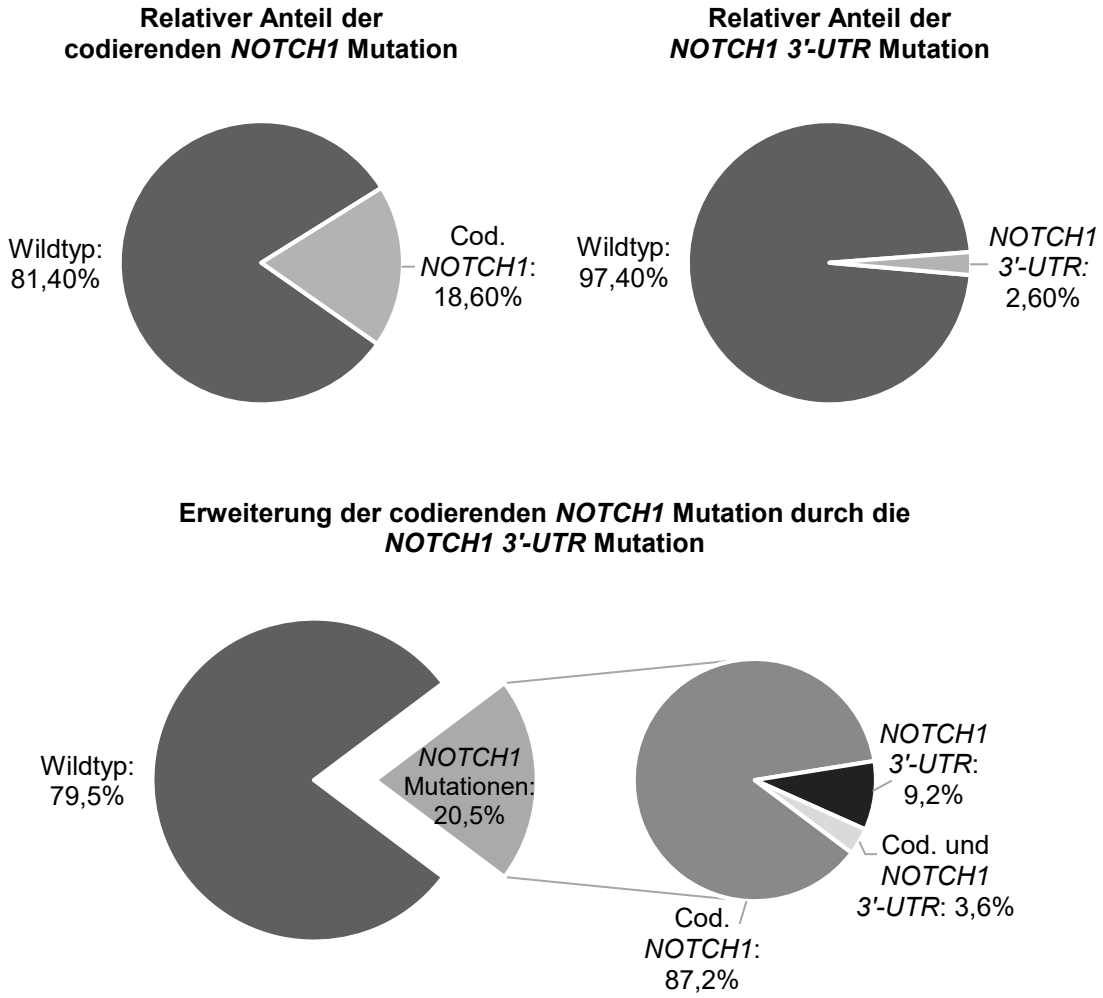

Abbildung 7: Kreisdiagramme zur Darstellung des relativen Anteils der codierenden *NOTCH1* Mutation und der *NOTCH1 3'-UTR* Mutation an der CLL11 Studienpopulation sowie zur Demonstration der relativen Erweiterung der codierenden *NOTCH1* Mutation durch die *NOTCH1 3'-UTR* Mutation in der CLL11 Studie

Codierende *NOTCH1* Mutation: 128 von 688 Patienten (18,6 %), nicht-codierende *NOTCH1 3'-UTR* Mutation: 18 von 700 Patienten (2,6 %), codierende und nicht-codierende *NOTCH1* Mutation: 5 von 700 Patienten (0,7 %)

cod.: codierend

3.2.1 Nicht-exklusives Auftreten

In der näheren Betrachtung hatten 5 der 18 (27,8 %) Patienten mit einer Mutation in der nicht-codierenden *NOTCH1 3'-UTR* Region auch eine Mutation im codierenden Exon 34 des *NOTCH1* Gens. Dieses nicht-exklusive Auftreten der

NOTCH1 3'-UTR und der codierenden *NOTCH1* Mutation wurde einer genaueren Analyse zugeführt. Für drei der fünf Patienten (Pat. 11, 13 und 15) mit gleichzeitig codierender und nicht-codierender *NOTCH1* Mutation gab es eine Tumorprobe zum Zeitpunkt des Screenings und des Progresses der CLL11 Studie. Dabei fiel auf, dass bei diesen drei Patienten die zum Studieneintritt vorhandenen *NOTCH1 3'-UTR* Mutationen zum Zeitpunkt des Progresses nicht mehr nachgewiesen werden konnten. Die codierenden *NOTCH1* Mutationen waren hingegen bei allen drei Proben zu beiden Zeitpunkten nachweisbar. Bei zwei von drei Proben nahmen die nachgewiesenen codierenden *NOTCH1* Mutationen in ihrer VAF zu. Bei diesen beiden Patientenproben (Pat. 11 und 13) waren zum Zeitpunkt des Progresses neue Mutationen im codierenden Teil des *NOTCH1* Gens nachweisbar, die zum Zeitpunkt des Screenings nicht vorhanden waren. Damit nahm in der Verlaufsuntersuchung die Größe der Subklone mit einer codierenden Mutation zu, während die Klonlinie mit einer nicht-codierenden *NOTCH1 3'-UTR* Mutation abnahm beziehungsweise nicht nachweisbar war.

3.2.2 Progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben

Eine zentrale Zielsetzung der vorliegenden Dissertation war der Vergleich der klinischen Endpunkte der nicht-codierenden und der codierenden *NOTCH1* Mutation. In der statistischen Analyse wurden aus der *NOTCH1* Kohorte verschiedene Gruppen gebildet. Auf der einen Seite stand die Patientengruppe, die ausschließlich im codierenden Bereich des *NOTCH1* Gens mutiert war (n = 123), auf der anderen Seite die Patientengruppe, die ausschließlich im nicht-codierenden Bereich des *NOTCH1* Gens mutiert war (n = 13). Die dritte Patientengruppe (n = 5) definierte sich über das gleichzeitige Vorliegen einer codierenden und einer nicht-codierenden *NOTCH1* Mutation. Diese drei Gruppen wurden mit der Wildtyp-Gruppe (n = 547) verglichen.

Hinsichtlich des progressionsfreien Überlebens zeigten die Patientengruppen mit einer codierenden oder einer nicht-codierenden *NOTCH1* Mutation einen ähnlichen Krankheitsverlauf. Während das mediane progressionsfreie Überleben der Wildtyp-Gruppe bei 19,7 Monaten lag, war das der codierenden *NOTCH1* Mutation mit 14,3 Monaten und das der nicht-codierenden *NOTCH1 3'-UTR* Mutation mit 15,0 Monaten jeweils verkürzt. Innerhalb von drei Jahren kam es bei 81,8 % der

Patienten mit einer codierenden *NOTCH1* Mutation und bei 84,6 % der Patienten mit einer *NOTCH1 3'-UTR* Mutation zu einem Krankheitsprogress im Vergleich zu 75,6 % der Patienten der Wildtyp-Gruppe. Damit kam es bei einem mutierten *NOTCH1* Gen (codierend oder nicht-codierend) zu einem verkürzten progressionsfreien Überleben der Patienten im Vergleich zur Wildtyp-Gruppe. Die Unterschiede zwischen den drei in *NOTCH1* mutierten Gruppen waren nicht signifikant.

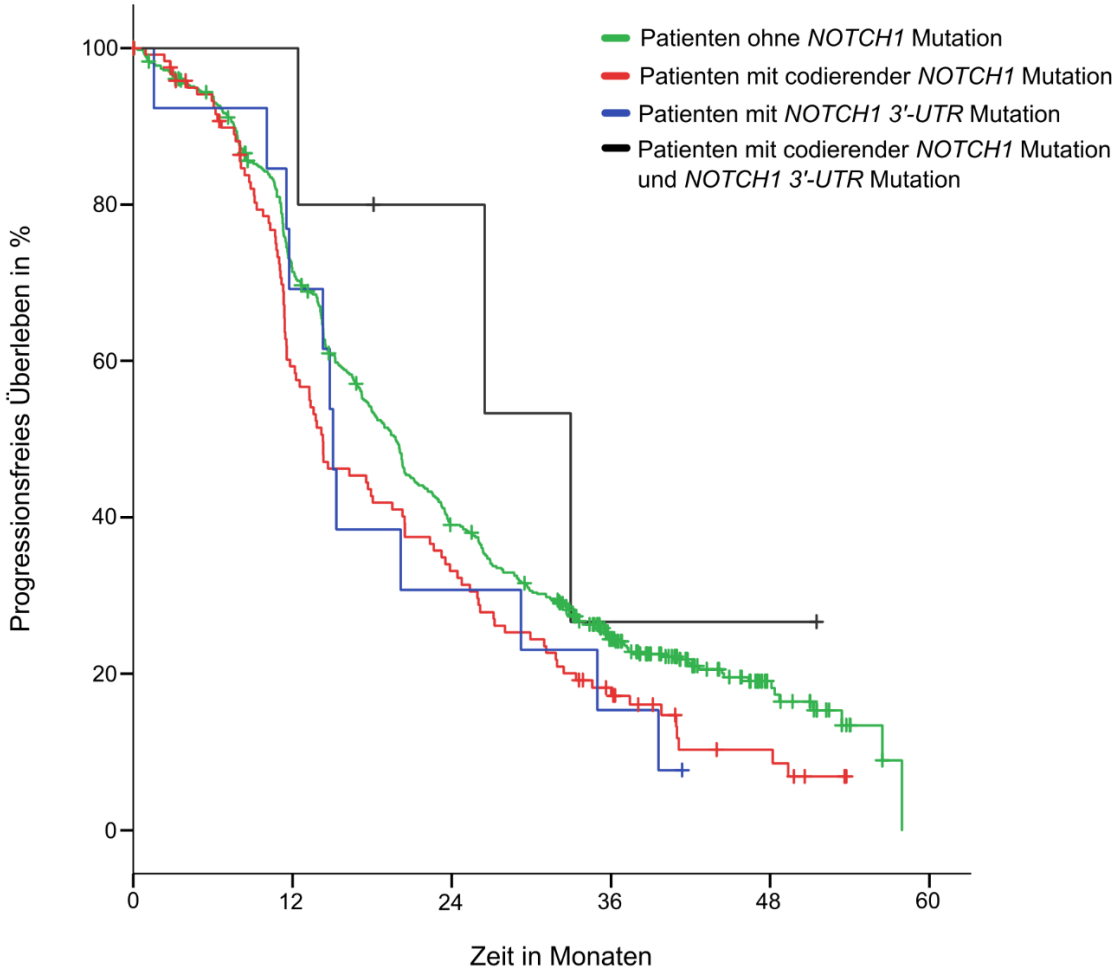

Abbildung 8: Kaplan-Meier-Kurve des progressionsfreien Überlebens der Patienten mit einer codierenden *NOTCH1* Mutation oder einer *NOTCH1 3'-UTR* Mutation oder dem Vorliegen beider Mutationen im Vergleich zu Patienten ohne *NOTCH1* Mutation in der CLL11 Studie

CLL11 Studienpopulation: n = 688, davon mit codierender *NOTCH1* Mutation: n = 123, mit *NOTCH1 3'-UTR* Mutation: n = 13, mit codierender *NOTCH1* Mutation und *NOTCH1 3'-UTR* Mutation: n = 5, ohne *NOTCH1* Mutation: n = 547, p = 0,044 (log-rank)

n: Patientenzahl

Ebenfalls ausgewertet wurde das Gesamtüberleben der Patienten der CLL11 Studie im Hinblick auf den Mutationstatus der verschiedenen *NOTCH1* Mutationen. In der Kohorte mit einer codierenden *NOTCH1* Mutation zeigten die Patienten ein ähnliches Gesamtüberleben wie die Patienten der Kohorte mit einer *NOTCH1 3'-UTR* Mutation. Das Gesamtüberleben lag in beiden Gruppen mit je einer Form der *NOTCH1* Mutation unterhalb des Gesamtüberlebens der Wildtyp-Gruppe. Demzufolge überlebten in der Wildtyp-Gruppe nach drei Jahren 78,8 % der Patienten im Gegensatz zu 71,2 % der Patienten mit einer codierenden *NOTCH1* Mutation und 68,4 % der Patienten mit einer *NOTCH1 3'-UTR* Mutation.

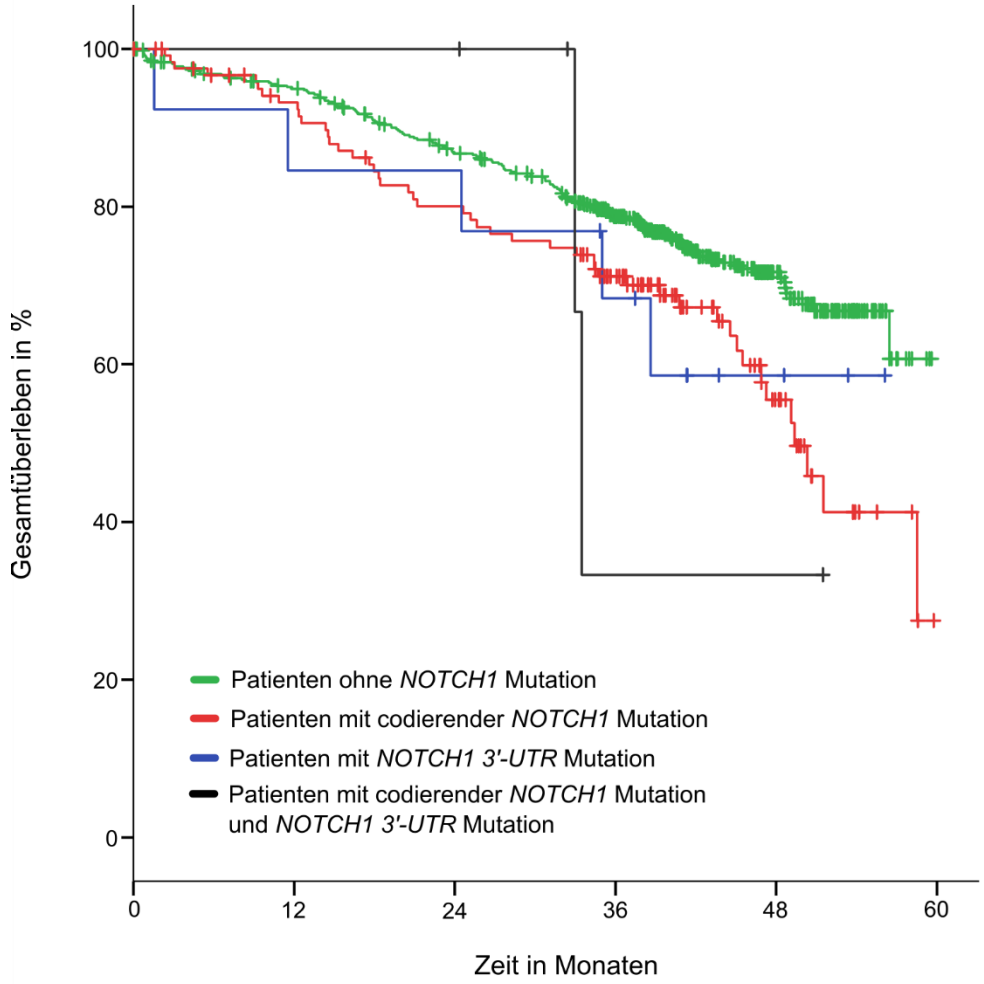

Abbildung 9: Kaplan-Meier-Kurve des Gesamtüberlebens der Patienten mit einer codierenden *NOTCH1* Mutation oder einer *NOTCH1 3'-UTR* Mutation oder dem Vorliegen beider Mutationen im Vergleich zu Patienten ohne *NOTCH1* Mutation in der CLL11 Studie

CLL11 Studienpopulation: n = 688, davon mit codierender *NOTCH1* Mutation: n = 123, mit *NOTCH1 3'-UTR* Mutation: n = 13, mit codierender *NOTCH1* Mutation und *NOTCH1 3'-UTR* Mutation: n = 5, ohne *NOTCH1* Mutation: n = 547, p = 0,025 (log-rank)

n: Patientenzahl

Eine Kohorte von 141 Patienten hatte nachgewiesene *NOTCH1* Mutationen. In dieser Gruppe kam es in 117 Fällen zu einem Progress (83,0 %), im Gegensatz zu 411 Ereignissen bei 547 Patienten (75,1 %) der Wildtyp-Gruppe. Das progressionsfreie Ein-, Zwei- und Drei-Jahresüberleben lag in der Gruppe mit jeglicher Art der *NOTCH1* Mutation jeweils unter dem der Vergleichsgruppe (61,6 % vs. 71,4 %, 34,6 % vs. 39,0 %, 18,2 % vs. 24,4 %).
Diese Tendenz spiegelte sich auch mit Blick auf das Gesamtüberleben der Patienten wider. In der Vergleichsgruppe der Patienten ohne *NOTCH1* Mutation kam es zu 141 Todesfällen bei 547 Patienten (25,8 %), im Gegensatz zu 54 Todesfällen bei 141 Patienten mit *NOTCH1* Mutation (38,3 %). Auch im Verlauf des Ein-, Zwei- und Drei-Jahresgesamtüberlebens zeichnete sich ein Unterschied ab (*NOTCH1* mutiert vs. unmutiert: 92,6 % vs. 95,0 %, 81,2 % vs. 86,8 %, 69,6 % vs. 78,8 %).

Zusammengefasst ging sowohl eine codierende *NOTCH1* als auch eine nicht-codierende *NOTCH1 3'-UTR* Mutation mit einem tendenziell verkürzten progressionsfreien Überleben und Gesamtüberleben der Patienten der CLL11 Studie einher. Beide Gruppen hatten einen ähnlichen Krankheitsverlauf.

4 Diskussion

4.1 Einführung

Die CLL weist einen ausgesprochen heterogenen Krankheitsverlauf auf, der zunehmend auf klinische und biologische Merkmale der Patienten zurückgeführt werden kann. Bei diesen Merkmalen handelt es sich im Idealfall um etablierte prognostische und prädiktive Marker. Diese erlauben zum einen eine Vorhersage des erwarteten Krankheitsverlaufs und zum anderen die Etablierung einer personalisierten Therapie der CLL. Neben genomischen Aberrationen und IGHV-Status wird die Relevanz rekurrenter Mutationen in der CLL immer deutlicher (Döhner et al. 2000, Landau et al. 2015). Beispielsweise ist die rekurrent auftretende *TP53* Mutation ein etablierter Hochrisikomarker der CLL und im Internationalen CLL-Prognoseindex der Marker mit der höchsten Gewichtung in der Vorhersage eines ungünstigen Verlaufs der Erkrankung (International CLL-IPI working group 2016).

Mit einem relativen Anteil von 10 % bis 18 % stellt eine Mutation im codierenden Exon 34 des *NOTCH1* Gens eine der häufigsten genetischen Läsionen der CLL dar (Oscier et al. 2013, Sutton et al. 2015). Diesem Anteil steht die Erkenntnis gegenüber, dass bis zu 50 % der CLL-Zellen eine konstitutiv aktive Unterform des *NOTCH1* Rezeptors exprimieren. Folglich könnte *NOTCH1* eine deutlich größere Rolle in der Evolution der CLL spielen als bisher angenommen (Fabbri et al. 2017). Eine Ursache für ein aktiviertes *NOTCH1* stellt die codierende Mutation der PEST-Domäne dar, eine andere lieferte die Arbeitsgruppe um Puente et al., die bisher unentdeckte Mutationen im nicht-codierenden *3'-UTR* Bereich des *NOTCH1* Gens beschrieb. Diese führen durch aberrantes Spleißen zu einer erhöhten *NOTCH1* Aktivität und in der Folge zu einem aggressiveren Krankheitsverlauf der CLL (Puente et al. 2015).

4.2 Wahl der Studienkohorte

Im Rahmen dieser Dissertation sollten die kürzlich erstmals beschriebenen *NOTCH1 3'-UTR* Mutationen in einer großen, prospektiven Studie untersucht und validiert werden. Die CLL11 Studie der DCLLSG wurde aus mehreren Gründen als Studienkohorte für die Untersuchung ausgewählt. Bei dieser handelte sich um eine kontrollierte, dreiarmig randomisierte Phase-III-Zulassungsstudie für den Typ-II-

CD20-Antikörper Obinutuzumab. Das Referenzlabor der molekularen Zytogenetik der CLL11 Studie war die Arbeitsgruppe CLL der Klinik für Innere Medizin III des Universitätsklinikums Ulm. Es lagen von 700 der 781 (89,6 %) teilnehmenden Patienten Proben zur genetischen Auswertung vor. In Anbetracht der von Puente et al. beschriebenen niedrigen Prävalenz der *NOTCH1 3'-UTR* Mutation von 2,6 % war eine Studie mit einer solchen großen Fallzahl notwendig, um signifikante Korrelationen aufzeigen zu können. Durch die Teilnahme von Patienten aus 189 Zentren und 26 Ländern konnte nach der Randomisierung ein homogenes Vergleichskollektiv der CLL11 Studie geschaffen werden (Goede et al. 2014). Alle Patienten waren zum Zeitpunkt des Screenings der CLL11 Studie unbehandelt. Diese Therapienaivität war wichtig, da beispielsweise B-CLL-Zellen mit einer *TP53* Mutation unter einem Therapiedruck positiv gegenüber anderen rekurrenten Mutationen selektiert werden können. Somit kann es innerhalb des Krankheitsverlaufs einer CLL unter Therapie zu verschiedenen Mutationsprävalenzen kommen (Malcikova et al. 2015).

Der Längsschnittaufbau der CLL11 Studie bot die Möglichkeit, durch eine Untersuchung von Proben zum Zeitpunkt des Screenings (n = 700) und des Progresses (n = 367) die Evolution der *NOTCH1 3'-UTR* Mutation abzubilden. Das prospektive Studiendesign ermöglichte insbesondere die Erkennung von statistischen Zusammenhängen zwischen der Einflussgröße einer *NOTCH1 3'-UTR* Mutation und definierten Zielgrößen. Innerhalb der Arbeitsgruppe lagen Ergebnisse zu genomischen Aberrationen, IGHV-Status, *TP53*, *SF3B1* und codierenden *NOTCH1* Mutationen der Patienten der CLL11 Studie vor. Weitere Zielgrößen stellten das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben dar, deren Stärke innerhalb der CLL11 Studie aus einem langen Nachbeobachtungszeitraum von fünf Jahren mit kontinuierlich stattfindenden Verlaufskontrolluntersuchungen bestand. Durch den Aufbau als Interventionsstudie konnte eine Analyse der *NOTCH1 3'-UTR* Mutation in den Therapiearmen der CLL11 Studie erfolgen und erstmals deren prädiktive Aussagekraft im Zusammenhang mit einer Immunchemotherapie untersucht werden. Die Untersuchung erfolgte speziell vor dem Hintergrund, dass Patienten mit einer codierenden *NOTCH1* Mutation nicht von der Hinzunahme des Typ-I-CD20-Antikörpers Rituximab zu Chlorambucil

profitierten und dies innerhalb der CLL11 Studie durch den Typ-II-CD20-Antikörper Obinutuzumab überwunden werden konnte (Estenfelder et al. 2016).

Im Vergleich mit der vorliegenden Literatur stellte diese Dissertation die größte Untersuchung von *NOTCH1 3'-UTR* Mutationen dar, die bisher durchgeführt wurde. Ein vergleichsweise großes Patientenkollektiv (n = 662) untersuchten Bittolo et al. auf eine *NOTCH1 3'-UTR* Mutation. Diese Patientengruppe war allerdings schwer vergleichbar, da die eingeschlossenen Patienten nicht therapienaiv waren und keiner klinischen Studie entstammten. Somit konnten keine Aussagen über klinische Verläufe abgeleitet werden (Bittolo et al. 2017). Am besten vergleichbar war die Untersuchung der LRF CLL4 Studie an 489 Patienten, deren prospektives Studiendesign eine prognostische Aussage zur *NOTCH1 3'-UTR* Mutation ermöglichte. Innerhalb der Studie wurde eine Therapie mit Chlorambucil der Therapie mit Fludarabin mit oder ohne Cyclophosphamid gegenübergestellt. Keiner der drei Therapiearme wird heute noch als Behandlungsoption genutzt. Durch diesen Studienaufbau war keine Bewertung der Auswirkung einer Therapie mit CD20-Antikörpern bei Patienten mit einer *NOTCH1 3'-UTR* Mutation möglich, eine Fragestellung, die die Autoren selbst aufwarfen (Larrayoz et al. 2017). In der Untersuchung von Nadeu et al. wurde die *NOTCH1 3'-UTR* Mutation bei 391 therapienaiven Patienten untersucht, die zum Großteil in einem Binet Stadium A und damit nicht therapiebedürftig waren. Eine weitere Stärke dieser Studie war die Untersuchung zusätzlicher 48 Patientenproben zu einem späteren Zeitpunkt (stabile Erkrankung, vor Behandlungseinleitung, Progression, Rückfall). Die Therapien der Patienten waren vielfältig und umfassten das CHOP-Schema, Chlorambucil, Bendamustin und Rituximab sowie weitere Therapieregime (Nadeu et al. 2016).

4.3 *NOTCH1 3'-UTR* Mutation

In der CLL11 Studie ließ sich bei 18 von 700 (2,6 %) Patienten eine *NOTCH1 3'-UTR* Mutation nachweisen. Dies deckt sich mit den genannten Studien, in denen die Prävalenz zwischen 2,0 % und 3,9 % lag (Bittolo et al. 2017, Larrayoz et al. 2017, Puente et al. 2015). Einen vergleichsweise hohen relativen Anteil von 5,6 % wiesen Nadeu et al. nach. Dies lässt sich auf die Erkennung von subklonalen *NOTCH1 3'-UTR* Mutationen durch die Methodik des „Ultra-deep Next Generation

Sequencing“ zurückführen. Über 60 % der nachgewiesenen *NOTCH1 3’-UTR* Mutationen waren dabei subklonal mit einer VAF unter 10 % (Nadeu et al. 2016). Die Erkennung subklonaler Mutationen war durch den gewählten Ansatz der Sanger-Sequenzierung in der CLL11 Studie nicht möglich, worin eine Limitierung der gewählten Methodik lag. Hinsichtlich der Relevanz subklonaler Mutationen sind jedoch noch viele Fragen ungeklärt. Während Nadeu et al. die subklonalen *NOTCH1* Mutationen mit einer kürzeren Zeit bis zum Einleiten einer Behandlung der CLL assoziierten, waren in anderen Untersuchungen die klinischen Auswirkungen subklonaler *NOTCH1* Mutationen nur wenig ausgeprägt (Rasi et al. 2016).

Die *NOTCH1 3’-UTR* Punktmutationen traten in der CLL11 Studie an den DNA-Positionen Chr9:139390152 (83 %) und Chr9:139390145 (17 %) auf. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der LRF CLL4 Studie, die an diesen Stellen 64 % und 36 % der *NOTCH1 3’-UTR* Mutationen fanden (Larrayoz et al. 2017). Beide Untersuchungen entdeckten keine Mutation an der von Puente et al. beschriebenen DNA-Position Chr9:139390143, was eine nachgestellte Relevanz dieser DNA-Position vermuten lässt. Insgesamt sind *NOTCH1 3’-UTR* Mutationen als alleiniges Merkmal selten in der CLL, insbesondere im Vergleich zu weiteren rekurrent mutierten Genen, wie *TP53* und *SF3B1*, die eine Häufigkeit von über 11 % und knapp unter 20 % aufweisen (Stilgenbauer et al. 2014). Die Relevanz der *NOTCH1 3’-UTR* Mutationen ergibt sich durch deren Erweiterung der Patientenkohorte mit einer *NOTCH1* Mutation. Der relative Anteil der *NOTCH1* Mutationen erhöhte sich in der CLL11 Studie durch den Einschluss der *NOTCH1 3’-UTR* Mutationen von 18,6 % auf 20,5 %. Damit erweiterten die ausschließlich nicht-codierenden Mutationen die aus codierenden Mutationen bestehende *NOTCH1* Kohorte um fast 10 %. Dieses Ergebnis deckt sich mit der vorhandenen Literatur. In der LRF CLL4 Studie wurde der relative Anteil der Patienten mit einer *NOTCH1* Mutation durch den Einschluss der *NOTCH1 3’-UTR* Mutationen von 9,6 % auf 11,8 % gesteigert. Bei der Untersuchung von Puente et al. waren zu den 11,2 % codierenden *NOTCH1* Mutationen zusätzliche 2,2 % nicht-codierende Mutationen hinzugekommen (Larrayoz et al. 2017, Puente et al. 2015). Damit zeigten sich in drei wegweisenden Untersuchungen korrelierende Ergebnisse.

Während des Krankheitsverlaufs einer CLL treten innerhalb von zehn Jahren mit einer Wahrscheinlichkeit von 25 % neue genetische Läsionen wie *TP53*, *SF3B1* oder codierende *NOTCH1* Mutationen auf. Diese neu aufgetretenen Mutationen vermindern unabhängig von anderen Einflussgrößen wie Patientenalter oder Krankheitsstadium das Gesamtüberleben der Patienten (Rossi et al. 2013). Bezüglich des Auftretens und der klonalen Evolution einer *NOTCH1 3'-UTR* Mutation gab es bislang noch keine Daten. In der CLL11 Studie traten im Krankheitsverlauf der Patienten keine neuen *NOTCH1 3'-UTR* Mutationen auf. Bei allen sechs Patienten, die zum Zeitpunkt des Progresses eine *NOTCH1 3'-UTR* Mutation aufwiesen, ließ sich diese bereits zum Zeitpunkt des Screenings bei Studieneintritt nachweisen. Bei keinem der Patienten kam es zu einem Wachstum des *NOTCH1 3' UTR* Klons, die VAF der *NOTCH1 3'-UTR* Mutation nahm unter der Therapie jeweils ab. Im Zeitverlauf kam es somit zu einer abnehmenden Prävalenz der *NOTCH1 3'-UTR* Mutationen von 2,6 % (n = 18 von 700 Patienten) auf 1,6 % (n = 6 von 367 Patienten). Diese Ergebnisse decken sich mit denen von Bittolo et al., die in der klonalen Evolution bei 48 sequentiellen Proben nur eine neu aufgetretene *NOTCH1 3'-UTR* Mutation bei einem bis dahin unbehandelten Patienten beobachteten. Bei Patienten nach einer Therapie traten keine neuen *NOTCH1* Mutationen auf, lediglich zwei *TP53* Mutationen und eine *BIRC3* Mutation (Nadeu et al. 2016). Somit stellen die *NOTCH1 3'-UTR* Mutationen in der CLL ein eher frühes Ereignis dar, was ebenso für die codierenden *NOTCH1* Mutationen nachgewiesen ist. Für diese Hypothese spricht auch die gemessene, relativ hohe VAF der *NOTCH1 3'-UTR* Mutationen in der CLL11 Studie. Die codierenden *NOTCH1* Mutationen treten gemeinsam mit der numerischen Aberration einer Trisomie 12 ebenfalls eher früh in der Evolution einer CLL auf. Im weiteren Krankheitsverlauf kann es zu einer Akkumulation von *TP53* und *BIRC3* Mutationen kommen (Wang et al. 2014). Bei drei der neun Patienten, bei denen eine Tumorprobe zum Zeitpunkt des Screenings und des Progresses vorlag, war die *NOTCH1 3'-UTR* Mutation zum späteren Zeitpunkt nicht mehr nachzuweisen (VAF < 10 %). Interessanterweise gehörten diese drei Patienten zur Gruppe der insgesamt fünf Patienten, die sowohl eine codierende als auch eine nicht-codierende *NOTCH1* Mutation aufwiesen. Während in den Untersuchungen von Larrayoz et al. und Puente et al. die unterschiedlichen *NOTCH1* Mutationen exklusiv zueinander auftraten, fand auch die Arbeitsgruppe um Bittolo et al. in der

zweitgrößten Patientenkohorte (n = 662) fünf Patienten mit beiden Arten der *NOTCH1* Mutation. Damit wurde in zwei großen Studienpopulationen deutlich, dass die *NOTCH1 3'-UTR* Mutationen nicht exklusiv zu den codierenden *NOTCH1* Mutationen auftreten. In der klonalen Evolution bei Vorliegen beider *NOTCH1* Mutationen war die *NOTCH1 3'-UTR* Mutation zum Zeitpunkt eines Progresses in allen drei Fällen nicht mehr nachzuweisen (VAF < 10 %). Die codierenden *NOTCH1* Mutationen hingegen nahmen zum Teil in ihrer VAF zu oder es traten neue codierende *NOTCH1* Mutationen auf.

In der Theorie können nicht-codierende *NOTCH1 3'-UTR* und codierende *NOTCH1* Mutationen in den gleichen CLL-Zellen und damit in demselben Subklon, aber auch in unterschiedlichen CLL-Zellen und damit in zwei unterschiedlichen Subklonen, auftreten. Für diese zweite Hypothese sprechen mehrere Gründe. Zum einen war die codierende *NOTCH1* Mutation bei gleichzeitigem Auftreten einer *NOTCH1 3'-UTR* Mutation in der CLL11 Studie durch eine niedrigere VAF charakterisiert als bei Patienten mit einer ausschließlich codierenden Mutation. Zum anderen nahm bei zwei Patienten die VAF der *NOTCH1 3'-UTR* Mutation deutlich ab, während die der codierenden *NOTCH1* Mutation deutlich zunahm. Damit gibt es Grund zur Annahme, dass die codierenden und die nicht-codierenden Mutationen in unterschiedlichen Subklonen auftraten. Die Beobachtung, dass sich jeweils der Subklon mit der codierenden *NOTCH1* Mutation durchsetzte, führt zur Hypothese, dass diese im direkten Vergleich mit dem Subklon mit einer *NOTCH1 3'-UTR* Mutation einen Selektionsvorteil besitzt. Zur Bestätigung dieser Hypothese werden in der Zukunft weitere, insbesondere funktionelle Untersuchungen vonnöten sein.

4.3.1 Klinische und genetische Marker

In der Korrelation mit klinischen und genetischen Markern wiesen alle Patienten mit einer *NOTCH1 3'-UTR* Mutation einen unmutierten IGHV-Status auf. Die signifikante Korrelation mit einer *NOTCH1 3'-UTR* Mutation als alleinigem Marker gelang bisher in keiner vergleichbaren Studie, wobei ein gehäuftes gemeinsames Vorkommen bereits beschrieben wurde (Larrayoz et al. 2017, Puente et al. 2015). Die Assoziation mit einem unmutierten IGHV-Status konnte in der CLL11 Studie ebenfalls für die codierenden *NOTCH1* Mutationen nachgewiesen werden (Estenfelder et al. 2016). Damit gehörten beide Arten der *NOTCH1* Mutation der

höheren Risikogruppe eines unmutierten IGHV-Status an. Diese Assoziation erscheint insbesondere vor dem Hintergrund spannend, dass in der CLL14 Studie ein unmutierter IGHV-Status als ein prädiktiver Marker für ein verbessertes Ansprechen einer Therapie mit Venetoclax und Obinutuzumab identifiziert wurde (Tausch et al. 2020). Gleichzeitig wurde für die codierenden *NOTCH1* Mutationen ein besonders gutes Ansprechen auf Obinutuzumab im Vergleich zu Rituximab gezeigt, sodass es hier mögliche Synergien bei der Behandlung der Patienten mit einem unmutiertem IGHV-Status und einem mutiertem *NOTCH1* geben könnte (Estenfelder et al. 2016).

Das Auftreten einer *NOTCH1 3'-UTR* Mutation war ebenfalls signifikant mit einem erhöhten β_2-Mikroglobulin assoziiert, einem etablierten ungünstigen prognostischen Marker der CLL (Hallek et al. 1996). Das β_2-Mikroglobulin geht neben dem IGHV-Status in den Internationalen CLL-Prognoseindex ein. Hierdurch und aufgrund des gehäuften gemeinsamen Auftretens mit einer *TP53* und / oder einer 17p Deletion waren Patienten mit einer *NOTCH1 3'-UTR* Mutation häufiger in einer höheren Risikogruppe im Internationalen CLL-Prognoseindex zu finden. In der hohen und sehr hohen Risikogruppe ist das Zehn-Jahres-Überleben mit 20 % und 3 % erheblich eingeschränkt (International CLL-IPI working group 2016). Für die sehr hohe Risikogruppe gilt die Empfehlung, dass bei einer Therapieindikation anstatt einer Chemotherapie neue, zielgerichtete Substanzen innerhalb einer klinischen Studie zum Einsatz kommen sollen (Hallek 2019).

Das verminderte Auftreten der prognostisch günstigen Deletion 13q bei Patienten mit einer *NOTCH1 3'-UTR* Mutation könnte einen weiteren Erklärungsansatz des eher ungünstigen Krankheitsverlaufs dieser Patientenkohorte darstellen. In der LRF CLL4 Studie zeigte sich ebenfalls diese Tendenz. Bei sieben der elf *NOTCH1 3'-UTR*^{mut}-Patienten wurde keine Deletion 13q nachgewiesen, wobei für einen Patienten keine Daten vorlagen (Larrayoz et al. 2017). Zudem zeigte die *NOTCH1 3'-UTR* Mutation in der CLL11 Studie einen nicht signifikanten Trend zu einem gemeinsamen Auftreten mit einer Trisomie 12. In der LRF CLL4 Studie wurde ein Signifikanzniveau erreicht, womit ein gehäuftes gemeinsames Auftreten einer *NOTCH1 3'-UTR* Mutation und einer Trisomie 12 als bewiesen einzustufen ist (Larrayoz et al. 2017). Für die codierende *NOTCH1* Mutation wurde ebenfalls eine

signifikante Korrelation mit einer Trisomie 12 in der CLL11 Studie nachgewiesen (Estenfelder et al. 2016). Interessanterweise kann es bei Vorliegen einer Trisomie 12 durch eine codierende *NOTCH1* Mutation zu einem Progress der CLL kommen (Balatti et al. 2013). Das Gesamtüberleben von Patienten mit einer Trisomie 12 und einer nachgewiesenen *NOTCH1* Mutation kann im Vergleich zum alleinigen Vorliegen einer Trisomie 12 verkürzt sein. Eine gemeinsame Evolution der CLL erscheint möglich, da beim Auftreten einer Trisomie 12 und einer *NOTCH1* Mutation eine Überrepräsentation von Genen des Zellzyklus und der Zellproliferation nachgewiesen werden konnte (Del Giudice et al. 2012). In der Folge können im weiteren Krankheitsverlauf genetische Aberrationen wie *TP53* und *BIRC3* Mutationen akkumulieren (Wang et al. 2014). Diese Assoziationen wurden bisher für die codierende *NOTCH1* Mutation belegt. In Anbetracht des Zusammenhangs einer *NOTCH1 3'-UTR* Mutation und einer Trisomie 12 lassen sich auch hier gemeinsame Mechanismen der Tumorgenese vermuten.

Eine Mutation im *SF3B1* Gen ist mit einem relativen Anteil von bis zu 20 % neben einer Mutation in *NOTCH1* die häufigste genetische Läsion der CLL und als eigenständiger ungünstiger prognostischer Marker etabliert (Stilgenbauer et al. 2014). Diesbezüglich imponierte in der CLL11 Studie eine Exklusivität der *SF3B1* Mutation zur *NOTCH1 3'-UTR* Mutation. Diese Exklusivität wurde ebenso für die codierende *NOTCH1* Mutation beschrieben und könnte im Gegensatz zur Assoziation mit einer Trisomie 12 auf unterschiedliche Pathomechanismen dieser Treibermutationen hindeuten (Schnaiter et al. 2013).

Im Ergebnis zeigte sich, dass die nicht-codierende *NOTCH1 3' UTR* Mutation eine Korrelation mit denselben genetischen Faktoren aufweist wie die codierende *NOTCH1* Mutation in der PEST-Domäne. Dies lässt auf einen ähnlichen Entstehungshintergrund schließen und möglicherweise auch auf eine ähnliche Auswirkung auf die Zelle, auch wenn funktionelle Analysen der *NOTCH1 3'-UTR* Mutation hierfür noch keine ausreichenden Schlüsse zulassen. Zudem konnte die statistische Häufung von ungünstigen prognostischen Markern in Patienten mit einer *NOTCH1 3'-UTR* Mutation bestätigt werden, was einen unabhängigen prognostischen Wert der Mutation in Frage stellt.

4.3.2 Prognostische Bedeutung

In der Untersuchung von Puente et al. führte die *NOTCH1 3'-UTR* Mutation, ähnlich wie die codierende *NOTCH1* Mutation, zu einem aggressiveren Krankheitsverlauf der CLL im Vergleich zum Wildtyp (Puente et al. 2015). In der CLL11 Studie hatten *NOTCH1 3'-UTR* Mutationen in der univariaten Analyse keinen signifikanten Einfluss auf das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben der Patienten. Die codierenden *NOTCH1* Mutationen hatten in der Studie ebenfalls keinen Einfluss auf diese beiden klinischen Endpunkte (Estenfelder et al. 2016). Bei dieser Form der Analyse war die jeweils andere Art der *NOTCH1* Mutation in der Vergleichsgruppe enthalten und erschwerte ebenso wie die niedrige Prävalenz der *NOTCH1 3'-UTR* Mutation das Erreichen einer univariaten Signifikanz. In der Betrachtung der *NOTCH1* Mutationen nebeneinander und im Vergleich dieser mit der Kohorte ohne *NOTCH1* Mutation waren beide Arten der *NOTCH1* Mutation bei einem Nachbeobachtungszeitraum von fünf Jahren mit einem kürzeren progressionsfreien Überleben und Gesamtüberleben assoziiert. Damit gelang in der großen prospektiven CLL11 Studie der Nachweis, dass die unterschiedlichen Arten der *NOTCH1* Mutation einen ähnlichen Krankheitsverlauf in Bezug auf diese beiden klinischen Endpunkte zeigen. In der multivariaten Analyse der CLL11 Studie blieb jedoch weder die *NOTCH1 3'-UTR* Mutation noch die codierende *NOTCH1* Mutation ein unabhängiger prognostischer Marker.

Die einzige vergleichbare Studienpopulation hierzu war in der LRF CLL4 Studie zu finden. In dieser prospektiven Studie waren die *NOTCH1 3'-UTR* Mutationen oder die codierenden *NOTCH1* Mutationen in der univariaten Analyse bei einem Nachbeobachtungszeitraum von zwölf Jahren mit einem signifikant verkürzten Gesamtüberleben und einem tendenziellen, jedoch nicht signifikant verkürzten progressionsfreien Überleben assoziiert. In der multivariaten Analyse der LRF CLL4 Studie konnte eine *NOTCH1 3'-UTR* Mutation aufgrund der niedrigen Prävalenz ebenfalls nicht als ein unabhängiger prognostischer Marker etabliert werden. In der multivariaten Analyse der gemeinsamen Gruppe der *NOTCH1 3'-UTR* Mutationen und der codierenden *NOTCH1* Mutationen blieb diese ein unabhängiger prognostischer Marker in Bezug auf das Gesamtüberleben, jedoch nicht auf das progressionsfreie Überleben (Larrayoz et al. 2017, Oscier et al. 2013). Die Ursache, weshalb die codierenden und nicht-codierenden *NOTCH1* Mutationen in der CLL11

Studie nicht als unabhängige prognostische Marker identifiziert wurden, könnte darin begründet liegen, dass es sich bei diesen Mutationen am ehesten um prädiktive Marker handelt. Interessanterweise kam es in der CLL11 Studie bei den codierenden *NOTCH1* Mutationen nur im Rituximab- und Chlorambucil-Arm zu einem signifikant verkürzten progressionsfreien Überleben (Estenfelder et al. 2016). Dieser Zusammenhang deutete sich unter Berücksichtigung der niedrigen Prävalenz ebenfalls für die *NOTCH1 3'-UTR* Mutationen an, zumindest in Bezug auf das Gesamtüberleben. Dies könnte bedeuten, dass eine *NOTCH1* Mutation nur in der Kombination mit einer Therapie mit einem Typ-I-CD20-Antikörper mit einem ungünstigen Krankheitsverlauf assoziiert ist. In solch einem Fall spricht man nicht von einem prognostischen, sondern von einem prädiktiven Marker.

4.3.3 Prädiktive Bedeutung

Die codierenden *NOTCH1* Mutationen wurden im Rahmen der CLL8 Studie erstmals als prädiktiver Marker der CLL identifiziert, da Patienten mit dieser genetischen Läsion nicht von der Hinzunahme des Typ-I-CD20-Antikörpers Rituximab zum FC-Schema profitierten (Stilgenbauer et al. 2014). Dem könnte eine verminderte CD20-Expression der B-CLL-Zellen bei einer *NOTCH1* Mutation zugrunde liegen, die Folge einer Histon-Deacetylasen vermittelten epigenetischen Dysregulation ist (Pozzo et al. 2016). Der Typ-II-CD20-Antikörper Obinutuzumab war in der Kombination mit Chlorambucil in der CLL11 Studie in der Lage, das verminderte Ansprechen der Patienten mit einer codierenden *NOTCH1* Mutation auf Rituximab und Chlorambucil zu überwinden. Die Ursachen für dieses verbesserte Ansprechen sind letztlich nicht geklärt. Als mögliche Gründe können eine verstärkte Zytotoxizität und eine höhere Dosis von Obinutuzumab im Vergleich zu Rituximab diskutiert werden (Estenfelder et al. 2016, Mössner et al. 2010). In der LRF CLL4 Studie warfen Larrayoz et al. die Frage auf, wie sich die *NOTCH1 3'-UTR* Mutationen in Bezug auf eine Immunchemotherapie mit CD20-Antikörpern verhalten würden. Dazu gab es bisher noch keine Untersuchungen.

Das Studiendesign der CLL11 Studie mit den Interventionsarmen Rituximab und Chlorambucil gegenüber Obinutuzumab und Chlorambucil ermöglichte eine dahingehende Analyse. Durch den Umstand, dass sich jeweils 9 der insgesamt 18 *NOTCH1 3'-UTR* Mutationen im R-Clb- und im G-Clb-Arm der CLL11 Studie

befanden, konnten diese optimal gewichtet miteinander verglichen werden. Unter der Behandlung mit Rituximab und Chlorambucil war das progressionsfreie Überleben der *NOTCH1 3'-UTR^{mut}*-Patienten zwar verkürzt, allerdings erreichte dieser Zusammenhang keine Signifikanz. Damit konnte keine prädiktive Bedeutung der *NOTCH1 3'-UTR* Mutation in Bezug auf das progressionsfreie Überleben festgestellt werden. Das Gesamtüberleben der *NOTCH1 3'-UTR^{mut}*-Patienten war im Therapiearm mit Rituximab und Chlorambucil tendenziell verkürzt, wobei in der kleinen Gruppe der Patienten ebenfalls keine Signifikanz erreicht wurde. Das Risiko für die Patienten, bei Vorliegen einer *NOTCH1 3'-UTR* Mutation unter der Behandlung mit Rituximab und Chlorambucil zu versterben, war im Vergleich zu Patienten ohne entsprechende Mutation nicht signifikant höher ($p = 0{,}145$). Aus den Überlebenskurven ließ sich zwar eine Tendenz zu einem kürzeren Überleben ableiten, die Anzahl der Ereignisse war allerdings für eine solide statistische Analyse zu niedrig. Somit konnte die *NOTCH1 3'-UTR* Mutation in der CLL11 Studie nicht als ein prädiktiver Marker für ein kürzeres progressionsfreies Überleben oder Gesamtüberleben unter Rituximab validiert werden.

Unter der Behandlung mit Obinutuzumab und Chlorambucil war bei den *NOTCH1 3'-UTR^{mut}*-Patienten kein Unterschied in Bezug auf das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben im Vergleich zur *NOTCH1 3'-UTR^{wt}*-Gruppe festzustellen. Das Risiko für die *NOTCH1 3'-UTR^{mut}*-Patienten unter der Behandlung mit Obinutuzumab und Chlorambucil zu versterben war in der CLL11 Studie im Vergleich zur *NOTCH1 3'-UTR^{wt}*-Gruppe ebenfalls nicht erhöht. Im direkten Vergleich von Obinutuzumab und Chlorambucil gegenüber Rituximab und Chlorambucil deutete sich in der Patientengruppe mit einer *NOTCH1 3'-UTR* Mutation ein besonders langes Therapieansprechen an. Für das progressionsfreie Überleben in der CLL11 Studie war die Therapie mit G-Clb der mit R-Clb in der kleinen *NOTCH1 3'-UTR^{mut}*-Gruppe mit einer HR von 0,32 ($p = 0{,}05$) signifikant überlegen, während die Risikoreduktion in der Patientengruppe ohne *NOTCH1 3'-UTR* Mutation mit einer HR von 0,50 ($p < 0{,}001$) geringer ausfiel. Untermauert werden diese Ergebnisse durch die Arbeitsgruppe von Bittolo et al., die nachwies, dass eine *NOTCH1 3'-UTR* Mutation ähnlich wie die codierende *NOTCH1* Mutation zu einer verminderten CD20-Expression der B-CLL-Zellen führt. Bei in-vitro Versuchen konnten sie eine verminderte relative Lyse der *NOTCH1 3'-UTR^{mut}*-

Zellen im Vergleich zu Wildtyp B-CLL-Zellen bei Behandlung mit den CD20-Antikörpern Rituximab und Ofatumumab feststellen, wobei Obinutuzumab nicht untersucht wurde (Bittolo et al. 2017). Diese Daten legen zusammen mit den Beobachtungen der CLL11 Studie nahe, dass Patienten mit einer *NOTCH1 3'-UTR* Mutation in der Wahl der CD20-Antikörper von einer Entscheidung für Obinutuzumab und gegen Rituximab profitieren.

Diese mögliche Therapieempfehlung ließ sich auch in der molekularen Resterkrankung der Patienten der CLL11 Studie darstellen. Unter der Behandlung mit Obinutuzumab und Chlorambucil erreichten *NOTCH1 3'-UTR*^{mut}-Patienten mit 62,5 % tendenziell häufiger eine MRD-Negativität als *NOTCH1 3'-UTR*^{wt}-Patienten mit 34,5 %. Anders ist dies bei einer Behandlung mit Rituximab und Chlorambucil, hierunter erreichten nur 11 % der *NOTCH1 3'-UTR*^{mut}-Patienten und 3 % der *NOTCH1 3'-UTR*^{wt}-Patienten eine MRD-Freiheit. Somit wurde auch in der Gesamtstudie für *NOTCH1 3'-UTR*^{mut}-Patienten häufiger eine MRD-Freiheit erreicht als bei *NOTCH1 3'-UTR*^{wt}-Patienten. Dieser Zusammenhang wurde ebenso für die codierenden *NOTCH1* Mutationen der CLL11 Studie nachgewiesen (Estenfelder et al. 2016). Das häufigere Erreichen der MRD-Negativität durch die Therapie mit Obinutuzumab und Chlorambucil erscheint bedeutend, da die MRD-Negativität als unabhängiger Marker mit einem längeren progressionsfreien Überleben und Gesamtüberleben der Patienten mit einer CLL assoziiert wurde (Böttcher et al. 2012). Bezüglich des Therapieansprechens konnte dieser Effekt nicht nachgewiesen werden. Zwar erreichten *NOTCH1 3'-UTR*^{mut}-Patienten unter der Behandlung mit Obinutuzumab und Chlorambucil häufiger vollständige Remissionen im Vergleich zu Rituximab und Chlorambucil, allerdings war dies als nicht signifikant zu werten. Damit lässt sich sowohl für das progressionsfreie Überleben als auch für die molekulare Remission von *NOTCH1 3'-UTR*^{mut}-Patienten ein besonders gutes Ansprechen auf Obinutuzumab im Vergleich zu Rituximab folgern.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine *NOTCH1 3'-UTR* Mutation nicht als ein alleiniger prädiktiver Marker eines verminderten Ansprechens auf den Typ-I-CD20-Antikörper Rituximab identifiziert werden konnte, wobei sich dies zumindest im klinischen Endpunkt des Gesamtüberlebens andeutete. Von der

Behandlung mit dem Typ-II-CD20-Antikörper Obinutuzumab und Chlorambucil profitierten *NOTCH1 3'-UTR*^{mut}-Patienten in der CLL11 Studie hingegen in gleichem Maße wie Patienten ohne Mutation, allerdings wurde dieser Zusammenhang aufgrund der geringen Fallzahl nicht signifikant.

4.4 Ausblick

Neben der Immunchemotherapie wurden in den letzten Jahren neue zielgerichtete Therapien wie der BTKi Ibrutinib oder der BCL-2-Inhibitor Venetoclax mit durchschlagendem Erfolg in der Behandlung der CLL etabliert (Burger et al. 2015, Fischer et al. 2019). Es stellt sich die Frage, wie sich die codierenden und nicht-codierenden *NOTCH1* Mutationen in Bezug auf diese neuen Therapieansätze verhalten. In der RESONATE Studie wurde bei Patienten mit einer rezidivierten oder refraktären CLL die Behandlung von Ibrutinib der mit Ofatumumab gegenübergestellt. Hierbei hatten codierende *NOTCH1* Mutationen in den Verlaufskontrolluntersuchungen den erwarteten negativen Einfluss auf die Wirksamkeit einer Therapie mit Ofatumumab, nicht jedoch auf die Wirksamkeit einer Therapie mit Ibrutinib (Brown et al. 2017). Dies deckt sich mit Ergebnissen von in-vitro Experimenten, bei denen eine Behandlung mit dem BTKi Ibrutinib zu einer verminderten Aktivität des *NOTCH1* Signalweges führte (Del Papa et al. 2019). Demgegenüber steht die Erkenntnis, dass *NOTCH1* Mutationen durch die Assoziation mit einem niedrigen Verhältnis der Apoptoseregulatoren BAX und BCL-2 eine Patientengruppe definierten, die unter einer Therapie mit Ibrutinib eine schlechtere Prognose aufwies (Del Poeta et al. 2017). Validere Daten stammen aus der Phase-III-Studie RESONATE, in der das kürzere Therapieansprechen nicht bestätigt werden konnte (Brown et al. 2017). In der CLL14 Studie hatte eine *NOTCH1* Mutation unter der Kombination von Venetoclax und Obinutuzumab keinen negativen Einfluss auf die Wirksamkeit der Therapie. Von der Therapie mit Obinutuzumab und Venetoclax profitierten sogar besonders Patienten mit ungünstigen genetischen Markern. Ein unmutierter IGHV-Status, den in unserer Kohorte alle Patienten mit einer *NOTCH1 3'-UTR* Mutation aufwiesen, wurde als ein positiver prädiktiver Marker für ein verbessertes Ansprechen dieser Therapiekombination identifiziert (Tausch et al. 2020). In der Zukunft werden weitere Untersuchungen in großen Studienkohorten vonnöten sein, um die

Auswirkungen der nicht-codierenden und codierenden *NOTCH1* Mutationen im Zusammenhang mit den neuen Therapieansätzen zu verstehen.

Darüber hinaus rückt der Erfolg der zielgerichteten Therapie, beispielsweise gegen die Bruton-Tyrosinkinase und BCL-2, weitere mögliche deregulierte Signalwege in der CLL in den Fokus der Forschung. Die durch die *NOTCH1 3'-UTR* Mutation vergrößerte Kohorte der *NOTCH1* Mutationen stellt die häufigste genetische Läsion der CLL dar und wird damit zu einer attraktiven Zielstruktur einer zukünftigen maßgeschneiderten Therapie. Von einer solchen Behandlung könnten weit mehr als nur die Patienten mit einer *NOTCH1* Mutation profitieren, da bei bis zu 50 % der Patienten mit einer CLL eine erhöhte *NOTCH1* Aktivität nachgewiesen wurde (Fabbri et al. 2017). Bisher am weitesten in der Forschung sind sogenannte γ-Secretase-Inhibitoren (GSI), die darauf abzielen, die proteolytische Aktivierung des *NOTCH1* Rezeptors zu verhindern. Bei in-vitro Versuchen konnte gezeigt werden, dass GSI bei der CLL in der Lage sind, die *NOTCH1* Aktivität zu vermindern und eine Apoptose auszulösen (Rosati et al. 2013). Bei *NOTCH1*-mutierten CLL-Zellen hatten GSI in der Kombination mit Fludarabin ähnliche Effekte, die auf die Gruppe der mutierten Zellen beschränkt waren (López-Guerra et al. 2014). Bedenken bestehen aufgrund der Rolle von *NOTCH1* in verschiedenen Zelltypen und vielfältigen biologischen Prozessen, die Nebenwirkungen einer *NOTCH1* Inhibition wahrscheinlich machen (Milano et al. 2004). Einen weiteren Therapieansatz stellt die Entwicklung von Antikörpern dar, die sich gegen extrazelluläre Bestandteile des *NOTCH1* Rezeptors richten. Allerdings führten diese bisher zumindest bei der häufig im *NOTCH1* Gen mutierten T-ALL nicht zu den erhofften Fortschritten (Aste-Amézaga et al. 2010). Es bleibt abzuwarten, ob und welche Form der *NOTCH1* Inhibition sich durchsetzen wird. Trotz aller herausragender Fortschritte in den letzten Jahren wird auch in der Zukunft weitere Forschung und die Durchführung großer klinischer Studien wie die der CLL11 Studie notwendig sein, um personalisierte Therapien im Sinne zukünftiger Patientengenerationen weiter zu optimieren.

5 Zusammenfassung

Die chronische lymphatische Leukämie (CLL) geht mit einem heterogenen Krankheitsverlauf einher. Die Abbildung dieses heterogenen Krankheitsverlaufs wird durch eine Identifizierung von prognostischen und prädiktiven Markern der CLL ermöglicht. Dazu gehören neben den häufigen genomischen Aberrationen und dem Mutationsstatus variabler Regionen der Immunglobulinschwerketten (IGHV) insbesondere rekurrent mutierte Gene. Zu den häufigsten genetischen Veränderungen der CLL zählt eine Mutation im codierenden Exon 34 des *NOTCH Rezeptor 1 (NOTCH1)* Gens. Diese Mutation führt zu einem verminderten Ansprechen auf Typ-I-Cluster of Differentation 20 (CD20) Antikörper wie Rituximab und ist damit ein prädiktiver Marker. Im Jahr 2015 beschrieb die Arbeitsgruppe um Puente et al. erstmals bisher unentdeckte Mutationen im nicht-codierenden 3'-Bereich (*3'-UTR*) des *NOTCH1* Gens. Diese *NOTCH1 3'-UTR* Mutationen wurden im Rahmen der vorliegenden Dissertation an 700 Patientenproben von Teilnehmern der CLL11 Studie mittels Sanger-Sequenzierung untersucht. Das Ziel war die Bestimmung der prognostischen und prädiktiven Bedeutung der *NOTCH1 3'-UTR* Mutationen innerhalb der CLL11 Studie der Deutschen CLL Studiengesellschaft.

In der CLL11 Studie war die *NOTCH1 3'-UTR* Mutation mit einem relativen Anteil von 2,6 % zum Zeitpunkt des Studieneintritts eine seltene rekurrente Mutation. Die Relevanz der *NOTCH1 3'-UTR* Mutation ergab sich durch die Vergrößerung der Patientengruppe mit jeglicher *NOTCH1* Mutation um etwa 10 %. In der Folge wiesen bei einem relativen Anteil von 18,6 % der codierenden *NOTCH1* Mutationen 20,5 % der Patienten eine Form der *NOTCH1* Mutation auf. Im Zeitverlauf der CLL11 Studie kamen unter Immunchemotherapie keine weiteren *NOTCH1 3'-UTR* Mutationen hinzu, womit diese ein frühes Ereignis der CLL darstellten. Die *NOTCH1 3'-UTR* Mutation zeigte ähnliche klinische und biologische Merkmale wie die codierende *NOTCH1* Mutation und war mit ungünstigen prognostischen Markern assoziiert. Dazu gehörten unter anderem ein unmutierter IGHV-Status und die Abwesenheit einer Deletion 13q. Interessanterweise trat die *NOTCH1 3'-UTR* Mutation nicht exklusiv zu der codierenden *NOTCH1* Mutation auf, wobei die Mutationen bei einem Patienten am ehesten in zwei verschiedenen Subklonen vorkamen. Die Patienten mit einer *NOTCH1 3'-UTR* Mutation oder einer codierenden *NOTCH1* Mutation

wiesen einen ähnlichen Krankheitsverlauf auf und waren mit einem verkürzten progressionsfreien Überleben und Gesamtüberleben assoziiert. In der multivariaten Analyse konnte eine *NOTCH1 3'-UTR* Mutation allerdings nicht als ein unabhängiger prognostischer Marker identifiziert werden. In der CLL11 Studie wurde eine Monotherapie mit Chlorambucil der Kombinationstherapie aus Chlorambucil mit dem Typ-I-CD20-Antikörper Rituximab oder dem Typ-II-CD20-Antikörper Obinutuzumab gegenübergestellt. Eine *NOTCH1 3'-UTR* Mutation konnte im Gegensatz zu der codierenden *NOTCH1* Mutation nicht als ein prädiktiver Marker eines verminderten Ansprechens auf den Typ-I-CD20-Antikörper Rituximab identifiziert werden. In der Tendenz ging jedoch das verminderte Gesamtüberleben bei einer *NOTCH1 3'-UTR* Mutation vor allem auf den Therapiearm mit Rituximab und Chlorambucil zurück. Der Typ-II-CD20-Antikörper Obinutuzumab war in der CLL11 Studie in der Lage, dieses tendenziell verminderte Ansprechen auf Rituximab in der Patientengruppe mit einer *NOTCH1 3'-UTR* Mutation zu überwinden. Dementsprechend wurde innerhalb dieser Gruppe signifikant häufiger eine Negativität der minimalen Resterkrankung und ein verlängertes progressionsfreies Überleben unter der Behandlung mit Obinutuzumab anstelle von Rituximab erreicht.

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation unterstützen den zukünftigen Einschluss des *3'-UTR* Bereichs des *NOTCH1* Gens in die genetische Analyse, da beide Arten der Mutation gemeinsame Merkmale zeigen. Als klinische Konsequenz können in der Zukunft weitere Patienten identifiziert werden, die von einer Therapie mit Typ-II-CD20-Antikörpern anstelle von Typ-I-CD20-Antikörpern profitieren. Mit Blick auf die Forschung wird die Zahl der im *NOTCH1* Gen mutierten Patienten vergrößert, für die in zukünftigen Studien eine zielgerichtete Therapie gegen *NOTCH1* entwickelt werden kann.

6 Literaturverzeichnis

1. Andersson E R, Sandberg R, Lendahl U: Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. Development, 138: 3593-3612 (2011)

2. Aste-Amézaga M, Zhang N, Lineberger J E, Arnold B A, Toner T J, Gu M, Huang L, Vitelli S, Vo K T, Haytko P, Zhao J Z, Baleydier F, L'Heureux S, Wang H, Gordon W R, Thoryk E, Andrawes M B, Tiyanont K, Stegmaier K, Roti G, Ross K N, Franlin L L, Wang H, Wang F, Chastain M, Bett A J, Audoly L P, Aster J C, Blacklow S C, Huber H E: Characterization of Notch1 antibodies that inhibit signaling of both normal and mutated Notch1 receptors. PLoS One, 5: e9094 (2010)

3. Balatti V, Lerner S, Rizzotto L, Rassenti L Z, Bottoni A, Palamarchuk A, Cascione L, Alder H, Keating M J, Kipps T J, Pekarsky Y, Croce C M: Trisomy 12 CLLs progress through NOTCH1 mutations. Leukemia, 27: 740-743 (2013)

4. Baliakas P, Hadzidimitriou A, Sutton L, Rossi D, Minga E, Villamor N, Larrayoz M, Kminkova J, Agathangelidis A, Davis Z, Tausch E, Stalika E, Kantorova B, Mansouri L, Scarfò L, Cortese D, Navrkalova V, Rose-Zerilli M J J, Smedby K E, Juliusson G, Anagnostopoulos A, Makris A M, Navarro A, Delgado J, Oscier D, Belessi C, Stilgenbauer S, Ghia P, Pospisilova S, Gaidano G, Campo E, Strefford J C, Stamatopoulos K, Rosenquist R: Recurrent mutations refine prognosis in chronic lymphocytic leukemia. Leukemia, 29: 329-336 (2014)

5. Begleiter A, Mowat M, Israels L G, Johnston J B: Chlorambucil in Chronic Lymphocytic Leukemia: Mechanism of Action. Leukemia & Lymphoma, 23: 187-201 (1996)

6. Binet J L, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguet H, Goasguen J, Vaugier G, Potron G, Colona P, Oberling F, Thomas M, Tchernia G, Jacquillat C, Boivin P, Lesty C, Duault M T, Monconduit M, Belabbes S, Gremy F: A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. Cancer, 48: 198-206 (1981)

7. Bittolo T, Pozzo F, Bomben R, D'Agaro T, Bravin V, Bulian P, Rossi F M, Zucchetto A, Degan M, Macor P, D'Arena G, Chiarenza A, Zaja F, Pozzato G, Di

Raimondo F, Rossi D, Gaidano G, Del Poeta G, Gattei V, Dal Bo M: Mutations in the 3' untranslated region of NOTCH1 are associated with low CD20 expression levels chronic lymphocytic leukemia. Haematologica, 102: e305-e309 (2017)

8. Böttcher S, Ritgen M, Fischer K, Stilgenbauer S, Busch R M, Fingerle-Rowson G, Fink A M, Bühler A, Zenz T, Wenger M K, Mendila M, Wendtner C M, Eichhorst B F, Döhner H, Hallek M J, Kneba M: Minimal residual disease quantification is an independent predictor of progression-free and overall survival in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate analysis from the randomized GCLLSG CLL8 trial. Journal of Clinical Oncology, 30: 980-988 (2012)

9. Brown J R, Hillmen P, O'Brien S, Barrientos J C, Reddy N M, Coutre S E, Tam C S, Mulligan S P, Jaeger U, Barr P M, Furman R R, Kipps T J, Cymbalista F, Thornton P, Caligaris-Cappio F, Delgado J, Montillo M, DeVos S, Moreno C, Pagel J M, Munir T, Burger J A, Chung D, Lin J, Gau L, Chang B, Cole G, Hsu E, James D F, Byrd J C: Extended follow-up and impact of high-risk prognostic factors from the phase 3 RESONATE study in patients with previously treated CLL/SLL. Leukemia, 32: 83-91 (2017)

10. Burger J A, Tedeschi A, Barr P M, Robak T, Owen C, Ghia P, Bairey O, Hillmen P, Bartlett N L, Li J, Simpson D, Grosicki S, Devereux S, McCarthy H, Coutre S, Quach H, Gaidano G, Maslyak Z, Stevens D A, Janssens A, Offner F, Mayer J, O'Dwyer M, Hellmann A, Schuh A, Siddiqi T, Polliack A, Tam C S, Suri D, Cheng M, Clow F, Styles L, James D F, Kipps T J, RESONATE-2 Investigators: Ibrutinib as Initial Therapy for Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. The New England Journal of Medicine, 373: 2425-2437 (2015)

11. Calin G A, Dumitru C D, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce C M: Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99: 15524-15529 (2002)

12. Chiang M Y, Xu M L, Histen G, Shestova O, Roy M, Nam Y, Blacklow S C, Sacks D B, Pear W S, Aster J C: Identification of a conserved negative regulatory

sequence that influences the leukemogenic activity of NOTCH1. Molecular and Cellular Biology, 26: 6261-6271 (2006)

13. CLL Trialists' CollaborativeGroup: Chemotherapeutic Options in Chronic Lymphocytic Leukemia: a Meta-analysis of the Randomized Trials. Journal of the National Cancer Institute, 91: 861-868 (1999)

14. Cordle J, Redfieldz C, Stacey M, van der Merwe, P. A., Willis A C, Champion B R, Hambleton S, Handford P A: Localization of the delta-like-1-binding site in human Notch-1 and its modulation by calcium affinity. Journal of Biological Chemistry, 283: 11785-11793 (2008)

15. Cox D R: Regression Models and Life-Tables. Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological), 34: 187-202 (1972)

16. Cragg M S, Walshe C A, Ivanov A O, Glennie M J: The biology of CD20 and its potential as a target for mAb therapy. Current directions in autoimmunity, 8: 140-174 (2005)

17. Cragg M S, Morgan S M, Chan H T C, Morgan B P, Filatov A V, Johnson P W M, French R R, Glennie M J: Complement-mediated lysis by anti-CD20 mAb correlates with segregation into lipid rafts. Blood, 101: 1045-1052 (2003)

18. Damle R N, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen S L, Buchbinder A, Budman D, Dittmar K, Kolitz J, Lichtman S M, Schulman P, Vinciguerra V P, Rai K R, Ferrarini M, Chiorazzi N: Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. Blood, 94: 1840-1847 (1999)

19. Del Giudice I, Rossi D, Chiaretti S, Marinelli M, Tavolaro S, Gabrielli S, Laurenti L, Marasca R, Rasi S, Fangazio M, Guarini A, Gaidano G, Foà R: NOTCH1 mutations in +12 chronic lymphocytic leukemia (CLL) confer an unfavorable prognosis, induce a distinctive transcriptional profiling and refine the intermediate prognosis of +12 CLL. Haematologica, 97: 437-441 (2012)

20. Del Papa B, Baldoni S, Dorillo E, De Falco F, Rompietti C, Cecchini D, Cantelmi M G, Sorcini D, Nogarotto M, Adamo F M, Mezzasoma F, Silva Barcelos E C, Albi

E, Iacucci Ostini R, Di Tommaso A, Marra A, Montanaro G, Martelli M P, Falzetti F, Di Ianni M, Rosati E, Sportoletti P: Decreased NOTCH1 Activation Correlates with Response to Ibrutinib in Chronic Lymphocytic Leukemia. Clinical cancer research, 25: 7540-7553 (2019)

21. Del Poeta G, Del Principe M I, Postorino M, Bomben R, Iannella E, Buccisano F, Rossi M F, Venditti A, Santinelli E, de Fabritiis P, Cantonetti M, Amadori S, Gattei V, Arcese W: Apoptosis Resistance and NOTCH1 Mutations Impair Clinical Outcome in Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) Patients Treated with Ibrutinib. Blood, 130: 261 (2017)

22. Di Ianni M, Baldoni S, Rosati E, Ciurnelli R, Cavalli L, Martelli M F, Marconi P, Screpanti I, Falzetti F: A new genetic lesion in B-CLL: a NOTCH1 PEST domain mutation. British Journal of Haematology, 146: 689-691 (2009)

23. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, Döhner K, Bentz M, Lichter P: Genomic Aberrations and Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia. The New England Journal of Medicine, 343: 1910-1916 (2000)

24. Dores G M, Anderson W F, Curtis R E, Landgren O, Ostroumova E, Bluhm E C, Rabkin C S, Devesa S S, Linet M S: Chronic lymphocytic leukaemia and small lymphocytic lymphoma: overview of the descriptive epidemiology. British Journal of Haematology, 139: 809-819 (2007)

25. Dreger P, Corradini P, Kimby E, Michallet M, Milligan D, Schetelig J, Wiktor-Jedrzejczak W, Niederwieser D, Hallek M, Montserrat E: Indications for allogeneic stem cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia: the EBMT transplant consensus. Leukemia, 21: 12-17 (2007)

26. Dreger P, Ghia P, Schetelig J, van Gelder M, Kimby E, Michallet M, Moreno C, Robak T, Stilgenbauer S, Montserrat E: High-risk chronic lymphocytic leukemia in the era of pathway inhibitors: integrating molecular and cellular therapies. Blood, 132: 892-902 (2018)

27. Duncan A W, Rattis F M, DiMascio L N, Congdon K L, Pazianos G, Zhao C, Yoon K, Cook J M, Willert K, Gaiano N, Reya T: Integration of Notch and Wnt

signaling in hematopoietic stem cell maintenance. Nature Immunology, 6: 314-322 (2005)

28. Eclache V, Caulet-Maugendre S, Poirel H A, Djemai M, Robert J, Lejeune F, Raphaël M: Cryptic deletion involving the *ATM* locus at 11q22.3~q23.1 in B-cell chronic lymphocytic leukemia and related disorders. Cancer Genetics and Cytogenetics, 152: 72-76 (2004)

29. Eichhorst B, Fink A M, Bahlo J, Busch R, Kovacs G, Maurer C, Lange E, Köppler H, Kiehl M, Sökler M, Schlag R, Vehling-Kaiser U, Köchling G, Plöger C, Gregor M, Plesner T, Trneny M, Fischer K, Döhner H, Kneba M, Wendtner C M, Klapper W, Kreuzer K A, Stilgenbauer S, Böttcher S, Hallek M, international group of investigators, German CLL Study Group (GCLLSG): First-line chemoimmunotherapy with bendamustine and rituximab versus fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab in patients with advanced chronic lymphocytic leukaemia (CLL10): an international, open-label, randomised, phase 3, non-inferiority trial. The Lancet Oncology, 17: 928-942 (2016)

30. Eichhorst B, Robak T, Montserrat E, Ghia P, Niemann C U, Kater A P, Gregor M, Cymbalista F, Buske C, Hillmen P, Hallek M, Mey U: Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Annals of Oncology, 32: 23-33 (2021)

31. Eichhorst B F, Busch R, Stilgenbauer S, Stauch M, Bergmann M A, Ritgen M, Kranzhöfer N, Rohrberg R, Söling U, Burkhard O, Westermann A, Goede V, Schweighofer C D, Fischer K, Fink A, Wendtner C M, Brittinger G, Döhner H, Emmerich B, Hallek M: First-line therapy with fludarabine compared with chlorambucil does not result in a major benefit for elderly patients with advanced chronic lymphocytic leukemia. Blood, 114: 3382-3391 (2009)

32. Ellisen L W, Bird J, West D C, Soreng A L, Reynolds T C, Smith S D, Sklar J: TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. Cell, 66: 649-661 (1991)

33. Estenfelder S, Tausch E, Robrecht S, Bahlo J, Goede V, Ritgen M, van Dongen J J, Langerak A W, Fingerle-Rowson G, Kneba M, Fischer K, Hallek M, Döhner H,

Stilgenbauer S: Gene Mutations and Treatment Outcome in the Context of Chlorambucil (Clb) without or with the Addition of Rituximab (R) or Obinutuzumab (GA-101, G) - Results of an Extensive Analysis of the Phase III Study CLL11 of the German CLL Study Group. Blood, 128: 3227 (2016)

34. Fabbri G, Holmes A B, Viganotti M, Scuoppo C, Belver L, Herranz D, Yan X J, Kieso Y, Rossi D, Gaidano G, Chiorazzi N, Ferrando A A, Dalla-Favera R: Common nonmutational NOTCH1 activation in chronic lymphocytic leukemia. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 114: E2911-E2919 (2017)

35. Fabbri G, Rasi S, Rossi D, Trifonov V, Khiabanian H, Ma J, Grunn A, Fangazio M, Capello D, Monti S, Cresta S, Gargiulo E, Forconi F, Guarini A, Arcaini L, Paulli M, Laurenti L, Larocca L M, Marasca R, Gattei V, Oscier D, Bertoni F, Mullighan C G, Foá R, Pasqualucci L, Rabadan R, Dalla-Favera R, Gaidano G: Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. The Journal of Experimental Medicine, 208: 1389-1401 (2011)

36. Fischer K, Bahlo J, Fink A M, Goede V, Herling C D, Cramer P, Langerbeins P, von Tresckow J, Engelke A, Maurer C, Kovacs G, Herling M, Tausch E, Kreuzer K A, Eichhorst B, Böttcher S, Seymour J F, Ghia P, Marlton P, Kneba M, Wendtner C M, Döhner H, Stilgenbauer S, Hallek M: Long-term remissions after FCR chemoimmunotherapy in previously untreated patients with CLL: updated results of the CLL8 trial. Blood, 127: 208-215 (2016)

37. Fischer K, Al-Sawaf O, Bahlo J, Fink A, Tandon M, Dixon M, Robrecht S, Warburton S, Humphrey K, Samoylova O, Liberati A M, Pinilla-Ibarz J, Opat S, Sivcheva L, Le Dû K, Fogliatto L M, Niemann C U, Weinkove R, Robinson S, Kipps T J, Boettcher S, Tausch E, Humerickhouse R, Eichhorst B, Wendtner C, Langerak A W, Kreuzer K, Ritgen M, Goede V, Stilgenbauer S, Mobasher M, Hallek M: Venetoclax and Obinutuzumab in Patients with CLL and Coexisting Conditions. The New England Journal of Medicine, 380: 2225-2236 (2019)

38. Goede V, Fischer K, Dyer M, Müller L, Smolej L, Di Bernardo M C, Knapp A, Nielsen T, Hallek M: Overall survival benefit of obinutuzumab over rituximab when combined with chlorambucil in patients with chronic lymphocytic leukemia and

comorbidities: final survival analysis of the CLL11 study. Presented at: 2018 EHA Congress; June 14-17, 2018; Stockholm, Sweden. Abstract S151 (2018)

39. Goede V, Fischer K, Engelke A, Schlag R, Lepretre S, Montero L F C, Montillo M, Fegan C, Asikanius E, Humphrey K, Fingerle-Rowson G, Hallek M: Obinutuzumab as frontline treatment of chronic lymphocytic leukemia: updated results of the CLL11 study. Leukemia, 29: 1602-1604 (2015)

40. Goede V, Fischer K, Busch R, Engelke A, Eichhorst B, Wendtner C M, Chagorova T, de la Serna J, Dilhuydy M, Illmer T, Opat S, Owen C J, Samoylova O, Kreuzer K, Stilgenbauer S, Döhner H, Langerak A W, Ritgen M, Kneba M, Asikanius E, Humphrey K, Wenger M, Hallek M: Obinutuzumab plus Chlorambucil in Patients with CLL and Coexisting Conditions. The New England Journal of Medicine, 370: 1101-1110 (2014)

41. Goldin L R, Pfeiffer R M, Li X, Hemminki K: Familial risk of lymphoproliferative tumors in families of patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the Swedish Family-Cancer Database. Blood, 104: 1850-1854 (2004)

42. Grever M R, Lucas D M, Dewald G W, Neuberg D S, Reed J C, Kitada S, Flinn I W, Tallman M S, Appelbaum F R, Larson R A, Paietta E, Jelinek D F, Gribben J G, Byrd J C: Comprehensive assessment of genetic and molecular features predicting outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the US Intergroup Phase III Trial E2997. Journal of Clinical Oncology, 25: 799-804 (2007)

43. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, Fink A M, Busch R, Mayer J, Hensel M, Hopfinger G, Hess G, von Grünhagen U, Bergmann M, Catalano J, Zinzani P L, Caligaris-Cappio F, Seymour J F, Berrebi A, Jäger U, Cazin B, Trneny M, Westermann A, Wendtner C M, Eichhorst B F, Staib P, Bühler A, Winkler D, Zenz T, Böttcher S, Ritgen M, Mendila M, Kneba M, Döhner H, Stilgenbauer S: Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. The Lancet, 376: 1164-1174 (2010)

44. Hallek M: Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment. American Journal of Hematology, 94: 1266-1287 (2019)

45. Hallek M, Cheson B D, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, Hillmen P, Keating M, Montserrat E, Chiorazzi N, Stilgenbauer S, Rai K R, Byrd J C, Eichhorst B, O'Brien S, Robak T, Seymour J F, Kipps T J: iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. Blood, 131: 2745-2760 (2018)

46. Hallek M, Fingerle-Rowson G, Fink A, Busch R, Mayer J, Hensel M, Hopfinger G, Hess G, von Gruenhagen U, Bergmann M A, Catalano J, Zinzano P L, Cappio F C, Seymour J F, Berrebi A, Jaeger U, Cazin B, Trneny M, Westermann A, Wendtner C, Eichhorst B F, Staib P, Boettcher S, Ritgen M, Mendila M, Kneba M, Doehner H, Stilgenbauer S, Fischer K: First-Line Treatment with Fludarabine (F), Cyclophosphamide (C), and Rituximab (R) (FCR) Improves Overall Survival (OS) in Previously Untreated Patients (pts) with Advanced Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL): Results of a Randomized Phase III Trial On Behalf of An International Group of Investigators and the German CLL Study Group. Blood, 114: 535 (2009)

47. Hallek M, Wanders L, Ostwald M, Busch R, Senekowitsch R, Stern S, Schick H, Kuhn-Hallek I, Emmerich B: Serum β2-Microglobulin and Serum Thymidine Kinase are Independent Predictors of Progression-Free Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia and Immunocytoma. Leukemia and Lymphoma, 22: 439-447 (1996)

48. Hamblin T J, Davis Z, Gardiner A, Oscier D G, Stevenson F K: Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. Blood, 94: 1848-1854 (1999)

49. Han H, Tanigaki K, Yamamoto N, Kuroda K, Yoshimoto M, Nakahata T, Ikuta K, Honjo T: Inducible gene knockout of transcription factor recombination signal binding protein-J reveals its essential role in T versus B lineage decision. International Immunology, 14: 637-645 (2002)

50. Hoechstetter M A, Busch R, Eichhorst B, Bühler A, Winkler D, Eckart M J, Vehling-Kaiser U, Schimke H, Jäger U, Hurtz H J, Hopfinger G, Hartmann F, Fuss H, Abenhardt W, Blau I, Freier W, Müller L, Goebeler M, Wendtner C M, Bahlo J,

Fischer K, Bentz M, Emmerich B, Döhner H, Hallek M, Stilgenbauer S: Early, risk-adapted treatment with fludarabine in Binet stage A chronic lymphocytic leukemia patients: results of the CLL1 trial of the German CLL study group. Leukemia, 31: 2833-2837 (2017)

51. Huang F W, Hodis E, Xu M J, Kryukov G V, Chin L, Garraway L A: Highly Recurrent *TERT* Promoter Mutations in Human Melanoma. Science, 339: 957-959 (2013)

52. International CLL-IPI working group: An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. The Lancet Oncology, 17: 779-790 (2016)

53. Kaplan E L, Meier P: Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. Journal of the American Statistical Association, 53: 457-481 (1958)

54. Knauf W U, Lissichkov T, Aldaoud A, Liberati A, Loscertales J, Herbrecht R, Juliusson G, Postner G, Gercheva L, Goranov S, Becker M, Fricke H J, Huguet F, Del Giudice I, Klein P, Tremmel L, Merkle K, Montillo M: Phase III randomized study of bendamustine compared with chlorambucil in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. Journal of Clinical Oncology, 27: 4378-4384 (2009)

55. Kopan R, Ilagan M X: The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. Cell, 137: 216-233 (2009)

56. Landau D A, Tausch E, Taylor-Weiner A N, Stewart C, Reiter J G, Bahlo J, Kluth S, Bozic I, Lawrence M, Böttcher S, Carter S L, Cibulskis K, Mertens D, Sougnez C, Rosenberg M, Hess J M, Edelmann J, Kless S, Kneba M, Ritgen M, Fink A, Fischer K, Gabriel S, Lander E, Nowak M A, Döhner H, Hallek M, Neuberg D, Getz G, Stilgenbauer S, Wu C J: Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. Nature, 526: 525-530 (2015)

57. Larrayoz M, Rose-Zerilli M, Kadalayil L, Parker H, Blakemore S, Forster J, Davis Z, Steele A J, Collins A, Else M, Catovsky D, Oscier D G, Strefford J C: Non-coding NOTCH1 mutations in chronic lymphocytic leukemia; their clinical impact in the UK CLL4 trial. Leukemia, 31: 510-514 (2017)

58. Lobry C, Oh P, Mansour M R, Look A T, Aifantis I: Notch signaling: switching an oncogene to a tumor suppressor. Blood, 123: 2451-2459 (2014)

59. López-Guerra M, Xargay-Torrent S, Rosich L, Montraveta A, Roldán J, Matas-Céspedes A, Villamor N, Aymerich M, López-Otín C, Pérez-Galán P, Roué G, Campo E, Colomer D: The γ-secretase inhibitor PF-03084014 combined with fludarabine antagonizes migration, invasion and angiogenesis in NOTCH1-mutated CLL cells. Leukemia, 29: 96-106 (2014)

60. Malcikova J, Stano-Kozubik K, Tichy B, Kantorova B, Pavlova S, Tom N, Radova L, Smardova J, Pardy F, Doubek M, Brychtova Y, Mraz M, Plevova K, Diviskova E, Oltova A, Mayer J, Pospisilova S, Trbusek M: Detailed analysis of therapy-driven clonal evolution of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia. Leukemia, 29: 877-885 (2015)

61. Malecki M J, Sanchez-Irizarry C, Mitchell J L, Histen G, Xu M L, Aster J C, Blacklow S C: Leukemia-associated mutations within the NOTCH1 heterodimerization domain fall into at least two distinct mechanistic classes. Molecular and Cellular Biology, 26: 4642-4651 (2006)

62. Mantel N: Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. Cancer Chemotherapy Reports, 50: 163-170 (1966)

63. Mauro F R, Foa R, Giannarelli D, Cordone I, Crescenzi S, Pescarmona E, Sala R, Cerretti R, Mandelli F: Clinical characteristics and outcome of young chronic lymphocytic leukemia patients: a single institution study of 204 cases. Blood, 94: 448-454 (1999)

64. Mehta C, Patel N: Algorithm 643. FEXACT: a FORTRAN subroutine for Fisher's exact test on unordered r×c contingency tables. ACM Transactions of Mathematical Software, 12: 154-161 (1986)

65. Milano J, McKay J, Dagenais C, Foster-Brown L, Pognan F, Gadient R, Jacobs R T, Zacco A, Greenberg B, Ciaccio P J: Modulation of Notch Processing by γ-Secretase Inhibitors Causes Intestinal Goblet Cell Metaplasia and Induction of Genes Known to Specify Gut Secretory Lineage Differentiation. Toxicological sciences, 82: 341-358 (2004)

66. Moreno C, Greil R, Demirkan F, Tedeschi A, Anz B, Larratt L, Simkovic M, Samoilova O, Novak J, Ben-Yehuda D, Strugov V, Gill D, Gribben J G, Hsu E, Lih C, Zhou C, Clow F, James D F, Styles L, Flinn I W: Ibrutinib plus obinutuzumab versus chlorambucil plus obinutuzumab in first-line treatment of chronic lymphocytic leukaemia (iLLUMINATE): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. The Lancet Oncology, 20: 43-56 (2019)

67. Mössner E, Brünker P, Moser S, Püntener U, Schmidt C, Herter S, Grau R, Gerdes C, Nopora A, van Puijenbroek E, Ferrara C, Sondermann P, Jäger C, Strein P, Fertig G, Friess T, Schüll C, Bauer S, Dal Porto J, Del Nagro C, Dabbagh K, Dyer M J, Poppema S, Klein C, Umaña P: Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. Blood, 115: 4393-4402 (2010)

68. Munir T, Brown J R, O'Brien S, Barrientos J C, Barr P M, Reddy N M, Coutre S, Tam C S, Mulligan S P, Jaeger U, Kipps T J, Moreno C, Montillo M, Burger J A, Byrd J C, Hillmen P, Dai S, Szoke A, Dean J P, Woyach J A: Final analysis from RESONATE: Up to six years of follow-up on ibrutinib in patients with previously treated chronic lymphocytic leukemia or small lymphocytic lymphoma. American Journal of Hematology, 94: 1353-1363 (2019)

69. Nadeu F, Delgado J, Royo C, Baumann T, Stankovic T, Pinyol M, Jares P, Navarro A, Martín-García D, Beà S, Salaverria I, Oldreive C, Aymerich M, Suárez-Cisneros H, Rozman M, Villamor N, Colomer D, López-Guillermo A, González M, Alcoceba M, Terol M J, Colado E, Puente X S, López-Otín C, Enjuanes A, Campo E: Clinical impact of clonal and subclonal TP53, SF3B1, BIRC3, NOTCH1, and ATM mutations in chronic lymphocytic leukemia. Blood, 127: 2122-2130 (2016)

70. Oscier D G, Rose-Zerilli M J J, Winkelmann N, Gonzalez de Castro D, Gomez B, Forster J, Parker H, Parker A, Gardiner A, Collins A, Else M, Cross N C P, Catovsky D, Strefford J C: The clinical significance of NOTCH1 and SF3B1 mutations in the UK LRF CLL4 trial. Blood, 121: 468-475 (2013)

71. Pepper C, Majid A, Lin T T, Hewamana S, Pratt G, Walewska R, Gesk S, Siebert R, Wagner S, Kennedy B, Miall F, Davis Z A, Tracy I, Gardiner A C, Brennan P, Hills

R K, Dyer M J, Oscier D, Fegan C: Defining the prognosis of early stage chronic lymphocytic leukaemia patients. British Journal of Haematology, 156: 499-507 (2012)

72. Pozzo F, Bittolo T, Arruga F, Bulian P, Macor P, Tissino E, Gizdic B, Rossi F M, Bomben R, Zucchetto A, Benedetti D, Degan M, D'Arena G, Chiarenza A, Zaja F, Pozzato G, Rossi D, Gaidano G, Del Poeta G, Deaglio S, Gattei V, Dal Bo M: NOTCH1 mutations associate with low CD20 level in chronic lymphocytic leukemia: evidence for a NOTCH1 mutation-driven epigenetic dysregulation. Leukemia, 30: 182-189 (2016)

73. Puente X S, Bea S, Valdes-Mas R, Villamor N, Gutierrez-Abril J, Martin-Subero J I, Munar M, Rubio-Perez C, Jares P, Aymerich M, Baumann T, Beekman R, Belver L, Carrio A, Castellano G, Clot G, Colado E, Colomer D, Costa D, Delgado J, Enjuanes A, Estivill X, Ferrando A A, Gelpi J L, Gonzalez B, Gonzalez S, Gonzalez M, Gut M, Hernandez-Rivas J M, Lopez-Guerra M, Martin-Garcia D, Navarro A, Nicolas P, Orozco M, Payer A R, Pinyol M, Pisano D G, Puente D A, Queiros A C, Quesada V, Romeo-Casabona C M, Royo C, Royo R, Rozman M, Russinol N, Salaverria I, Stamatopoulos K, Stunnenberg H G, Tamborero D, Terol M J, Valencia A, Lopez-Bigas N, Torrents D, Gut I, Lopez-Guillermo A, Lopez-Otin C, Campo E: Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. Nature, 526: 519-524 (2015)

74. Puente X S, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordóñez G R, Villamor N, Escaramis G, Jares P, Beà S, González-Díaz M, Bassaganyas L, Baumann T, Juan M, López-Guerra M, Colomer D, Tubío J M, López C, Navarro A, Tornador C, Aymerich M, Rozman M, Hernández J M, Puente D A, Freije J M, Velasco G, Gutiérrez-Fernández A, Costa D, Carrió A, Guijarro S, Enjuanes A, Hernández L, Yagüe J, Nicolás P, Romeo-Casabona C M, Himmelbauer H, Castillo E, Dohm J C, de Sanjosé S, Piris M A, de Alava E, San Miguel J, Royo R, Gelpí J L, Torrents D, Orozco M, Pisano D G, Valencia A, Guigó R, Bayés M, Heath S, Gut M, Klatt P, Marshall J, Raine K, Stebbings L A, Futreal P A, Stratton M R, Campbell P J, Gut I, López-Guillermo A, Estivill X, Montserrat E, López-Otín C, Campo E: Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. Nature, 475: 101-105 (2011)

75. Rai K: A critical analysis of staging in CLL. Chronic Lymphocytic Leukemia, Recent Progress and Future Directions, 253-264 (1987)

76. Rai K R, Sawitsky A, Cronkite E P, Chanana A D, Levy R N, Pasternack B S: Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. Blood, 46: 219-234 (1975)

77. Rai K R, Wasil T, Iqbal U, Driscoll N, Patel D, Janson D, Mehrotra B: Clinical staging and prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. Hematology/Oncology Clinics of North America, 18: 795-805 (2004)

78. Rasi S, Khiabanian H, Ciardullo C, Terzi-di-Bergamo L, Monti S, Spina V, Bruscaggin A, Cerri M, Deambrogi C, Martuscelli L, Biasi A, Spaccarotella E, De Paoli L, Gattei V, Foà R, Rabadan R, Gaidano G, Rossi D: Clinical impact of small subclones harboring NOTCH1, SF3B1 or BIRC3 mutations in chronic lymphocytic leukemia. Haematologica, 101: 135 (2016)

79. Rosati E, Sabatini R, De Falco F, Del Papa B, Falzetti F, Di Ianni M, Cavalli L, Fettucciari K, Bartoli A, Screpanti I, Marconi P: γ-Secretase inhibitor I induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells by proteasome inhibition, endoplasmic reticulum stress increase and notch down-regulation. International Journal of Cancer, 132: 1940-1953 (2013)

80. Rosati E, Sabatini R, Rampino G, Tabilio A, Di Ianni M, Fettucciari K, Bartoli A, Coaccioli S, Screpanti I, Marconi P: Constitutively activated Notch signaling is involved in survival and apoptosis resistance of B-CLL cells. Blood, 113: 856-865 (2009)

81. Rossi D, Rasi S, Fabbri G, Spina V, Fangazio M, Forconi F, Marasca R, Laurenti L, Bruscaggin A, Cerri M, Monti S, Cresta S, Famà R, De Paoli L, Bulian P, Gattei V, Guarini A, Deaglio S, Capello D, Rabadan R, Pasqualucci L, Dalla-Favera R, Foà R, Gaidano G: Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. Blood, 119: 521-529 (2012)

82. Rossi D, Rasi S, Spina V, Bruscaggin A, Monti S, Ciardullo C, Deambrogi C, Khiabanian H, Serra R, Bertoni F, Forconi F, Laurenti L, Marasca R, Dal-Bo M, Rossi F M, Bulian P, Nomdedeu J, Del Poeta G, Gattei V, Pasqualucci L, Rabadan R, Foà R, Dalla-Favera R, Gaidano G: Integrated mutational and cytogenetic

analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. Blood, 121: 1403-1412 (2013)

83. Rossi D, Cerri M, Deambrogi C, Sozzi E, Cresta S, Rasi S, De Paoli L, Spina V, Gattei V, Capello D, Forconi F, Lauria F, Gaidano G: The Prognostic Value of TP53 Mutations in Chronic Lymphocytic Leukemia Is Independent of Del17p13: Implications for Overall Survival and Chemorefractoriness. Clinical cancer research, 15: 995-1004 (2009)

84. Schnaiter A, Paschka P, Rossi M, Zenz T, Bühler A, Winkler D, Cazzola M, Döhner K, Edelmann J, Mertens D, Kless S, Mack S, Busch R, Hallek M, Döhner H, Stilgenbauer S: NOTCH1, SF3B1, and TP53 mutations in fludarabine-refractory CLL patients treated with alemtuzumab: results from the CLL2H trial of the GCLLSG. Blood, 122: 1266-1270 (2013)

85. Shanafelt T D, Wang V, Kay N E, Hanson C A, O'Brien S M, Barrientos J C, Erba H P, Stone R M, Litzow M R, Tallman M S: A Randomized Phase III Study of Ibrutinib (PCI-32765)-Based Therapy Vs. Standard Fludarabine, Cyclophosphamide, and Rituximab (FCR) Chemoimmunotherapy in Untreated Younger Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL): A Trial of the ECOG-ACRIN Cancer Research Group (E1912). Blood, 132: LBA-4 (2018)

86. Siegel R L, Miller K D, Jemal A: Cancer statistics, 2020. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 70: 7-30 (2020)

87. Stilgenbauer S: Prognostic markers and standard management of chronic lymphocytic leukemia. Hematology: The American Society of Hematology Education Program, 2015: 368-377 (2015)

88. Stilgenbauer S, Schnaiter A, Paschka P, Zenz T, Rossi M, Döhner K, Bühler A, Böttcher S, Ritgen M, Kneba M, Winkler D, Tausch E, Hoth P, Edelmann J, Mertens D, Bullinger L, Bergmann M, Kless S, Mack S, Jäger U, Patten N, Wu L, Wenger M K, Fingerle-Rowson G, Lichter P, Cazzola M, Wendtner C M, Fink A M, Fischer K, Busch R, Hallek M, Döhner H: Gene mutations and treatment outcome in chronic lymphocytic leukemia: results from the CLL8 trial. Blood, 123: 3247-3254 (2014)

89. Sutton L, Ljungström V, Mansouri L, Young E, Cortese D, Navrkalova V, Malcikova J, Muggen A F, Trbusek M, Panagiotidis P, Davi F, Belessi C, Langerak A W, Ghia P, Pospisilova S, Stamatopoulos K, Rosenquist R: Targeted next-generation sequencing in chronic lymphocytic leukemia: a high-throughput yet tailored approach will facilitate implementation in a clinical setting. Haematologica, 100: 370-376 (2015)

90. Tausch E, Beck P, Schlenk R F, Jebaraj B J, Dolnik A, Yosifov D Y, Hillmen P, Offner F, Janssens A, Babu K G, Grosicki S, Mayer J, Panagiotidis P, McKeown A, Gupta I V, Skorupa A, Pallaud C, Bullinger L, Mertens D, Döhner H, Stilgenbauer S: Prognostic and predictive role of gene mutations in chronic lymphocytic leukemia: results from the pivotal phase III study COMPLEMENT1. Haematologica, 105: 2440-2447 (2020a)

91. Tausch E, Schneider C, Robrecht S, Zhang C, Dolnik A, Bloehdorn J, Bahlo J, Al-Sawaf O, Ritgen M, Fink A, Eichhorst B, Kreuzer K, Tandon M, Humphrey K, Jiang Y, Schary W, Bullinger L, Mertens D, Lurà M P, Kneba M, Döhner H, Fischer K, Hallek M, Stilgenbauer S: Prognostic and predictive impact of genetic markers in patients with CLL treated with obinutuzumab and venetoclax. Blood, 135: 2402-2412 (2020b)

92. Wang J, Khiabanian H, Rossi D, Fabbri G, Gattei V, Forconi F, Laurenti L, Marasca R, Del Poeta G, Foà R, Pasqualucci L, Gaidano G, Rabadan R: Tumor evolutionary directed graphs and the history of chronic lymphocytic leukemia. Elife, 3: 10.7554/eLife.02869 (2014)

93. Wang N J, Sanborn Z, Arnett K L, Bayston L J, Liao W, Proby C M, Leigh I M, Collisson E A, Gordon P B, Jakkula L, Pennypacker S, Zou Y, Sharma M, North J P, Vemula S S, Mauro T M, Neuhaus I M, Leboit P E, Hur J S, Park K, Huh N, Kwok P Y, Arron S T, Massion P P, Bale A E, Haussler D, Cleaver J E, Gray J W, Spellman P T, South A P, Aster J C, Blacklow S C, Cho R J: Loss-of-function mutations in Notch receptors in cutaneous and lung squamous cell carcinoma. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108: 17761-17766 (2011)

94. Weng A P, Ferrando A A, Lee W, Morris J P, Silverman L B, Sanchez-Irizarry C, Blacklow S C, Look A T, Aster J C: Activating Mutations of *NOTCH1* in Human T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. Science, 306: 269 (2004)

95. Wilcoxon F: Individual Comparisons by Ranking Methods. Biometrics Bulletin, 1: 80-83 (1945)

96. Willander K, Dutta R K, Ungerbäck J, Gunnarsson R, Juliusson G, Fredrikson M, Linderholm M, Söderkvist P: NOTCH1 mutations influence survival in chronic lymphocytic leukemia patients. BMC cancer, 13: 274 (2013)

97. Woyach J A, Ruppert A S, Heerema N A, Zhao W, Booth A M, Ding W, Bartlett N L, Brander D M, Barr P M, Rogers K A, Parikh S A, Coutre S, Hurria A, Brown J R, Lozanski G, Blachly J S, Ozer H G, Major-Elechi B, Fruth B, Nattam S, Larson R A, Erba H, Litzow M, Owen C, Kuzma C, Abramson J S, Little R F, Smith S E, Stone R M, Mandrekar S J, Byrd J C: Ibrutinib Regimens versus Chemoimmunotherapy in Older Patients with Untreated CLL. The New England Journal of Medicine, 379: 2517-2528 (2018)

98. Zenz T, Mertens D, Döhner H, Küppers R, Stilgenbauer S: From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. Nature Reviews Cancer, 10: 37-50 (2010)

Danksagung

Die Danksagung wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.