Zentrum für Innere Medizin der Universität Ulm
Klinik für Innere Medizin III
Hämatologie, Onkologie, Rheumatologie, Infektionskrankheiten und Palliativmedizin
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Hartmut Döhner

Prognostische und prädiktive Bedeutung von Mutationen in *NOTCH1* und *FBXW7* in Zusammenhang mit dem CD20-Antikörper Ofatumumab

Dissertation

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

Vorgelegt von Philipp Beck,
aus Freiburg im Breisgau
2018

Meinen Eltern, Dr. Alois und Iris Beck

Amtierender Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Stephan Stilgenbauer

2. Berichterstatter: apl. Prof. Dr. med. Lüder H. Meyer

Tag der Promotion: 10.05.2019

Der in dieser Dissertation verwendete Probensatz stammt aus der multizentrischen Studie COMPLEMENT1 (NCT00748189) (GlaxoSmithKline, London, UK, 2008-2013). Die Auswertung der Daten erfolgte im Rahmen der Dissertation, folglich wurden auch alle zugehörigen Graphen und Abbildungen durch den Dissertanten selbst erstellt.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS I

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS III

1. EINLEITUNG 1

1.1. Chronische Lymphatische Leukämie (CLL) 1
1.1.1. Epidemiologie 1
1.1.2. Das klinische Bild der Chronischen Lymphatischen Leukämie 1
1.1.3. Stadieneinteilung 2
1.1.4. Therapie der Chronischen Lymphatischen Leukämie 3
1.1.5. Prognostische und Prädiktive Faktoren 7
1.1.6. *NOTCH1* 9
1.1.7 *F-Box-and-WD-Repeat-Domain-containing7 (FBXW7)* 11
1.1.8 Zielsetzung der Arbeit 12

2. MATERIAL UND METHODEN 13

2.1 Material 13
2.1.1 Geräte 13
2.1.2 Verbrauchsmaterialien 14
2.1.3 Reagenzien und Chemikalien 14
2.1.4 Patienten 21

2.2 Methodik 22
2.2.1 Next-Generation-Sequencing (NGS) 22
2.2.2 Direktsequenzierung nach Sanger 31

3. ERGEBNISSE 41

3.1 Vergleich Sanger-Sequenzierung mit Next-Generation-Sequencing 41
3.1.1 Sensitivität und Spezifität von NGS anhand der *NOTCH1*-Hotspot-Mutation P2514fs* 41
3.1.2 Spezifität Next-Generation-Sequencing außerhalb des Hotspots 42

3.2 Charakteristika der *NOTCH1*-Mutationen 42
3.3 Charakteristika der *FBXW7*-Mutationen 44

3.4 Korrelation der Mutationen mit prognostischen Faktoren 46
3.4.1 Häufigkeit prognostischer Faktoren 46
3.4.2 Korrelation *NOTCH1-Mut*ation mit klinischen Parametern 46
3.4.3 Korrelation *NOTCH1-Mut*ation mit Zytogenetik und Immunglobulinschwerekette (IGHV) und anderen Mutationen 47
3.4.4 Korrelation *FBXW7*-Mutation mit klinischen Parametern 47
3.4.5 Korrelation *FBXW7*-Mutation mit Zytogenetik und IGHV und anderen Mutationen 47

3.5 Therapieansprechen 48
3.5.1 Therapieansprechen ,progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben von *NOTCH1*-mutierten Patienten 48
3.5.2 Therapieansprechen von *FBXW7* 50
3.5.3 *NOTCH1-Mut*ationen und *FBXW7*-Mutationen als potentielle prädikative Faktoren 51
3.5.4 Multivariate-Analyse 52

4. DISKUSSION 54

4.1 Methodenvergleich Sanger-Sequenzierung und Next-Generation-Sequencing 54
4.1.1 Vergleich NGS und Sanger-Sequenzierung 55
4.1.2 Detektion von *NOTCH1*-Mutationen und *FBXW7*-Mutationen 56

4.2 Auswertung der Daten von *NOTCH1* und *FBXW7* 58
4.2.1 Vergleich der Mutationshäufigkeiten 59
4.2.2 Assoziationen der Mutationen 60
4.2.5 Analyse des progressionsfreien Überleben (PFS) und des Gesamtüberleben (OS) 60

4.3 Die *NOTCH1*-Mutation als prädikativer Marker 61
4.4 Schlussfolgerung 63

5. ZUSAMMENFASSUNG 64
6. LITERATURVERZEICHNIS 66

Danksagung
Lebenslauf

Abkürzungsverzeichnis

Acronym	Definition
A	Alanin
ACP1	Amplicon Control Oligo Pool 1 ()
alloPBSCT	Allogene periphere Blutstammzelltransplantation
Arg,R	Arginin
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
B	Bendamustin
B2MG	ß-2-Mikroglobulin
BIRC3	Baculoviral IAP Repeat-Containing Protein 3
bp	Basenpaar
bzw	Beziehungsweise
C	Cystein
CAT	Custom Amplicon Oligo Tube
CD	Cluster of Differentiation
CIRS	Cummulative-Illness-Rating-Scale
Clb,Chl	Chlorambucil
CLL	Chronische Lymphatische Leukämie
CLP	Clean-up Plate
COSM	Katalog der somatischen Mutationen (Catalogue of Somatic-Mutations)
COSMIC	Catalogue of Somatic-Mutations in Cancer
CR	Komplette Remission
CSR	Cycle-Sequencing-Reaction
D	Asparaginsäure
DAL	Diluted Amplicon Library
DCLLSG	Deutsche-CLL-Studiengruppe
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphate
del	Deletion
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ECOG	Eastern-Cooperative-Oncology-Grou*p*-Performance-Status
Fa	Firma

FBXW7	F-Box and WD-Repeat-Domain-Containing 7
FC	Fludarabin,Cyclophosphamid
FCR	Fludarabin,Cyclophosphamid,Rituximab
FPU	Filter Plate Unit
fs	Frameshift
G	Glycin
GSK	GlaxoSmithKline
H	Histidin
Hb	Hämoglobin
HD	Heterodimerisierungsdomäne
HR	Hazard-Ratio
HYP	Hybridization Plate
IAP	Indexed Amplification Plate
ICN	Intrazelluläre Domäne
Ig	Immunglobulin
IGHV	Immunoglobulinschwerkette
L	Leucin
LNA1	Library Normalization Additives 1
LNB1	Library Normalization Beads 1
LNP	Library Normalization Plate
m	Monate
MBL	Monoklonale B-Zell-Lymphozytose
min	Minute
mPFS	Mittleres progressionsfreies Überleben
mut	Mutation
MYD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
n	Anzahl der Patienten
NaOH	Natriumhydroxid
NGS	Next-Generation-Sequencing
O	Ofatumumab
ORR	Gesamt-Ansprechrate
OS	Gesamtüberleben
p	*p*-Wert
P	Prolin

PAL	Pooled Amplicon Library
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEST-Domäne	Prolin-Glutamat-Serin-Threonin-reiche Domäne
PFS	Progressionsfreies Überleben
PMM2	Polymerase-Kettenreaktion Master Mix 2
POT1	Protection of telomeres protein 1
Q	Glutamin
R	Rituximab
S	Serin
SCF	Skp, Cullin, F-box Containing Complex
sek	Sekunde
SF3B1	Splicing Factor 3B Subunit 1
SGP	Storage Plate
SNV	Einzel-Nukleotid-Variante
ß2MG	ß2-Mikroglobulin
SW1	Stringent Wash 1
T	Threonin
TAD	Transaktivierungsdomäne
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
T-ALL	T-Zell-Akute Lymphatische-Leukämie
TDP1	TruSeq Desoxyribonukleinsäure Polymerase 1
TP53	Tumorsuppressor p53
V	Valin
vs	Versus
W	Tryptophan
WBC	Anzahl weißer Blutkörperchen
WD	Tryptophan, Asparaginsäure
WES	Whole-Exome-Sequencing
WGS	Whole-Genome-Sequencing
wt	Wildtyp
xg	Relative Zentrifugalkraft

1. Einleitung

1.1. Chronische Lymphatische Leukämie (CLL)

1.1.1. Epidemiologie

Die Chronische Lymphatische Leukämie (CLL) ist die häufigste Leukämie des Erwachsenen in der westlichen Hemisphäre (Hallek 2015). In Deutschland erkranken jährlich etwa 2250 Männer und 1500 Frauen pro Jahr neu an einer CLL, was einer altersstandardisierten Inzidenz von 4,1 Männer und 2,1 Frauen pro 100.000 im Jahr entspricht. Mit einem Durchschnittsalter von 70 Jahren zum Zeitpunkt der Erstdiagnose sind vorwiegend ältere Menschen betroffen (Wendtner et al. 2017, Kipps et al 2017). Personen mit weißer Hautfarbe sind dabei deutlich häufiger betroffen als Dunkelhäutige und Asiaten (Dores et al. 2007).

1.1.2. Das klinische Bild der Chronischen Lymphatischen Leukämie

Die CLL ist ein indolentes leukämisches Lymphom. Dabei kommt es zu einer Akkumulation von kleinen B-Lymphozyten mit reifer Erscheinung im Blut, Knochenmark, Lymphknoten und anderen lymphatischen Geweben (Zenz et al. 2010). Diagnostiziert wird nach den Kriterien des internationalen Workshops der CLL meist durch Blutbild, Differentialblutbild, Blutausstrich und Immunphänotypisierung. Ein Kriterium für die Diagnose ist der Nachweis von mindestens 5000 klonalen B-Lymphozyten/ µl für die Dauer von mindestens 3 Monaten. Weiterhin sollten in der zytologischen Untersuchung des Blutausstrichs kleine, morphologisch reife Lymphozyten vorherrschen (Hallek et al 2008, Kipps et al 2017). Diese Lymphozyten zeigen eine geringere Proliferationsrate als normale B-Zellen, haben jedoch eine längere Lebensdauer (Rummel 2002). Außerdem können Gumprechtsche Kernschatten in dem Ausstrich vorhanden sein, Ausstrichartefakte als Folge der erhöhten Zellfragilität (Hallek 2015). Ein weiteres Diagnosekriterium ist die Koexpression der B-Zell-Antigene Cluster of Differentiation (CD)19, CD20 und CD23 mit dem T-Zell Antigen CD5 in der multiparametrischen Immunphänotypisierung. Die Monoklonalität der Zellen ist durch die Leichtkettenrestriktion der Leukämiezellen (Immungloblin (Ig)G kappa oder lgG lambda), vorzugsweise durch Doppelmarkierung von CD19/kappa oder

CD19/lambda, beweisbar (Moreau et al. 1997). Laborbefunde können eine Hypo- oder Hypergammaglobulinämie und autoimmune Zytopenien einschließen (Zenz et al. 2010). Als Folge der Hypogammaglobulinämie, T-Zell- und Komplement-Defekte und verminderter Neutrophilen- und Monozytenfunktion kann es zu wiederkehrenden viralen und bakteriellen Infekten kommen. Herrscht eine Lymphadenopathie mit Nachweis CLL-typischer Zellen bei Fehlen einer Lymphozytose vor, dann spricht man von einem kleinzelligen lymphozytischen Lymphom (small lymphocytic lymphoma, SLL) anstatt von einer CLL.

Der CLL geht meist ein klinisch asymptomatisches und damit selten diagnostiziertes Vorstadium, die Monoklonale-B-Zell-Lymphozytose (MBL), voraus. Hierbei handelt es sich um eine sehr niedrige Anzahl von zirkulierenden monoklonalen B-Zellen ohne Krankheitswert. Das Risiko für einen Übergang einer MBL in eine CLL wird auf etwa 1% /Jahr geschätzt (Kipps et al 2017). Risikofaktoren für die Erkrankung an einer CLL sind höheres Alter, männliches Geschlecht, weiße Hautfarbe und Herkunft (Goldin et al. 2007). Unter anderem da das relative Risiko von Verwandten 1.Grades in Europa und Amerika ungefähr 8,5fach erhöht ist, haben dort ungefähr 5-10 % der CLL-Patienten einen weiteren Leukämie- oder Lymphom-Fall in der Familie (Goldin et al. 2009). MBL wurde sogar in 15,5-18 % bei Verwandten 1.Grades gefunden (Rawstron et al. 2002, Marti et al. 2007).

25 % bis 50 % der Patienten sind bei Erstdiagnose asymptomatisch und werden durch eine absolute Lymphozytose in einem Routineblutbild auffällig (Abbott 2006). Die CLL tritt klinisch sehr heterogen in Erscheinung: während bei einem Teil der Patienten Lymphknotenschwellungen oder Splenomegalie dominieren, ist bei anderen die Lymphozytose führend (Kipps et al 2017).

1.1.3. Stadieneinteilung

Die Stadieneinteilung der CLL erfolgt nach Rai und Binet, wobei in Deutschland erstere bevorzugt wird. Beide beruhen auf körperlicher Untersuchung und einer Blutbildanalyse (Binet et al. 1981, Rai et al. 1975). Die ursprüngliche Rai-Klassifikation wurde modifiziert und die Anzahl der prognostischen Gruppen von 5 auf 3 reduziert (Rai u. Montserrat 1987).

Tabelle 1: Rai-Klassifikation der CLL (nach Rai u. Montserrat 1987)

CLL- Chronische Lymphatische Leukämie, Hb- Hämoglobin

Stadium	Modifizierte Stadien	Merkmale	Mittlere Überlebenszeit (Jahre)
0	Niedriges Risiko	Nur Lymphozytose	>15
I	Mittleres Risiko	Lymphozytose, Lymphadenopathie	9
II	Mittleres Risiko	Lymphozytose, Hepato-u./o. Splenomegalie	5
III	Hohes Risiko	Lymphozytose, Anämie (HB<11g/dl)	2
IV	Hohes Risiko	Lymphozytose, Thrombozytopenie (<100.000/ µl)	2

Tabelle 2: Binet- Klassifikation der CLL (nach Binet et al. 1981)

* zu den Regionen zählen zervikale, axilläre, inguinale LK-Vergrößerungen (unilateral oder bilateral), sowie Leber- und Milzvergrößerungen (Erfassung nur durch körperliche Untersuchung). CLL- Chronische Lymphatische Leukämie, Hb- Hämoglobin.

Stadium	Merkmale	Mittlere Überlebenszeit (Jahre)
A	< 3 vergrößerte Lymphknotenregionen*, keine Anämie oder Thrombozytopenie	>10
B	≥3 vergrößerte Lymphknotenregionen*, keine Anämie oder Thrombozytopenie	5
C	Anämie (Hb<10g/dl) und/oder Thrombozytopenie (<100.000/ µl)	2-3

1.1.4. Therapie der Chronischen Lymphatischen Leukämie

1.1.4.1 Kriterien zur Therapieindikation

Meist wird die Diagnose der CLL in einem asymptomatischen Stadium (Binet A) gestellt und zeigt einen indolenten Verlauf, der über Jahre hinweg langsam progredient sein kann. Im Stadium Binet C sollte immer therapiert werden. In den niedrigen Stadien (Binet A, B) besteht eine Therapieindikation, wenn folgende Zeichen einer symptomatischen/ aktiven Erkrankung erkennbar sind (nach Hallek et al. 2008, Hallek 2015):

1. Massive (d.h. mindestens 6cm unter dem linken Rippenbogen) und symptomatische Splenomegalie.
2. Massive (d.h. mindestens 10cm im längsten Durchmesser) und progrediente oder symptomatische Lymphadenopathie.
3. Lymphozytenverdopplungszeit von weniger als 6 Monaten.
4. Komplikationen wie sekundäre autoimmunhämolytische Anämie und/oder Thrombozytopenie, ohne Ansprechen auf Kortikosteroide oder andere Standardtherapien.

5. B-Symptome.

1.1.4.2 Therapieempfehlungen

Immer, wenn möglich, sollte die Therapie in klinischen Studien erfolgen (Wendtner et al. 2017). Vor dem Beginn einer erneuten Therapie müssen folgende Parameter abgeklärt werden (Hallek u. Pflug 2011):

- Das klinische Stadium (siehe Abschnitt 1.1.3).
- Die Fitness des Patienten.
- Das genetische Risiko der Leukämie.

Die Deutsche-CLL-Studiengruppe (DCLLSG) definiert die Fitness des Patienten über die Kreatininclearance und die Cummulative-Illness-Rating-Scale (CIRS) (Salvi et al. 2008). Abbildung 1 zeigt, wie in der Erstlinientherapie der CLL vorgegangen werden sollte, falls der Patient nicht in eine klinische Studie eingeschlossen werden kann oder dies ablehnt.

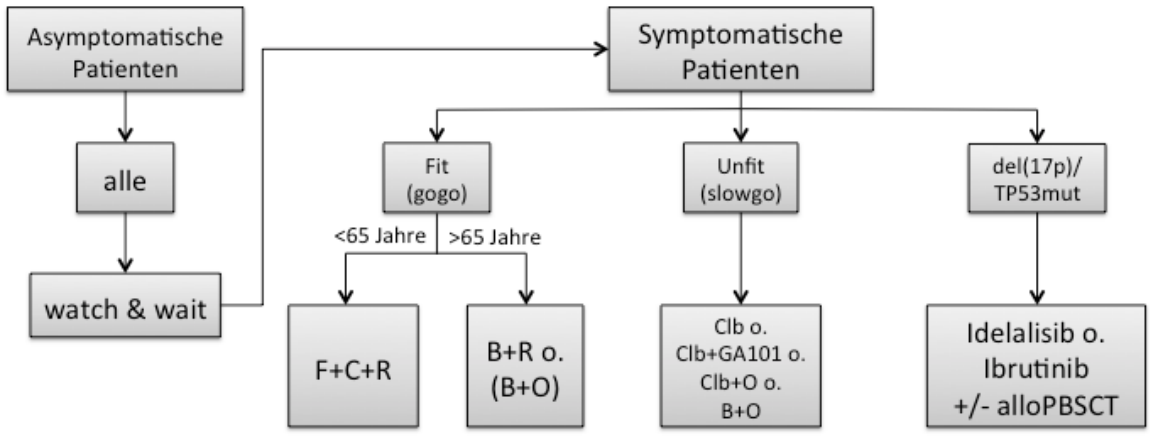


Abbildung 1: Erstlinientherapie der CLL (nach Tausch u. Stilgenbauer, 2014)

F- Fludarabin, C- Cyclophosphamid, R- Rituximab, B- Bendamustin, O- Ofatumumab, Clb- Chlorambucil, allo PBSCT- allogene periphere Blutstammzelltransplantation, watch & wait- abwartendes Verhalten, del(17p)- 17*p*-Deletion, TP53mut- Tumorsuppressor p53-Mutation. GA101- Obinituzumab, CLL- Chronische Lymphatische Leukämie.

Patienten mit Deletion- (del) 17p/*Tumorsuppressor p53-M*utation (TP53mut) haben schon vor Therapiebeginn einen schnelleren Progress. Zusätzlich findet sich bei diesen Patienten ein mangelhaftes Ansprechen auf klassische Therapien (zum Beispiel auf Fludarabin+Cyclophosphamid+Rituximab (FCR)). Dadurch gehören die 17p-Deletion und die *TP53*-Mutation zu den stärksten unabhängigen

prognostischen Faktoren. Zu beachten ist das besondere therapeutische Vorgehen bei Patienten mit einer Hochrisiko-CLL, die durch eine Deletion in Chromosom 17p oder eine *TP53*-Mutation charakterisiert wird (s.u.). In dieser Gruppe sollten Substanzen bevorzugt werden, welche eine vom p53-Signalweg unabhängige Wirkung besitzen (Hallek et al. 2010; Zenz et al. 2010).

Ziel der Therapie ist es, eine Remission zu erreichen. Wird dies nicht geschafft oder ist die Erkrankung innerhalb von 6 Monaten (m) wieder aktiv, spricht man von refraktärer CLL, wogegen ein späterer Progress als Rezidiv bezeichnet wird. Bei einer Remissionsdauer von mindestens 2-3 Jahren kann die vorherige Therapie wiederholt werden. Therapierefraktäre Patienten mit einem Rezidiv innerhalb von 2-3 Jahren sollten aufgrund der ungünstigen Prognose mit neuen Substanzen behandelt werden. Möglichkeiten sind hier die Kinaseinhibitoren Idealisib oder Ibrutinib, die Behandlung im Rahmen von klinischen Studien mit neuen Substanzen oder in seltenen Fällen eine allogene periphere Blutstammzelltransplantation (Byrd et al. 2014; Furman et al. 2014, Tausch u. Stilgenbauer 2014). Diese bleibt nach aktuellem Stand trotz der guten Wirksamkeit der neuen zielgerichteten Therapien die einzige kurative Option in der Behandlung der CLL (Dreger et al. 2010).

1.1.4.3 Chlorambucil

Das alkylierende Zytostatikum Chlorambucil (Clb) hemmt die DNA-Replikation und induziert über die Akkumulation von TP53 die Apoptose. Somit hemmt es die Zellproliferation von schnell wachsendem Gewebe (Begleiter et al. 1996). Clb galt über Jahrzehnte als Goldstandard in der CLL-Therapie. Heute wird es bei älteren Menschen und unfitten Patienten meist in Kombination mit CD20-Antikörpern eingesetzt. Es besitzt eine geringe Toxizität, ist kostengünstig und kann oral verabreicht werden. Allerdings wird mit Clb im Gegensatz zu intensiveren Chemotherapien nur selten eine über Jahre andauernde Remission erreicht. Nach langem Gebrauch kann es zu schwerwiegenden unerwünschten Wirkungen kommen, wie höhergradigen Zytopenien oder der Entwicklung weiterer Malignome, insbesondere einer therapieassoziierten akuten Leukämie oder eines Myelodysplastischen Syndroms (Hallek 2015).

1.1.4.4 Ofatumumab

Eine Verbesserung der Wirksamkeit konventioneller Therapien konnte insbesondere durch die Kombination mit CD20-Antikörper erreicht werden. Das Ziel der CD20-Antikörper ist das CD20-Transmembranglykoprotein, welches ausschließlich auf der Oberfläche von B-Zellen exprimiert wird (Maloney et al. 1997). Die genaue Funktion von CD20 ist noch weitgehend unbekannt, jedoch wird angenommen, dass es eine Rolle in der Aktivierung von B-Zellen, in der Regulation des B-Zellwachstums und der B-Zell Proliferation spielt, aber auch als Transmembrancalciumkanal auftritt (Riley et al. 2000). Spätestens seit der CLL8-Studie der DCLLSG sind CD20-Antikörper in der Standardtherapie etabliert (Hallek 2010, Stilgenbauer et al. 2014). Neben Rituximab, das einen chimären monoklonalen Typ1-CD20-Antikörper darstellt, ist seit wenigen Jahren auch der vollständig humanisierte Typ1-CD20-Antikörper Ofatumumab (O) als Monotherapie oder in Kombination mit Chemotherapie zugelassen. Typ1-CD20-Antikörper wirken durch antikörpervermittelte zelluläre Zytotoxizität, komplementabhängige Zelltoxizität und Apoptoseinduktion. Ofatumumab unterscheidet sich vom häufiger verwendeten Rituximab durch eine Bindung an einem anderen Epitop sowie durch stärkere komplementabhängige Zelltoxizität (Klein et al. 2013). Außerdem kann Ofatumumab Zellen mit einer niedrigeren Expression von CD20, wie zum Beispiel CLL-Zellen, besser lysieren als Rituximab (Teeling et al. 2004). Ofatumumab ist als Monotherapie bei Rezidiv-Patienten zugelassen und scheint auch bei Rituximab-refraktären Patienten zu wirken (Wierda et al. 2011). In einer nicht vergleichenden, internationalen Phase-II-Studie erzielte die Ofatumumab-Monotherapie bei Patienten, welche auf Vortherapien refraktär waren, eine Ansprechrate von 47 - 58 % in Abhängigkeit von der Vortherapie. Die mediane Gesamtüberlebenszeit betrug zwischen 13.7 und 15.4 Monate. Als häufigste Nebenwirkungen traten Infektionen bei sonst tolerabler Toxizität auf (Wierda et al. 2010). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde Ofatumumab als Therapie von Patienten, welche auf ein fludarabinhaltiges Chemotherapieregime oder Alemtuzumab refraktär sind, in der EU und USA zugelassen (Lemery et al. 2010; Gravanis et al. 2010). Eine weitere Indikation erhielt Ofatumumab in Kombination mit Chlorambucil oder Bendamustin bei Patienten, die für eine intensive Therapie nicht geeignet sind. Hier zeigte die Kombination von Ofatumumab und Chlorambucil ein signifikant besseres Gesamtansprechen (82 % vs. 69 %) und ein verlängertes progressionsfreies Überleben (22,4 vs. 13,1 Monate)

im Vergleich zu einer Chlorambucil-Monotherapie (Hillmen et al. 2015). Aus dieser Studie stammten sowohl das Patientenmaterial als auch die klinischen, korrelativen Analysen dieser Arbeit.

Darüber hinaus ist für die Therapie der CLL der Typ2-CD20-Antikörper Obinituzumab (GA101) zugelassen (Goede et al. 2014). Er ist ein humanisierter IgG1-kappa-Antikörper. Im Unterschied zu Typ1-Antikörper führen Typ2-Antikörper nicht zu der oben beschriebenen Translokation. Sie haben also seine verminderte komplementabhängige Zelltoxizität, dafür aber eine stärkere direkte zytotoxische Wirkung (Klein et al. 2013).

1.1.5. Prognostische und Prädiktive Faktoren

Ein prognostischer Marker beschreibt den Krankheitsverlauf unabhängig von der verwendeten Therapie. Im Gegensatz dazu erlaubt ein prädiktiver Marker eine Voraussage über das Ansprechen auf eine bestimme Therapie.

Während einige klinische, laborchemische und genetische Faktoren als prognostische Marker etabliert sind, sind bei der CLL keine allgemein akzeptierten prädiktiven Faktoren bekannt (Stilgenbauer et al. 2014; Zenz et al. 2010).

Als prognostisch ungünstig konnten sowohl klinische und laborchemische als auch genetische Faktoren identifiziert werden. Zu den klinischen Parametern zählen das klinische Stadium (siehe Abschnitt 1.1.3), eine unter 12 Monaten liegende Lymphozytenverdopplungszeit und eine diffuse Knochenmarksinflitration (Montillo et al. 2005).

Einen negativen Einfluss auf die Prognose haben auch erhöhte Konzentrationen von Thymidinkinase, ß2-Mikroglobuline (ß2MG) oder löslichem CD23 im Serum (Hallek et al. 2010; Delgado et al. 2009; Sarfati et al.1996).

Zu den stärksten unabhängigen prognostischen Faktoren gehört die Zytogenetik. Hierbei sind insbesondere die del17p13, die del11q23, die Trisomie 12q13 (+12q) und die del13q zu nennen. Über 80 % der CLL-Patienten zeigen mindestens eine der vier rekurrent auftretenden chromosomalen Aberrationen. Während die del17p den aggressivsten Verlauf beschreibt und auch die del11q und Trisomie 12 als prognostisch ungünstig gelten, verlaufen Erkrankungen mit 13q-Deletion sogar günstiger als bei Patienten mit normalem Karyotyp (Döhner et al. 2000). Werden bei einem Patienten mehrere unterschiedliche Aberrationen nachgewiesen, dann greift das hierarchische Modell nach Döhner: Die Prognose wird dabei immer von der Aberration mit der schlechtesten Prognose bestimmt. Zum Beispiel hat ein

Patient mit einer del17p und einer del13q eine identische Prognose wie ein Patient, der nur eine 17p-Deletion besitzt. Die 13q-Deletion hat in diesem Fall also keinen Einfluss auf die Prognose (Döhner et al. 2000). Die del17p13, welche in 4-9 % der Erstdiagnosen vorhanden ist, ist die seltenste Subgruppe. Sie führt zu einer Inaktivierung des Tumorsuppressorgens *TP53*. Daraus resultiert ein schlechteres Therapieansprechen (vor allem auf klassische Therapien wie zum Beispiel auf Fludarabin+Cyclophosphamid+Rituximab (FCR)), eine verkürzte progressionsfreie Zeit und ein kürzeres Gesamtüberleben (Döhner et al. 1995; Hallek et al. 2010). Allerdings kann auch die alleinige Mutation von *TP53*, ohne del17p13, Ursache einer schlechteren Prognose nach Chemotherapie sein. Patienten mit einer 17p-Deletion und/ oder einer *TP53-M*utation haben die schlechteste Prognose aller Untergruppen (Zenz et al. 2010, Eichhorst u. Hallek 2016).

Sehr wichtig für die Prognose ist der Mutationsstatus variabler Regionen der Immunoglobulinschwerkette (IGHV). Hierbei wird unterschieden in mutierte und unmutierte IGHV, die jeweils mit unterschiedlichen biologischen und klinischen Charakteristika vergesellschaftet sind. Bei einem CLL-Patienten mit einem mutierten IGHV-Status ist die B-Zell-Rezeptor-Signalgebung schwach und die Zellen sind relativ anergisch. Unmutierte IGHV tragen mit größerer Wahrscheinlichkeit eine ungünstige genetische Aberration und haben einen erhöhten Anteil an stereotypen Umordnungen der V, D, J Segmente sowie der leichten Ketten. Zudem besitzen unmutierte IGHV vorbestimmte Muster von somatischen Mutationen (Zenz et al. 2010). Unmutierte IGHV werden also mit kürzeren Überlebenszeiten assoziiert (Hamblin et al. 1999, Damle et al. 1999, Kipps et al 2017).

Erst seit kurzem sind neue Genmutationen bekannt, welche mittels Sequenzierung des Exons – also aller kodierenden Regionen – der Tumorzellfraktion von CLL Patienten entdeckt wurden. Dazu zählen unter anderem Mutationen in den Genen *NOTCH1, Myeloid differentiation primary response gene 88 (MYD88), Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM), Splicing Factor 3B Subunit 1 (SF3B1), F-Box-and-WD-Repeat-Domain-containing7 (FBXW7), Protection of telomeres protein (POT1) und Baculoviral IAP Repeat-Containing Protein 3 (BIRC3)*. Zu den häufigsten Mutationen gehören Mutationen in *SF3B1* und *NOTCH1* (5-20 %). Für *SF3B1*-Mutationen und *NOTCH1*-Mutationen konnte in Studien unabhängig von anderen Einflussfaktoren ein verkürztes progressionsfreies Überleben nachgewiesen

werden (Wang et al. 2011; Puente et al. 2011; Fabbri et al. 2011; Rossi et al. 2011). In der CLL8-Studie der DCLLSG wurde mit *NOTCH1*-Mutationen in der CLL auch ein prädiktiver Faktor gefunden (Stilgenbauer et al. 2014; Schnaiter et al. 2013).

1.1.6. *NOTCH1*

NOTCH ist ein in der Phylogenese stark konserviertes Gen, das in ähnlicher Form auch in der Drosophila-Fliege zu finden ist. Der NOTCH-Signalweg hat Einfluss auf viele Prozesse in der Zellentwicklung und in reifen Geweben, unter anderem auf die Proliferation und die Apoptose von Zellen (Lobry et al. 2014). Bei Säugern sind vier verschiedene NOTCH-Rezeptoren vorhanden. Sie sind durch ein Strukturmotiv, bezeichnet als die Heterodimerisierungsdomäne (HD), nicht kovalent als Heterodimere verbundene Single-Pass-Transmembranrezeptoren (Sanchez-Irizarry et al. 2004).

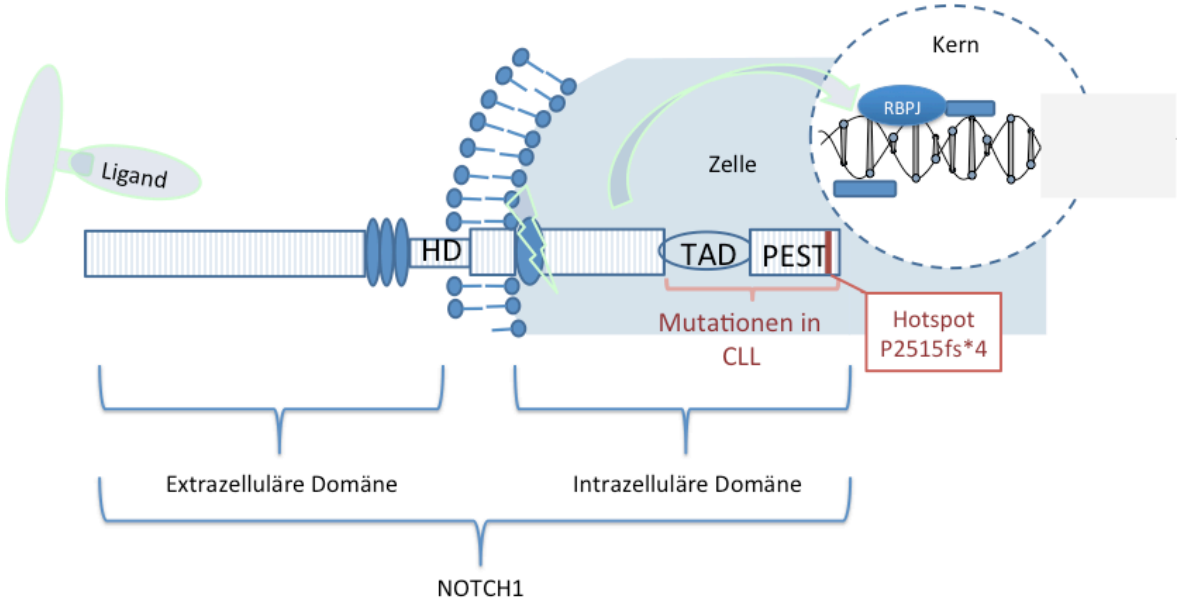


Abbildung 2: NOTCH1 Rezeptor und Signalweg

Die Liganden der NOTCH1-Rezeptoren gehören zu der Delta-Serrate-Lag2-Familie und befinden sich auf der Oberfläche benachbarter Zellen, vor allem auf T-Zellen (Demarest et al. 2008). NOTCH1 besteht aus einer extrazellulären Domäne, welche mit Liganden interagiert und eine Liganden unabhängige Aktivierung verhindert (Rebay et al. 1991; Sanchez-Irizarry et al. 2004). Eine Heterodimersierungsdomäne (HD) verbindet extrazelluläre mit intrazellulärer Domäne (ICN). (Gordon et al. 2007). Die ICN enthält unter anderem eine Transaktivierungsdomäne (TAD) und eine Prolin-Glutamat-Serin-Threonin- reiche- (PEST) Domäne, welche die Proteinstabilität regelt (Radtke et al. 2004; Nam et al. 2006). Sobald die extrazelluläre Domäne mit einem Liganden interagiert, folgen mehrere proteolytische Spaltungen (Schroeter et al. 1998; Demarest et al. 2008). Die abgespaltene ICN migriert in den Kern und bindet einen Desoxyribonukleinsäure-gebundenen Transkriptionsfaktor RBPJ (CSL), welcher in Abwesenheit der ICN als ein Transkriptionsrepressor funktioniert (Dou et al. 1994). Hierdurch wird ein kurzlebiger Transkriptionsaktivierungskomplex geschaffen, welcher im Anschluss durch das *F-Box-and-WD-Repeat-Domain-containing7 (*FBXW7) degradiert wird (Thompson et al. 2008). P- Prolin, fs- Frameshift.

Es gibt eine große Anzahl an Genen, die durch NOTCH1 reguliert werden. Ein gut charakterisiertes Transkriptionsziel ist zum Beispiel das Protonkogen *MYC* (Hamidi et al. 2011). In der Hämatopoese kann NOTCH1, abhängig von dem zukünftigen Entwicklungsweg der Zelle, entweder die Rolle eines Tumorsuppressors oder die eines Onkoproteins einnehmen. (Lobry et al. 2014).

Über 50 % der T-Zell-Akuten-Lymphatischen-Leukämie (T-ALL) -Patienten besitzen aktivierende *NOTCH1*-Mutationen. Während diese vorwiegend in der HD-Domäne auftreten, sind in der CLL meist Mutationen in der Prolin-Glutamat-Serin-Threonin-reiche- (PEST) Domäne zu finden. Mutationen in der PEST-Domäne scheinen die Halbwertszeit der intrazellulären Domäne zu erhöhen, indem sie die Degradation durch FBXW7 verhindern (Weng et al. 2004; Thompson et al. 2008). In der PEST-Domäne, auf Exon 34, befinden sich auch die *NOTCH1*-aktivierenden Mutationen, welche in der CLL zu finden sind. 80 % der CLL Patienten mit *NOTCH1*-Mutationen besitzen in diesem Bereich dieselbe Frameshift-Mutation (P2514fs*4). In der CLL beträgt die Häufigkeit von Mutationen in *NOTCH1* 4 %-18 % (Wang et al. 2011; Fabbri et al. 2011; Jeromin et al. 2014; Oscier et al. 2013; Sutton et al. 2015). In ersten Untersuchungen einer heterogenen CLL-Population wurden *NOTCH1*-Mutationen vermehrt in Patienten mit einem unmutierten IGHV (20,4 %), einer späteren Transformation in ein Richter-Syndrom (31,0 %) und in Fludarabin refraktärer CLL (20,8 %) gefunden (Fabbri et al. 2011; Puente et al. 2011). In den meisten bisherigen Studien haben die von *NOTCH1*-Mutationen betroffenen Patienten eine kürzere Gesamtüberlebenszeit und eine kürzere Zeit bis zur Krankheitsprogression (Ginafelici 2012). Mit der Untersuchung von über 600 Patienten der CLL8-Studie der DCLLSG wurden diese Studienergebnisse in Frage gestellt. Hier wurde nicht nur keine Assoziation von *NOTCH1*-Mutationen mit fortgeschrittener Krankheit gefunden, sondern sogar ein niedrigeres Stadium, weniger B-Symptome und eine niedrigere Anzahl weißer Blutzellen. Zudem konnten innerhalb dieser großen Studie *NOTCH1*-Mutationen nicht als unabhängiger prognostischer Marker bestätigt werden. Vielmehr konnte anhand des Studiendesigns einer zweiarmigen Studie mit und ohne dem CD20-Antikörper Rituximab *NOTCH1*-Mutationen als prädiktiver Faktor etabliert werden: Während bei Patienten mit *NOTCH1*-Wildtyp das progressionsfreie Überleben im FCR Arm im Vergleich zu FC deutlich verlängert war, fand sich bei *NOTCH1* mutierten Patienten hier kein Vorteil. Somit profitieren nur Patienten ohne *NOTCH1*-Mutation

von CD20 Antikörpern. Interessant bleibt, ob auch andere CD20-Antikörper bei diesem Patientenkollektiv eine reduzierte Wirksamkeit aufzeigen.

1.1.7 *F-Box-and-WD-Repeat-Domain-containing7 (FBXW7)*

F-Box-and-WD-Repeat-Domain-containing7 (FBXW7) ist eine E3-Ligase, welche zur F-Box Protein-Familie gehört. FBXW7 dient als Substratadapter für den Skp1-Cul1-F-Box-Protein-Rbx1(SCF)-Ubiquitin-Ligase-Komplex und vermittelt die Erkennung und Bindung der Substratproteine. Das gemeinsame Merkmal aller F-Box Proteine ist das 40 Aminosäuren umfassende F-Box-Motiv, welches direkt mit Skp1 interagiert (Bai et al. 1996). Die C-terminale Region mit ihren acht WD (Tryptophan, Asparaginsäure) -40-Wiederholungen ist für die Erkennung phosphorylierter Substrate zuständig (Orlicky et al. 2003). Das *FBXW7* Gen codiert für 3 verschiedene Isoformen (α, β und γ), wobei α die wichtigste Isoform in humanen Zellen ist (Ho et al. 2006). Der Komplex aus SCF und FBXW7 ist zuständig für die Degradation mehrerer Proteine, welche eine wichtige Rolle beim Wachstum, bei der Proliferation, bei der Differenzierung und bei dem Überleben von Zellen spielt (Welcker u. Clurman 2008).

FBXW7 ist ein Regulator von Onkoproteinen und spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des NOTCH-Signalwegs. Nicht nur NOTCH1 und 4, sondern auch das NOTCH1-Transkriptionsziel MYC sind Substrate der durch FBXW7 vermittelten Ubiquitinierung (Welcker u. Clurman 2008; Yada et al. 2004; Oberg et al. 2001). Die Phosphorylierung von NOTCH1 in der PEST-Domäne führt zur Bindung von FBXW7 (Fryer et al. 2004; O'Neil et al. 2007).

FBXW7 ist auf dem Chromosom 4q31.3 lokalisiert, welches in verschiedensten Tumorentitäten deletiert ist (Knuutila et al. 1999; Tan et al. 2008). Die durchschnittliche Mutationsrate von *FBXW7* aller Tumore beträgt in etwa 6 %. Die höchste Rate findet man in Cholangiozellulären Karzinomen mit 35 % und T-Zell-ALL mit 31 %. Die meisten Mutationen sind Punktmutationen, durch die es zu Fehlern in der Substratbindung kommt. Ungefähr 40 % der Mutationen befinden sich in der WD40-Domäne (mit den Hotspots Arg^{465} und Arg^{479}) (Akhoondi et al. 2007). Die Mehrheit der restlichen Mutationen sind Nonsense-Mutationen, welche in einer vorzeitigen Beendigung der Translation resultieren (Welcker u. Clurman 2008). In der CLL treten Mutationen von *FBXW7* in 2,5-4 % auf (Wang et al. 2011; Jeromin et al. 2014). *FBXW7-M*utationen sind, wie *NOTCH1-M*utationen, assoziiert mit Trisomie 12, wobei *NOTCH1*- und *FBXW7*-Mutationen jedoch nicht beim

gleichen Patienten vorkommen (Wang et al. 2011).

1.1.8 Zielsetzung der Arbeit

Die jüngsten Erkenntnisse lassen den prädiktiven Effekt von *NOTCH1*-Mutationen auf die Wirksamkeit von CD20-Antikörpern, einer Standardkomponente der aktuellen CLL-Therapie, vermuten. Bisher konnte dies klinisch nur anhand einer zweiarmigen Studie mit jeweils einem Therapiearm mit und ohne Rituximab aufgezeigt werden. Im Rahmen der COMPLEMENT1-Studie der Firma GlaxoSmithKline (GSK) steht eine zweite Studie zur Verfügung, die analog zur CLL8 der DCLLSG zweiarmig angelegt ist – jeweils mit und ohne den CD20-Antikörper Ofatumumab. Zur Bestimmung des Mutationsstatus wurden alle verfügbaren Patientenproben auf *NOTCH1*-Mutationen und auf, ebenfalls in der CLL rekurrent vorkommende, *FBXW7*-Mutationen untersucht. Zur Erweiterung der bisher im Labor etablierten Sanger-Sequenzierung des P2514fs*4-Hotspot soll mittels Next-Generation-Targeted-Sequencing sowohl der untersuchte Bereich erweitert werden als auch die Sensitivität für subklonale Mutationen erhöht werden. Letztendlich wird die Korrelation des Mutationsstatus mit Klinik, Zytogenetik, Häufigkeit anderer Mutationen und progressionsfreiem Überleben der Studienkohorte sowie der beiden Therapiearme getrennt untersucht. Sollte sich ein prädiktiver Effekt für die Wirksamkeit von CD20-Antikörpern bestätigen, könnte dies zu therapeutischen Konsequenzen für Patienten mit behandlungspflichtiger CLL und *NOTCH1-M*utationen führen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Geräte

PCR- Polymerase-Kettenreaktion, Fa.- Firma

Bezeichnung	Hersteller	Nummer
2720 Thermal Cycler	Fa. Applied Biosystems, FosterCity, USA	4359659
3500xL-DX-Genetic-Analyzer	Fa. Thermo Fisher Scientific, Waltham,USA	
37 °C Wasserbad	Fa. Heraeus, Hanau	
Abfallständer für Vernichtungsbeutel	Fa, Ratiolab, Dreiech	RATI700 1400
Abschlussschiene für Gelschlitten	Werkstatt der Uniklinik Ulm	
Bechergläser (50 ml, 200 ml, 500 ml)	Fa. Schott AG/Duran	
Biofuge fresco	Fa. Heraeus, Hanau	
Biofuge pico	Fa. Heraeus, Hanau	
Chemikalienlöffel, beidseitig	Fa. RSG Solingen, Solingen	231-2274
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	
Eismaschine MF22	Fa. Scotsman, Vernon Hills, USA	
Elektrische 8-Kanal-Pipette 100-1250 µl	Fa. VWR, Darmstadt	613-0414
Elektrophoresekammern	Fa. MBT Brand, Gießen	
Erlenmeyerkolben 500 ml	Fa. Duran, Wertheim/Mainz	214-1164
Gefrierschrank		
GelDoc XR	Fa. Biorad, Hercules, USA	
Gelschlitten	Werkstatt der Uniklinik Ulm	
Glastrichter	Fa. Duran, Wertheim/Mainz	221-1116
Heat Block, 96-well Scigene, Hybex Microsample Incubator for PCR plate	Fa. Scigene, Sunnyvale, USA	
Heizblock	Fa. Liebisch GmbH & Co. KG Labortechnik, Bielefeld	
Kühlzentrifuge GS-15R	Fa. Beckman Coulter, Krefeld	
Kühlzentrifuge J2-21ME	Fa. Beckman Coulter, Krefeld	

Fortsetzung

Fortsetzung Tabelle 3

Bezeichnung	Hersteller	Nummer
Mehrkanal-Pipetten mit variabler Volumeneinstellung, 8-Kanal (0,5-10 µl)	Fa. Eppendorf, Hamburg	3114 00 0.115
Mikrowelle	Fa. Siemens, München	
Minizentrifuge	Fa. Qualitron, Rescaldina, Italien	
Minizentrifuge	Fa. Qualitron, Rescaldina, Italien	
MiSeq Desktop Sequencer	Fa. Ilumina Inc, San Diego, USA	
Multipette plus	Fa. Eppendorf, Hamburg	4981 00 0.019
Multipette® stream	Fa. Eppendorf, Hamburg	
Pipetboy acu	Fa. IBS Integra Biosciences, Fernwald	155018
Post-PCR Plate Shaker	Q Instruments, BioShake iQ High Speed Thermal mixer	808-0506
Power Supply E431	Fa. Consort, Turnhout, Belgien	
QIAvack 96	Fa. Qiagen GmbH, Hilden	
Sequencer 3130XL	Fa. Applied Biosystems, FosterCity, USA	
Styroporbox	Werkstatt der Uniklinik Ulm	
Thermomixer comfort	Fa. Eppendorf, Hamburg	5355 00 0.011
Vakuumpumpe Laboport	Fa. KNF/Neuberger	
Vortexer	Fa. Scientific Industries, Bohemia, USA	444-5900
Waage Precisa 400M	Fa. PAG Oerlikon AG, Pfäffikon, Schweiz	

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien

Fa.-Firma, PCR-Polymerase-Kettenreaktion

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
15 ml konische Röhrchen (15 ml-Falcon)	Fa. BD Falcon, New Jersey	352096
96 Well Plate Septa	Fa. Applied Biosystems, FosterCity, USA	4315933
96-well skirted PCR plates, 0.2 ml, polypropylene	Fa. Biorad, Hercules, USA	MS*P*-9601
96-well storage plates, 0.8 ml (MIDI plates)	Fa. Fisher Scientific, Waltham,USA	AB-0765;AB-0859
Adhesive aluminum foil seal	Fa. Beckman Coulter, Krefeld	
Alufolie	Fa. Ecopla, Andenne, Belgien	293-4219
ART Aerosol Resitant Tips, 10	Fa. Fisher Scientific, Waltham,USA	2139
ART Aerosol Resitant Tips, 1000 Reach	Fa. Fisher Scientific, Waltham,USA	2079
ART Aerosol Resitant Tips, 1000E	Fa. Fisher Scientific, Waltham,USA	2079E
ART Aerosol Resitant Tips, 100E	Fa. Fisher Scientific, Waltham,USA	2065E

Fortsetzung

Fortsetzung Tabelle 4

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
ART Aerosol Resitant Tips, 200	Fa. Fisher Scientific, Waltham,USA	2069
ART Aerosol Resitant Tips, 20P	Fa. Fisher Scientific, Waltham,USA	2149P
Combitips plus 1,0 ml	Fa. Eppendorf, Hamburg	0030 069.234
Combitips plus 5,0 ml	Fa. Eppendorf, Hamburg	0030 069.250
Einmalhandschuhe Dermaclean	Fa. Ansell, Iselin, USA	PFC4303972 (Größe M)
Einmaltücher	Fa. Kimberly Clark, Dallas, USA	7102
Entsorgungsbeutel 200x300mm	Fa, Ratiolab, Dreiech	7001005
Eppendorf microcentrifuge tubes (screw top recommended)	Fa. Eppendorf, Hamburg	
Eppendorftubes-Ständer	Fa. VWR, Darmstadt	211-0207
Half Skirt 96 Well PCR Plate	Fa. VWR, Darmstadt	
Kryo-Box, beschichtet 136x136x50 (blau)	Fa, Ratiolab, Dreiech	5141502
Magnetrührstäbchen	Fa. VWR, Darmstadt	442-0484
Messzylinder 1l	Fa. Hirschmann, Eberstadt	612-1538 (VWR)
MicroAmp 8-Cap Strip	Fa. Applied Biosystems, FosterCity, USA	N801-0535
MicroAmp 8-Tube Strip	Fa. Applied Biosystems, FosterCity, USA	N801-0580
MicroAmp Adhesive Film Applicator	Fa. Applied Biosystems, FosterCity, USA	4306311
MicroAmp Optical 96 Well Reaction Plate	Fa. Applied Biosystems, FosterCity, USA	N801-0560
MicroAmp Splash Free 96-Well Base	Fa. Applied Biosystems, FosterCity, USA	4312063
Microseal 'A' adhesive seals	Fa. Biorad, Hercules, USA	MSA-5001
Microseal 'B' adhesive seals	Fa. Biorad, Hercules, USA	MSB-1001
Multi-Safe 0,7l (Tischabfall)	Fa. Sarstedt, Nümbrecht	771.595.006
Pipettenspitze 1000 µl	Fa. Kinesis GmbH, Langenfeld,	10014
Pipettenspitze 10 µl	Fa. Kinesis GmbH, Langenfeld,	60099572
Pipettenspitze 200 µl	Fa. Kinesis GmbH, Langenfeld,	60099573
QIAquick 96 Plates	Fa. Qiagen GmbH, Hilden	436178989
QIAshredder	Fa. Qiagen GmbH, Hilden	79656
Rastereinsatz für Kryo-Box	Fa. Ratiolab, Dreiech	5120170
Safe-Lock Reaktionsgefäß 1,5 ml	Fa. Ratiolab, Dreiech	0030 120.086
Safe-Lock Reaktionsgefäß 2 ml	Fa. Ratiolab, Dreiech	0030 120.094
Sondermüllbehälter 60l	Infa Lentjes, Herdecke	3852054
Stabpipetten 10 ml	Fa. BD Falcon, New Jersey	357551
Sterile Pipettenspitzen 100-1250 µl	Fa. VWR, Darmstadt	613-0274
Thermowell Sealing Tape	Fa. Corning Inc., Corning,, USA	6570
TruSeq Custom Amplicon Filter Plate	Fa. Ilumina Inc, San Diego, USA	FC-130-1006
TruSeq Index Plate Fixture and Collar Kit	Fa. Ilumina Inc, San Diego, USA	FC-130-1007
TruSeq Index Plate Fixture Kit	Fa. Ilumina Inc, San Diego, USA	FC-130-1005

2.1.3 Reagenzien und Chemikalien

Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendet Reagenzien und Chemikalien

Fa.-Firma,, bp-Basenpaare, NaOH-Natriumhydroxid, EDTA-Ethylendiamintetraessigsäure, PCR-Polymerase-Kettenreaktion, HCl-Chlorwasserstoff, DNA-Desoxyribonukleinsäure

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
10 N NaOH		
100 bp DNA Ladder (500µg/ ml)	Fa. New England Biolabs Inc, Ipswich, USA	N3231L
10x BlueJuice Loading Buffer	Fa. Invitrogen, Karlsruhe	10816-015
10x PCR-Puffer	Fa. Qiagen GmbH, Hilden	In 203205 enthalten
1M TRISHCl pH 8	Fa. Sigma	T3038-1L
5x Sequencing Buffer	Fa. Applied Biosystems, FosterCity, USA	4339843 mit 433677
Agencourt AMPure XP, 60 ml kit	Fa. Beckman Coulter, Krefeld	A63881/A63880
Aqua ad iniectabilia Braun mini Plasco	Fa. Braun, Melsungen	2351744
Bacto Agar	Fa. BD, Franklin Lakes, USA	214010
BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Fa. Applied Biosystems, FosterCity, USA	4336776
Deoxynucleoside Triphosphate Set PCR Grade	Fa. Roche, Basel, Schweiz	11 969 064 001
DNA-Polymerase 1 (10 000U/ ml)	Fa. New England Biolabs Inc, Ipswich, USA	M-0209L
DNase	Fa. Roche, Basel, Schweiz	104159
DNase I RNase frei	Fa. Roche, Basel, Schweiz	04 716 728 001
DyeEx 2.0 Spin Kit (250)	Fa. Qiagen GmbH, Hilden	63206
DyeEx 96 Kit (24)	Fa. Qiagen GmbH, Hilden	63183
EDTA Puffer 0,5M EDTA	Fa. GIBCO	15575-038
Essigsäure 100 %	Fa. AppliChem, Darmstadt	A0820
Ethanol absolut	Fa. VWR, Darmstadt	20821330
Ethidiumbromid 0,07 %,	Fa. AppliChem, Darmstadt	A2273,0005
Hi-Di Formamide	Fa. Applied Biosystems, FosterCity, USA	4311320
HotStarTaq DNA Polymerase 1000Units	Fa. Qiagen GmbH, Hilden	in 203205 enthalten
QIAquick® PCR Purification Kit (250)	Fa. Qiagen GmbH, Hilden	28106
QIAquick 96 PCR-Purification Kit	Fa. Qiagen GmbH, Hilden	28183
TrackIt 100 bp Ladder	Fa. Invitrogen	10488-085
TRIS EDTA Buffer Solution pH7,4	Fa. Fluka	93302
TruSeq Custom Amplicon Index Kit	Fa. Ilumina Inc, San Diego, USA	FC-130-1003
TruSeq Custom Amplicon Kit	Fa. Ilumina Inc, San Diego, USA	FC-130-1001

2.1.3.1 Zusammensetzung der verwendeten Lösungen:

- 50x TRIS-Acetat-EDTA- (TAE) Puffer (2M TRIS, 1M Essigsäure, 50mM EDTA, pH 8.5)

2.1.3.2 Primer

Tabelle 6: Primer für Next-Generation-Sequencing (NGS)

C- Cytosin, T- Thyamin, A- Adenosin, G- Guanin

Zielregion	Startposition	Endposition	Strang	ULSO Sequenz
NOTCH1-34_Exon (15794634)_14200181	139390394	139390624	+	TTTAAAAAGGCTCCTCTGGTCGGCCCTGGCATCCACAGAGCGCACACAGACGCCCGAAGGCTTGGGAAAGGAAGCCGGGGTCTCGTGGGGCGCGCCGTTTACTTGAAGGCCTCCGGAATGCGGGCGATCTGGGACTGCATGCTGGTGGGAGGGCTGGAGACGCCCTCGGACCAGTCG
NOTCH1-34_Exon (15794634)_14200182	139390572	139390797	-	GGTCCCACCCGTGACCGCAGCCCAGTTCCTGACGCCCCCCTCGCAGCACAGCTACTCCTCGCCTGTGGACAACACCCCCAGCCACCAGCTACAGGTGCCTGAGCACCCCTTCCTCACCCCGTCCCCTGAGTCCCCTGACCAGTGGTCCAGCTCGTCCCCGCATTCCAACGTCTCCG
NOTCH1-34_Exon (15794634)_14200183	139390752	139390987	+	CCAGCGAGGATGGCAGCGACGTGGGCAGGGCGGGGCTCTCCTGGGGCAGAATAGTGTGCACCGCCAGGCTGCTGGGGCCCAGTGGCTGCACGTCTGCCTGGCTCGGCTCTCCACTCAGGAAGCTCCGGCCCAGGTGGCCGCTGGCTGCTGAGCTCACGCCAAGGTGCGGCTGTGGTGGTGGTGGTG
NOTCH1-34_Exon (15794634)_14200184	139390934	139391161	-	ACAGTAGCCTTGCTGCCAGCGCCCTGTCCCAGATGATGAGCTACCAGGGCCTGCCCAGCACCCGGCTGGCCACCCAGCCTCACCTGGTGCAGACCCAGCAGGTGCAGCCACAAAACTTCAGAGCAGCAGCAGAACCTGCAGCCAGCAAACATCCAGCAGCAGCAAAGCCTGCAGCCGCCACC
NOTCH1-34_Exon (15794634)_14200185	139391112	139391337	+	GTGCAGCGGGCCTACCATGCCATGCTGCAGGGAGGGGGCCTGTGTGCTCAGGGGGCCTGGTGCCACACTCCCCCGCAGAGGGTTGTATTGGTTCGGCACCATGCCGCTCTGCAGCCGGGACAGCCACTCGCATTGACCATTCAAACTGGTGGACCCGCCCACAGTGAAATTCAG
NOTCH1-34_Exon (15794634)_14200186	139391284	139391509	-	CTGGGATGCCCGACACCCACCTGGGCATCGGGCACCTGAACGTGGCGGCCAAGCCCGAGATGGCGGCGCTGGGTGGGGGCGGCCGGCTGGCCTTTGAGACTGGCCCACCTCGTCTCTCCCACCTGCCTGTGGCCTCTGGCACCAGCACCGTCCTGGGCTCCAGCAGCGGAGGGGCCC
NOTCH1-34_Exon (15794634)_14200187	139391464	139391689	+	GGCAGGTGGTTGAGGGGCACGGACGGAGACTGCTGGAACGGGGAGGGCAGCAGTGGCGGCGAGGCCACGTCTGACAGGTAGCCATGGGGTGACTCCAGGGAGTCCACGGGCGAGAGCATGCCGGAGCTGTCCAGCAGGCAGCCCTTGCCGTCCTGGGACTTCTTCCTCCGTGCCTTGAG
NOTCH1-34_Exon (15794634)_14200188	139391642	139391866	-	CTGGTGCGCAGCCCGCAGCTGCACGGAGCCCCGCTGGGGGGCACGCCCACCCTGTCGCCCCCGCTCTGCTCGCCCAACGGCTACCTGGGCAGCCTCAAGCCCGGCGTGCAGGGCAAGAAGGTCCGCAAGCCCAGCAGCAAAGGCCTGGCCTGTGGAAGCAAGGAGGCCAAGGACC
NOTCH1-34_Exon (15794634)_14200189	139391812	139392075	+	GGTTGTACTCGTCCAGCAGCCTCACGATGTCGTGATGCATGCGCTCCTGTGCGATGTCGCGCGGCAGGCGGTCCATATGATCCGTGATGTCCCGGTTGGCAAAGTGGTCCAGCAGCACCTTGGCGGTCTCGTAGCTGCCCTCCCGGGCGGCCAGAAACAGGGGTGTCTCCTCCTGGGGGATGAGGGCGGGGGCCGGTGAGGGGGGCCAGGC
NOTCH1-33_Exon (17960215)_14200197	139393306	139393575	+	GGCATCCCAGCCTCGCGCTCACCCTGTTGTTCTGCATATCTTTGTTAGCCCCGTTCTTCAGGAGCACAACTGCGGCATCCACATTGTTCACGGCGGCGGCCCAGTGCAGGGCGGACTTGCCTGCGTGAAAGAAGCAGATGGGGTAGGTTGGAGACCAGCTGGAGGCAACCCAGTCCCACCCGTCCCTGTGGCGGTCCCGCCCCACGACAGAGCAGCCGTGC
FBXW7_Exon (15799827)_14200234	153243851	153244081	+	TGTAGGTCTTTTCAATCTGTTGCCCCAAGCCAACATCCTGCACCACTGAGAACAAGGGATTTTTTTCTTTTTCTTTTCTTTTTTTCTTTTTGCAGGGGGAAGGGCAGGGAGTATATCGTCTACACAATTGGACAAATTCATCTTTTCTGCTCTTCACTTCATGTCCACATCAAAGTCCA
*FBXW7*_Exon (15799827)_14200235	153244029	153244261	-	AGATGATGGAACTGTAAAACTATGGGACTTGAAAACGGGTGAATTTATTCGAAACCTAGTCACATTGGAGAGTGGGGGGAGTGGGGGAGTTGTGTGGCGGATCAGAGCCTCAAACACAAAGCTGGTGTGTGCAGTTGGGAGTCGGAATGGGACTGAAGAAACCAAGCTGCTGGTGCTG
*FBXW7*_Exon (15799827)_14200236	153244205	153244477	+	TGAGCTGGTAATTACAAAGTTCTTGTTGAACTGTAAACAGGTCACAGCACTCTGATGCTTGTTGGGACCTAGACAAAAACCAAAAGAATTTAATTACTGGTTAGAAATAATGGCTATGAGTTAGTTACATTATAATTTGTAGACTTCTACTTTAGAACATACAATAAATGCAACATTTGAAATGATACATATTTAGAAACCCATGTCCTCAGTAT
*FBXW7*_Exon (16249800)_14200262	153245189	153245426	+	TTTTCTGAAGTAACCATTCTGTATGAGGTTGACTCTTTTTGTGATGCTAAGGCTCCATATTTCTCTTGAATAATGATCTCATTTTTAATGAACAAAACGAAAGGTGAGTAAGACTTACCTTGCAATGTTTGTAAACACTGTCCTGTTTTGATATCCCAGATTTTAACTGTAGAATCTGCAT
*FBXW7*_Exon (16249800)_14200263	153245371	153245645	-	CTACTAGGATTAAGGTCAGTAATTGATAGGAAGAGTATCCATACTTCTATTCTAATAAACTGTGTCTTTTGTAGTTTGATGGTATCCATGTGGTGAGTGGATCTCTTGATACATCAATCCGTGTTTGGGATGTGGAGACAGGGAATTGCATTCACACGTTAACAGGGCACCAGTCGTTAACAAGTGGAATGGAACTCAAAGACAATATTCTTTGTCTCTGGGAA

Fortsetzung

Fortsetzung Tabelle 6

Zielregion	Startposition	Endposition	Strang	ULSO Sequenz
*FBXW7*_Exon (18199207)_14 200268	153247009	153247234	+	AATAATCTGATTAATCTTTTTTGGACTGTACTGGATCAGCAAT TTGACAGTGATTATCTGAGTAAAACAACCTTATGATTCATCAG GAGAGCATTTAAGGGAGAGATAAGAGATCTTACCTGTAATGA ATAGACTCTATTAGTATGCCCCTGCAACGTGTGTAGACAG
*FBXW7*_Exon (18199207)_14 200269	153247161	153247390	-	GAGATGCCACTCTTAGGGTTTGGGATATTGAGACAGGCCAG TGTTTACATGTTTTGATGGGTCATGTTGCAGCAGTCCGCTGT GTTCAATATGATGGCAGGAGGGTTGTTAGTGGAGCATATGAT TTTATGGTAAAGGTGTGGGATCCAGAGACTGAAACCTGTCTA CACACGTTG
*FBXW7*_Exon (18199207)_14 200270	153247343	153247594	+	CGAGAACCGCTAACAACTCTGCAGAGGGAGAAACAGAAAAA CAAAACAAAACAAAAAAACCCACGTTTAGAATTTTTAATAATA TGAGAAAACATGGTAGATTTAGTCAAGGTTTTTTAGCTTTTTT TTTTTTTTTTTTACACAGCAACAACCATTTTCAAAAGAAATCCT ATGTAAAACCTTGGTATATAAACATAATAA
*FBXW7*_Exon (16467505)_14 200264	153249211	153249441	+	TAATAATTAAATCTAATTTAAGAGCACACTGTCACTATTTCAG TAACTCTACACAGAAAGGGCCCAAATTCACCAATAATAGAGG AAGAAGTCCCAACCATGACAAGATTTTCCCTTACCTTTTTTCA TGAAGATGCATACAACGCACAGTGGAAGTATGCCCATATAAG GT
*FBXW7*_Exon (16467505)_14 200265	153249385	153249658	-	TTACTCCAAATTTTAATGAGCTATTAAATTTTATTTAAATCACT TTTCCTTTCTACCCAAAAGTAATCATCTTAAGTGTTTTTCCAG TGTCTGAGAACATTAGTGGGACATACAGGTGGAGTATGGTC ATCACAAATGAGAGACAACATCATCATTAGTGGATCTACAGA TCGGACACTCAAAGTGTGGAATGCAGAGACTGGAGAATGTA TACACA
*FBXW7*_Exon (16083186)_14 200261	153250769	153251019	+	TGAAGTGTAGGAAGAGTAAACTTACTTTGCCTGTGACTGCTG ACCAAACTTTTAAAGTGTTGTCATCAGAACCACTAACTATTCG GTTACCACAAAACTGTAAGCATGTGATCACATGATCATCATG TCCTTTCAGCACCTATAAGAAAGATGTGCAGATTAGAAATAT GTTAATTAAATTATGTTCTTTAAAA
*FBXW7*_Exon (14461661)_14 200246	153251761	153252004	+	GAGTGTCATATTATACAGTTTGCCAAGTGAAATAGTACACTA GGTACTAACACTGATTAACGGTTTCTGTTACATTGTGCAGAG TTCAGTTACCTTAGGAGATTTGAGTTCTCCTCGCCTCCAGTT AGTATCAATTCTGTGCTGTCTGATGTATGCACTTTTCCATGGA CTGTGTATGAAACCT
*FBXW7*_Exon (14461661)_14 200247	153251947	153252200	-	GATAACAGTATTGGAAATTTGACAATGTCTTGCATTTCAGTG GTTTTGAGCAGAGAGATGGAATACTCTTTATAAAGATGGAAT ACTTTATAAAATGTATAACTGTTATTATTGGTGAAGGCAATTT ACTCTTGAACTGTAACACTTTAGGGATTGATGAACCATTGCA CATCAAGAGAAGAAAAGTAATAAAACCA
*FBXW7*_Exon (15393662)_14 200260	153253695	153253965	+	TCTCTATGCAATTTTGAACCTTACCCTCTTCTTTGCATTTCTC TCTCCAGAGAAGGTTGTCTTCAGCCAAAATTCTCCAGTAGCG ACATGTCTGAGCTGCTTGTAGCAGGTCTTTGGGTTCCAGGAA TGAAAGCACATAGAGTGCCAACTAAGAAAAAAATGCATAGTA TAATACCCATATTTAAATAAATATATATATTATATAATAAGTTA AT
*FBXW7*_Exon (15035486)_14 200255	153258897	153259145	+	ATGAAGAATGTAATTGATAATCTTTACCTCTTTAGGGAGCAAT GAAATGAAGTCTCGTTGAAACTGGGGTTCTATCACTTGCATC ATATGTTTTACTTGTGTTGGTTCACAACTATCAATGAGTTCAT CTAAAGCAAGCAATTTCTCTGGTCCACTCCAGCTCTATCAAA GAGAATTAGAAATTTTTATTGT
*FBXW7*_Exon (18432848)_14 200271	153268035	153268297	+	TACTATGTTTAGATATGTCACCTGAAACATTTTTAGCCATTCC TGGAGGCCTGTAGGTGGCTGGACAGATGTAATTCGGCGTCG TTGTTGCCCTTGGCCATTGGCTGCTCTGAGGTCCCCAAAAGT TGTTGGTGTTGCTGAACATGGTACAAGCCCAGTGGTACTACA AAAAAAAAAAAAAGAGAGAGAGAAAGGATAAAAGGAAAAA
*FBXW7*_Exon (16915721)_14 200266	153271125	153271349	+	AAACTGAGAATCATGAGATAATCATTATATTTAATATTACCTT GTATATTCTGAGACTTTGCATGGTTTCTTTCCCAAAGAAAAAG AGCGGACCTCAGAACCATGGTCCAACTTTCTTTTCATCTATA AGGTAAAACAAACAAGATATGTTTTTTAAAAATCGTCTAAC
*FBXW7*_Exon (15288981)_14 200256	153273475	153273721	+	TCCAGCCACCCACCAAAATTAGAGGATACTGCAGCCATCTCT GATGATACAGATTTTCCTTCTCAGGCAGGCATACACACACAA TCACATAGCATAGGAAGAAAACAGCTTACTTACTTTGTAAAAA ATCATTTTTAATGTGCCGTAGAAACCCATATTTTCTGTATTTTT CCCCTTCAGTGATTCTGTG
*FBXW7*_Exon (15288981)_14 200257	153273663	153273887	-	TGATACTGAGCTGCATTTGCCTTTACTGTGGAGTTTTGTTGC CGGTTCTGCTCCCTAATCTTCCTTTTCTGACGTGCCTGAGCA TGTCCACATTAGAATCTGTGACATACCTACCTGAAAAAGGTT TATATTGTCAGAGACTGCCAAGCAGCCGGACACACGGGGGC A
*FBXW7*_Exon (15288981)_14 200258	153273833	153274076	+	AAACCGCTTCTCGGGACACACATACATACATGCAGCTTGACT GAGAAGAACTCGAGGGAATAATGAGAGAGAACGGAGAAGAT TATTGGAGGAGACTATGCCCTGTCAAAGCCTTGACTGAACAG ATTCCTCCCTCAGCAGCAGAGGGATCAGATTACATCTTCCCT TGAACACAGAATGGTGCAGTCCAG
*FBXW7*_Exon (15288981)_14 200259	153274025	153274273	-	TATTTAAAACTCTTCAAAAATGCAGGTTTTACAAAATACAAAA ATAACCTCTTGAAAGTTTGAAAGGGGAGAGGGGGCTGTCGT GTGGGGGCGGTCTCTGCTGCCCACATCCTCCCTCTGTTCAG TGCGTTGTGTTCTTACGGGTTCCCTGGAGCGGATCACCATAT AATTGATGTGCAGTCTGCATTGCTGAATCC

Fortsetzung

Fortsetzung Tabelle 6

Zielregion	Startposition	Endposition	Strang	ULSO Sequenz
*FBXW7*_Exon (14813537)_14 200252	153303192	153303423	+	AATGCATTGATAGTTTTAATTTTAAATAAAAACTGAAATTTGAG GCATCTTTTCACTAAAAGAGGCCAAGGTACTTCACTTAAATAA ACATTCATATTTTTCAAATGTGTGAGACTTACCCGTCTTCGAC AAAAAGGGAGGCCTTGGGCAATGATGCTAATGCTAAATATCT TCAT
*FBXW7*_Exon (14813537)_14 200253	153303368	153303641	-	GGCCTTGGGTTCTCAGCCTTTTAAAAACTATTATTAAATATAT ATTTTTAAAATTTAGTGGTTAGAGCTTTTAGTAATGTGCCTGT ATTACATGTAGAGAGTATTCGTCAACCAAGAGGAGTTTTAAA ATGTCAAAACCGGGAAAACCTACTCTAAACCATGGCTTGGTT CCTGTTGATCTTAAAAGTGCAAAAGAGCCTCTACCACATCAA ACTGTGAT
*FBXW7*_Exon (14813537)_14 200254	153303588	153303837	+	CTGCTGCTTTTGTCTTTCAACCTTCCCCTACCAAATGTCCTGA CCTGTCTGAGGCTTGGTGAAGTGCAAACTATCCTAGAATAGC CAGGAATTATAAACTACTGAAGTGAAAGCTCCTGCTCCTGCC AGTCAAACAGCTGGTGAACCTCTCATACAAAGTCAGTAATGT GAACACAACCAAAGCAGGGCTGTG
*FBXW7*_Exon (14795731)_14 200248	153332360	153332589	+	GTTTCATTACAATTAAAATAGATATGTAAAGTTTCTCAGGTTA ACAATATATTGAATATACTCACTTTTGTTGTTTTTGTATAGAAT GGGGAGGAGAGTTGGTGAACGGGCAGGTCCACAATACTACT GGAGTTCGTGACACTGTTAGTATGTGTATGTTCATCTTCTCT
*FBXW7*_Exon (14795731)_14 200249	153332530	153332758	-	AAGGACAGTTGGAAGAAAACAATAATAGATTTATTTCGGTAG ATGAGGACTCCTCAGGAAACCAAGAAGAACAAGAGGAAGAT GAAGAACATGCTGGTGAACAAGATGAGGAGGATGAGGAGGA GGAGGAGATGGACCAGGAGAGTGACGATTTTGATCAGTCTG ATGATAGTAGCA
*FBXW7*_Exon (14795731)_14 200250	153332704	153332928	+	TTGCTGGGAATCATTTTGGCCTCCAGGTCTAGGTTCTACTCC AACAACTTCACCATTCCTTGCAGTGTGCTCCTCCTCTTGTTG TCTGAGTTGCTGTTGCTGTTCCTCCTCTACCACACGATTCAT CTGTTCTTCATCTACCTGGCTTGAGGAAGGGTTACCTCTCAG AGAG
*FBXW7*_Exon (14795731)_14 200251	153332880	153333150	-	TTGCAATCATTAATGATATTTAGAAAGTAGACATATAACATGA AAGTAGAACATAATATAGATTGTACAAATCTTGTTTTTTACCC TATTTTCCCCTGCAGAATGTGAAAACCTTTGCATCTTCTGATA GTCTAGCCAAGGTCCAAGAAGTAGCAAGCTGGCTTTTGGAA ATGAATCAGGAACTGCTCTCTGTGGGCAGCAAAAGACGACG AACTGGAGGC
*FBXW7*_Exon (17108767)_14 200267	153456046	153456310	+	CCCTCTCCCGGGGCCACTCACACTTTTAGAAAAGAGCCGCG GCGCCGAGAAAGTGGGTTGGTTCCCTTCCTCCTTCGGACTG AAGCGGCAGCTGCGGAAGGCTCCGGCGCGGTACTGAGGAA GAAGCGGTGCTCGTGTCGCTAAACCAGGCGGCAACCCGGG TCTCTTCCGCGCTGCCAGGGGAGGGGAGGCGGCGGCCCCG CTTACCTCCT

Tabelle 7: i5 Index-Primer des TruSeq-Custom-Amplicon-Prep

PCR- Polymerase-Kettenreaktion, C- Cytosin, G- Guanin, T- Thymin, A- Adenosin

i5 Index-PCR-Primer	Index Sequenz
A501	TGAACCTT
A502	TGCTAAGT
A503	TGTTCTCT
A504	TAAGACAC
A505	CTAATCGA
A506	CTAGAACA
A507	TAAGTTCC
A508	TAGACCTA

Tabelle 8: i7 Index-Primer des TruSeq-Custom-Amplicon-Prep

PCR- Polymerase-Kettenreaktion, C- Cytosin, G- Guanin, T- Thymin, A- Adenosin

i7 Index-PCR-Primer	Index Sequenz
A701	ATCACGAC
A702	ACAGTGGT
A703	CAGATCCA
A704	ACAAACGG
A705	ACCCAGCA
A706	AACCCCTC
A707	CCCAACCT
A708	CACCACAC
A709	GAAACCCA
A710	TGTGACCA
A711	AGGGTCAA
A712	AGGAGTGG

Tabelle 9: Primer zur Direktsequenzierung nach Sanger von *NOTCH1*

GC %- Gehalt an Guanin und Cytosin; C- Cytosin, G- Guanin, T- Thymin, A- Adenosin

NOTCH1-Primer	Nukleotidsequenz (5'-3')	Schmelztemperatur (°C)	GC %
Exon 33 vorwärts	TCTCCAACCTACCCCATCTG	59,92	55
Exon 33 rückwärts	TTTGGCCCTCACTTCTCTGT	59,84	50
Exon 34 139391568-139392072 vorwärts	GCTTCCTCTGGTGATGGAAC	59,66	55
Exon 34 139391568-139392073 rückwärts	AGGCCACGTCTGACAGGTAG	60,32	60
Exon 34 139391167-139391674 vorwärts	GCCTGTGGAAGCAAGGAG	59,5	61,11
Exon 34 139391167-139391674 rückwärts	GCCCACAGTGAAATTCAGG	59,07	52,63

Tabelle 10: Primer zur Direktsequenzierung nach Sanger von *FBXW7*

GC %- Gehalt an Guanin und Cytosin, C- Cytosin, G- Guanin, T- Thymin, A- Adenosin

***FBXW7*-Primer**	**Nukleotidsequenz (5'-3')**	**Schmelztemperatur (°C)**	**GC %**
Exon 2 vorwärts	CCAAGAAGTAGCAAGCTGGC	59,19	55
Exon 2 rückwärts	CAAAGACTGTGAGGAAAGTTTCA	57,18	39,13
Exon 5 vorwärts	AACCATGCTGACTCAAGATTTG	57,22	40,91
Exon 5 rückwärts	AACAGTCAACCGTACTAGTAACA	57,23	39,13
Exon 6 vorwärts	TGTGTACCTGTGATCTCTGGG	58,82	52,38
Exon 6 rückwärts	TGCAGCAATTAAGTGAGGCA	58,09	45
Exon 7 vorwärts	TGGTTGTGTGTAGATGTGAGTT	57,58	40,91
Exon 7 rückwärts	AAAGGTGGTAGCTGTTGAGTT	57,42	42,86
Exon 8 vorwärts	GGACTGAAGTTACTGCCTTTCA	58,26	45,45
Exon 8 rückwärts	GGGGTTAGCTGTTAAGATTCGG	58,8	50
Exon 9 vorwärts	TGGTGAAGGCAATTTACTCTTGA	58,28	39,13
Exon 9 rückwärts	ACGGTTTCTGTTACATTGTGCA	59,05	40,91
Exon 10 vorwärts	ACTGTTCCTGTTTATGCCTTCA	57,9	40,91
Exon 10 rückwärts	GCATCACTATCCTCATGCCA	57,44	50
Exon 11 vorwärts	TGCTTTCATGTCGTGTTTCCT	58,43	42,86
Exon 11 rückwärts	CCAACCATGACAAGATTTTCCCT	59,17	43,48
Exon 12 vorwärts	TTCTGTTTCTCCCTCTGCAG	57,15	50
Exon 12 rückwärts	TCAGGAGAGCATTTAAGGGAGA	58,28	45,45
Exon 13 vorwärts	TGTTTCCCATCCTCTTCCCC	59	55
Exon 13 rückwärts	AATGAACAAAACGAAAGGTGAGT	57,42	34,78
Exon 14 vorwärts	ACTGAGGACATGGGTTTCTAAA	57,01	40,91
Exon 14 rückwärts	GGGCAGGGAGTATATCGTCT	58,07	55

2.1.4 Patienten

Untersucht wurden Patientenproben aus der Studie COMPLEMENT1 (n=447) (NCT00748189) (GlaxoSmithKline, London, UK). Die multizentrische Phase III-Studie beinhaltet zwei randomisierte Kohorten, welche mit Chlorambucil-Monotherapie oder mit Chlorambucil und Ofatumumab behandelt werden. Die teilnehmenden Patienten sind an einer bisher noch unbehandelten CLL erkrankt und nicht geeignet für eine Therapie, welche auf Fludarabnabinen basiert. Primäres Ziel der Studie ist es, das progressionsfreie Überleben (PFS), die allgemeine Ansprechrate und das Gesamtüberleben (OS) der beiden Studienarme zu vergleichen. Dadurch soll die Sicherheit und Wirksamkeit von Ofatumumab als Ergänzung zu Clb bei Patienten mit unbehandelter CLL evaluiert werden. Als weitere Fragestellung wird der Zusammenhang zwischen genomischen Varianten, insbesondere Gen-Mutationen, wie *NOTCH1*-Mutationen und der Resistenz gegen CD20-Antikörper untersucht. Die Nachbeobachtungszeit beträgt 51 Monate. Von

den 447 Patienten der gesamten Studienkohorte wurde nur Patienten mit einem unterschriebenen „informed consent“ sowie verfügbarer DNA ausgewählt. Somit stand DNA aus peripheren Blutproben vom Zeitpunkt des Studieneinschlusses von 384 Patienten zu Verfügung. Von den 384 Proben befand sich in einer Probe keine Patienten-DNA, so dass für die statistische Auswertung 383 Proben zur Verfügung standen.
Als Referenzgenom wurde in der gesamten Arbeit das Human Reference Sequence GRCh37 (hg19) des Genome Reference Consortium benutzt.
Die Nummer des Votums der Ulmer-Ethikkommission für die Complement1 Studie lautet 286/08.

2.2 Methodik

2.2.1 Next-Generation-Sequencing (NGS)

Um herauszufinden, welche Patienten eine *NOTCH1*- oder eine *FBXW7*-Mutation besitzen, wird das NGS verwendet. Hierzu wird Truseq-Custom-Amplicon-Library-Preparation-Guide und zur Sequenzierung der MiSeq-Desktop-Sequencer benutzt. Beide sind ein Produkt der Ilumina Inc., San Diego, USA. Die hierbei angewandte Sequenzierung durch Synthese ermöglicht eine vielfach höhere parallele Sequenzierung im Vergleich zur Sequenzierung nach Sanger. Die Amplicon basierte Sequenzierung erfolgt anhand einer vorgegebenen Reihenfolge: Zuerst werden 48 Proben gepoolt, wobei jeder DNA Abschnitt einen Index für den Abschnitt besitzt in dem er liegt und einen Index für den Patienten zu dem der Abschnitt gehört. Nach dem Indexing erfolgt die Auslesung und Sequenzierung. Danach müssen die Proben wieder getrennt werden- das Demultiplexing. Das bedeutet, dass die Indices der einzelnen Stränge erkannt und den Patienten zugeteilt werden. Somit erhält man wieder 48 unterschiedliche Proben und zu jeder Probe die durch die Sequenzierung erstellten DNA-Abschnitte von 250 Basenpaar (bp) Länge. Anschließend wird das Alignement durchgeführt. Hier erfolgt ein Vergleich der Abschnitte zu einem Referenzgenom und eine Erstellung einer Karte des Genoms mit den einzelnen sequenzierten Abschnitten in richtiger Reihenfolge. Danach kommt das Variant Calling, d.h. ein detaillierter Vergleich der Abschnitte mit der Referenz-DNA und der Erkennung von Varianten. Als letzter Schritt erfolgt die Annotation. Also die Deutung der Varianten: Welchen Einfluss haben diese auf die cDNA, das Protein und letztlich den Patienten? Diese einzelnen Schritte und die

Vorbereitungen, welche vor der Sequenzierung gemacht werden müssen, werden im Folgenden detailliert beschrieben.

Zur Durchführung der Mutationsanalysen standen 384 fertig isolierte Patienten-DNA-Proben (12,5 ng/ µl) von der Firma GSK zur Verfügung.

Für die folgenden Schritte ist wichtig, dass tiefgefrorene Chemikalien vor Benutzung aufgetaut werden müssen. Zusätzlich sollte, wenn möglich, eine Mehrkanalpipette verwendet werden. Dadurch kann eine gleiche Volumenverteilung in allen Proben gewährleistet werden.

2.2.1.1 Hybridisierung der Oligonukleotid-Pools

Bei der Hybridisierung der Oligonukleotid-Pools wird eine Mischung der entworfenen Oligonukleotide, welche spezifisch für die Zielregionen sind, an Patienten-DNA gebunden.

Eine 96-Well-Platte wird als Hybridisierungsplatte (HYP) verwendet und in eine der Vertiefungen werden 5 µl Amplicon-Kontroll-DNA1 und 5 µl Kontroll-Oligonukleotidmischung pipettiert. In die anderen Vertiefungen werden jeweils 5 µl Patienten DNA und 5 µl des Custom-Amplicon-Tube (CAT) gegeben.

Nun werden 40 µl des gelösten Oligo-Hybridization-For-Sequencing-Reagent1 in jede benutzte Vertiefung gegeben und durch Pipettieren mit der DNA und den Oligonukleotiden gemischt. Die Platte wird mit selbstklebender Aluminiumfolie abgedeckt und mit 1000 relativer Zentrifugalkraft (xg) bei 20 °C für 1 Minute (min) zentrifugiert. Anschließend wird die Platte in einem vorgeheizten Heizblock bei 95 °C für 1 min inkubiert. Daraufhin wird die Temperatur des Heizblocks für ungefähr 80 min passiv auf 40 °C heruntergekühlt.

2.2.1.2 Entfernung ungebundener Oligonukleotide

Durch einen Größenfilter werden ungebundene Oligonukleotide entfernt.

Die Filterplatte mit Deckel wird über einen Adapter auf eine 96-Well-Speicher-Platte („MIDI“-Platte) gestellt. Dies wird als Filter-Plate-Unit (FPU) bezeichnet.

Zuerst muss die FPU vorgewaschen werden, indem 45 µl in jede zu benutzende Vertiefung pipettiert werden und danach die FPU mit 2400 xg bei 20 °C für 10 min zentrifugiert wird. Die fertig inkubierte HYP wird noch einmal mit 1000 xg bei 20 °C für 1 min zentrifugiert, um das Kondensat einzusammeln. Mit einer Mehrkanalpipette wird der komplette Inhalt der Vertiefungen der HYP-Platte in das

Zentrum der korrespondierenden Vertiefungen der FPU-Platte übertragen. Nun wird die FPU-Platte mit 2400 xg bei 20 °C für 2 min zentrifugiert. Um die ungebunden Oligonukleotide zu entfernen, werden die Filtersäulen nun zweimal gewaschen. Dazu werden 45 µl Stringent-Wash1 (SW1) auf jeden Filter pipettiert und die Platte mit 2400 xg bei 20 °C für 2-10 min solange zentrifugiert, bis die Flüssigkeit komplett abgelaufen ist. Dies wird einmal wiederholt und am Ende kann der Durchfluss entsorgt werden. Um verbleibendes SW1 zu entfernen und um die Proben für den Extensions-Ligations-Schritt vorzubereiten, wird in jede Säule 45 µl pipettiert und die Platte mit 2400 xg bei 20 °C für 2-10 min zentrifugiert.

2.2.1.3 Extension und Ligation der gebundenen Oligonukleotide

In diesem Schritt verbindet eine DNA-Polymerase die hybridisierten Oligonukleotide, welche einer Zielregion vor- und nachgeschalten sind, beginnend mit dem stromaufwärts gelegenen Oligonukleotid. Zuletzt wird der hergestellte DNA-Strang durch eine DNA-Ligase mit dem 5'Ende des stromabwärts gelegenen Oligonukleotid verbunden. Es resultiert in einem Produkt, welches die Zielregion und für die Amplifikation benötigte Sequenzen enthält.

Mit einer Mehrkanalpipette werden 45 µl von dem Extension-Ligation-Mix3 zu jeder Probe auf der FPU-Platte gegeben, auf deren Filter die Reaktion stattfindet. Dazu wird die Platte mit Aluminiumfolie abgedeckt und bei 37 °C für 45 min inkubiert.

2.2.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) Amplifikation

Die Produkte werden mithilfe von Primern amplifiziert, welche Index-Sequenzen für die Multiplex-Reaktion (i5 und i7), als auch einen gemeinen Adapter anhängen, welcher für die Erzeugung von Clustern benötigt wird (P5 und P7).

Die erforderlichen Index-Primer werden mithilfe des Experiment-Managers und des Truseq-Custom-Amplicon-Calculator bestimmt. Nachdem die Primer aufgetaut sind, müssen diese gevortext und kurz zentrifugiert werden. Es wird nun eine neue 96-Well-Platte als Indexed-Amplification-Plate (IAP) verwendet. In jede der senkrechten 12 Reihen der Platte werden mit einer Mehrkanalpipette 4 µl der 8 i5-Primer pipettiert und in jede vertikale Reihe 4 µl der 12 i7-Primer.

Nachdem die Extensions-Ligations-Reaktion der FPU-Platte beendet ist, wird die Aluminiumfolie abgezogen, die FPU mit dem Deckel wieder zugedeckt und mit 2400 xg für 2 min zentrifugiert. Danach werden in jede Vertiefung der FPU-Platte 25 µl

von 50mM Natriumhydroxid (NaOH) pipettiert, dabei sollten die Pipettenspitzen in Kontakt mit der Membran kommen und das NaOH 5-6 mal hoch- und runterpipettiert werden. Die FPU-Platte wird daraufhin für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.
Bei der Durchführung mit 96 Proben werden 56 µl TruSeq-DNA-Polymerase1 (TDP1) zu 2,8 ml PCR-Master-Mix2 (PMM2) gegeben und zum Mischen 20 mal invertiert. Aus diesem PMM2/TDP1-PCR-Master-Mix werden danach jeweils 22 µl in jede Vertiefung der IAP-Platte pipettiert, welche Index-Primer enthält. Anschließend werden die eluierten Proben der FPU-Platte auf die korrespondierenden Vertiefungen der IAP-Platte übertragen. Dabei sollten DNA und Master-Mix gut gemischt werden. Nachdem alle Proben übertragen worden sind, wird die IAP-Platte mit dem Microseal A abgedeckt und mit 1000 xg bei 20 °C für 1 min zentifugiert. Zur Durchführung der PCR wird die IAP-Platte nun in den Thermal-Cycler gestellt. Die Anzahl an PCR-Zyklen ist abhängig von Amplicon-Größe, von der Anzahl der Amplicons in dem CAT und der Qualität der Proben-DNA.

Tabelle 11: PCR-Programm Next-Generation-Sequencing *NOTCH1*

min- Minute, PCR- Polymerase-Kettenreaktion

Prozess	**°C**	**min**	
Initiale Denaturierung	95	3	
Denaturierung	95	0,30	30 Zyklen
Primerhybridisierung	60	0,30	
Polymerisation	72	60	
Extension	72	5	
Abkühlung	10	∞	

Tabelle 12: PCR-Programm Next-Generation-Sequencing *FBXW7*

min- Minute, PCR-Polymerase Kettenreaktion

Prozess	°C	min	
Initiale Denaturierung	95	3	
Denaturierung	95	0,30	30 Zyklen
Primerhybridisierung	60	0,30	
Polymerisation	72	60	
Extension	72	5	
Abkühlung	10	∞	

Nachdem die PCR beendet ist, wird die IAP-Platte mit 1000 xg bei 20 °C für 1 min zentrifugiert, um Kondensat einzusammeln.
Um zu überprüfen, ob die Amplifikation erfolgreich war, werden 5 µl der Kontrolle und ausgewählter Proben auf einem 4 %-Agarose-Gel in einer Elektrophoresekammer aufgetrennt. Am Ende wird überprüft, ob die erwartete Produktgröße erreicht wurde. Der genaue Vorgang der Agarose-Gelelektrophorese wird in Abschnitt 2.2.2 beschrieben.

2.2.1.5 PCR-Reinigung

Hierbei werden Verunreinigungen mithilfe von paramagnetischen Kügelchen aus dem PCR-Produkt entfernt. Durch spezifische Pufferbedingungen binden Nukleinsäuren der PCR-Amplicons gezielt an paramagnetische Mikropartikel. Diese Partikel bleiben an den Wänden des Behälters haften, wodurch Verunreinigungen wie Primer, Salze und Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP's) einfach abgespült werden können.
Die AMPure-XP-Beads müssen vor Benutzung so lange gevortext werden, bis sie gut suspendiert sind und die Farbe der Suspension homogen aussieht.
Eine neue Midi-Platte wird als Clean-UP-Plate (CLP) verwendet und in die Vertiefungen wird, je nach Amplicongröße, analog zum Protokoll, die erforderliche Menge an AMPure-XP-Beads pipettiert.
Daraufhin wird das komplette PCR-Produkt in die korrespondierenden Vertiefungen der CLP transferiert und die CLP mit Microseal B bedeckt. Um das PCR-Produkt mit den AMPure-XP-Beads gründlich zu mischen, werden die CLP auf einem

Microplate-Shaker bei 1800 xg für 2 min geschüttelt und danach bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert. Nach der Inkubation wird die CLP-Platte auf eine magnetische Ablage gestellt und 2 min gewartet. Der restliche Überstand wird mit einer Pipette vorsichtig entfernt. Die CLP-Platte verbleibt auf der magnetischen Ablage, während jede Vertiefung mit 200 µl frisch hergestelltem 80 %-igem Ethanol gewaschen und damit 30 Sekunden (sek) inkubiert wird. Der restliche Überstand wird wieder vorsichtig entfernt. Dieser Waschvorgang wird ein zweites Mal durchgeführt.
Nach dem Waschen wird die CLP von der magnetischen Ablage entfernt und 10 min luftgetrocknet. Auf die getrockneten Kügelchen wird nun 30 µl Elution-Buffer mit Tris gegeben. Danach wird die mit Microseal B abgedeckte CLP mit 1800 xg für 2 min geschüttelt, wobei darauf geachtet werden sollte, dass die Kügelchen komplett resuspendiert sind. Wiederum wird die Platte bei Raumtemperatur für 2 min inkubiert und daraufhin für 2 min auf die magnetische Ablage gestellt. Der Überstand enthält nun das gereinigte PCR-Produkt und es werden 20 µl davon in die korrespondieren Vertiefungen einer neuen MIDI-Platte, der Library-Normalization-Plate (LNP), pipettiert. Diese LNP-Platte wird daraufhin mit Microseal B verschlossen und mit 1000 xg für 1 min zentrifugiert, wodurch der komplette Überstand am Boden der Vertiefung sein sollte.

2.2.1.6 Normalisierung der Bibliothek

Durch diesen Schritt wird die Quantität jeder Bibliothek normalisiert, damit in den gemischten Proben eine gleiche Verteilung gewährleistet ist. Auch hierbei werden paramagnetische Kügelchen verwendet. Die Kenntnis ihrer Bindungskapazität ermöglicht es, eine bestimmte Menge an DNA aus einer Probe zu isolieren. Somit kann man Proben mit unterschiedlichen DNA-Konzentrationen auf eine ausgewählte Konzentration vereinheitlichen.
Die Library-Normalization-Additives1 (LNA1) und die Library-Normalization-Beads 1 (LNB1) müssen vor Benutzung gründlich gevortext werde. Vor allem bei LNB1 sollte auch durch Auf- und Abpipettieren sichergestellt werden, dass die Kügelchen komplett resuspendiert sind. Bei Verwendung von 96 Proben werden in ein 15 ml Röhrchen 4,4 ml LNA1 und 800 µl LNB1 gegeben. Anschließend wird das Röhrchen durch 15-20maliges Invertieren gemischt. Unmittelbar danach werden 45 µl des LNA1/LNB1-Gemischs in jede Vertiefung der LNP-Platte gegeben, welche

gereinigtes PCR-Produkt enthält. Die mit Microseal B verschlossene LNP wird nun mit 1800 xg in für 30 min geschüttelt. Nach dem Schütteln wird die LNP für 2 min auf eine magnetische Ablage gestellt und danach der Überstand vorsichtig entfernt. Jetzt wird die LNP von der magnetischen Ablage entfernt und jede Vertiefung mit 45 µl gewaschen. Wiederum wird die Platte mit Microseal B verschlossen und diesmal bei 1800 xg in für 5 min geschüttelt, für 2 min auf eine magnetische Ablage gestellt und der Überschuss entfernt. Auch diese Waschung wird ein zweites Mal durchgeführt.
Um die Proben herauszulösen, werden anschließend 30 µl 0,1N NaOH in jede verwendete Senke der LNP pipettiert. In Folge wird die mit Microseal B gesicherte LNP mit 1800 xg in 5 min lang geschüttelt, wonach die Proben komplett resuspendiert sein sollten.
Währenddessen können bereits 30 µl des Library-Normalization-Storage-Buffer1 in die benötigten Senken einer neuen 96-Well-Platte pipettiert werden.
Nach der Eluierung wird die LNP für 2 min auf eine magnetische Ablage gestellt und danach werden 30 µl des Überstandes in die korrespondierenden Senken der Storage-Plate (SGP) transferiert. Daraufhin wird die SGP mit Microseal B verschlossen und mit 1000 xg für 1 min zentrifugiert. Die hierdurch hergestellte Bibliothekensammlung besteht aus einsträngiger DNA.

2.2.1.7 Bibliotheken-Pooling und Beladen des MiSeq

Zur Vorbereitung auf die Generierung der Cluster und auf die Sequenzierung werden gleiche Volumina der normalisierten Bibliotheken gemischt. Bevor diese Mischung mit dem MiSeq sequenziert werden kann, wird sie mit Hybridisierungspuffer verdünnt und hitzedenaturiert.
Um Kondensat aufzusammeln, wird die SGP vor ihrer Weiterverwendung mit
1000 xg für 1 min zentrifugiert. Die Bestimmung der möglichen Probenanzahl pro MiSeq-Lauf basiert auf der Anzahl der Zielregionen und der erwünschten Abdeckung und erfolgt analog zum Protokoll.
Die zu sequenzierenden Proben derselben senkrechten Reihe der SGP werden zusammengefasst, indem 5 µl aus jeder dieser Proben in ein Röhrchen eines 8-Tube-Streifens pipettiert werden. Nach Benutzung kann die SGP mit Microseal B verschlossen und bei -15 °C bis -25 °C gelagert werden.

Die Inhalte der 8 Röhrchen werden nun in einem Eppendorf-Röhrchen, dem Pooled-Amplicon-Library (PAL)-Röhrchen, zusammengefasst und gemischt. Um eine 100-fache Verdünnung herzustellen, werden 594 µl Hybridization-Buffer1 in ein anderes Eppendorf Röhrchen, das Diluted-Amplicon-Library (DAL)-Röhrchen, pipettiert und 6 µl der PAL hinzugefügt. Das DAL-Röhrchen wird nun gründlich gevortext. Die DAL sollte immer unmittelbar weiterverwendet und nicht gelagert werden.
In Folge wird die DAL auf einem Heizblock bei 96 °C für 2 min inkubiert.
Bevor das Röhrchen in einem Eiswasserbad für 5 min heruntergekühlt wird, sollte es einige Male invertiert werden. Das Wasserbad sollte zu 3/4 aus Eis und zu 1/4 aus Wasser bestehen. Sofort danach wird das DAL in einen aufgetauten MiSeq Reagenzbehälter in dem Load-Samples-Reservoir geladen.

2.2.1.8 MiSeq-Sequenzierung

Benutzt wird die Methode der Sequenzierung nach Synthese oder auch Brückenamplifikation genannt. Zunächst wird ein unbeweglicher Komplementärstrang einer Probensequenz an eine Fließzelle synthetisiert, der eine Brücke zu weiteren an der Fließzelle befestigten Adaptersequenzen ausbilden kann. Diese Probensequenz wird nun in Clustern klonal amplifiziert, um die Signale für die Datenauswertung zu verstärken. Anschließend erfolgt die Sequenzierungsreaktion nach dem Cycle-Reversible-Termination (CRT) - Verfahren.
Am Anfang erfolgt die Hybridisierung eines Primers an die Primerbindungsstelle, welche in einem der beiden Adapter enthalten ist.
Daraufhin wird pro Zyklus eines von vier fluoreszenzmarkierten, reversiblen Terminator-Nukleotiden je Molekül in 3’ Richtung eingebaut und das Fluoreszenzsignal aufgenommen. Dabei besitzt jede Nukleotidbase eine eigene, eindeutige Farbe. Danach wird das Terminator-Nukleotid gespalten, um den Einbau der nächsten Base zu ermöglichen. Am Ende wird die Abfolge der Farben schließlich für jede Cluster spezifische Koordinate direkt in die genomische Sequenzen übersetzt.

2.2.1.9 Auswertung der MiSeq-Sequenzierung

Auswertung der Resultate erfolgt mit dem von Ilumina Inc., San Diego, USA, bereitgestellten MiSeq-Reporter v.2.2.29. Dieser Vorgang wird leicht adjustiert, indem für einige Auswertungsschritte eine andere Software unterstützend angewandt wird. Zum Vergleich der Ergebnisse mit dem Referenzgenom und für die Erkennung der Insertionen und Deletionen wird die Software Burrows-Wheeler-Aligner verwendet (Li u. Durbin 2009). Zur Erkennung der unterschiedlichen Varianten wird die Software-Genome-Analysis-Toolkit (Broad Institute Incorporated, Cambridge, USA) gebraucht. Um Mutationen zu detektieren, welche von der benutzten bioinformatic Pipeline nicht erkannt wurden, erfolgte zusätzlich ein manueller Abgleich mittels dem Integrative Genomics Viewer (Robinson et al. 2011). Um den Einfluss der gefundenen Varianten auf die kodierende Sequenz und das daraus resultierende Proteinprodukt zu bestimmen, wird der Ensembl-Variant-Effect-Predictor verwendet (McLaren et al. 2010). Hierbei wird unter anderem der PolyPhen-Score benutzt, um die wichtigen Mutationen herauszufiltern (Flanagan et al. 2010). Danach werden die so gefilterten Mutationen mit dem Catalogue of Somatic-Mutations in Cancer (COSMIC) verglichen (Forbes et al. 2015). So findet man heraus, ob die Mutationen bereits bekannt sind oder hier zum ersten Mal beschrieben werden. Um herauszufinden, ob die nicht vorbeschriebenen genetischen Varianten wirklich neu aufgetretene Mutationen oder doch eher Polymorphismen sind, werden diese mit der Single-Nucleotide-Polymorphism-Database (SNPdb138) und den Daten des 1000Genomes-Project-Consortium (Sherry et al. 2000; 1000Genomes-Project-Consortium, 2010) verglichen.

2.2.2 Direktsequenzierung nach Sanger

Zur Verifizierung der Mutationen, welche im NGS herausgefunden wurden, wird die Methode der Direktsequenzierung nach Sanger (Sanger et al. 1977) durchgeführt. Um diesen Schritt durchführen zu können, müssen Primer hergestellt werden. Diese werden für die Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion und der Cycle-Sequencing-Reaction benötigt.

2.2.2.1 Sequenzierung von *NOTCH1*

Es werden Primer für Exon 34 und 33 hergestellt (siehe Tabelle 6). Für die sich auf dem Exon 34 befindliche Hotspot-Mutation c.7541_7542delCT werden alle vorhanden Patienten-Proben mit diesen Primer sequenziert.
Mit den restlichen Primern werden nur die Samples sequenziert, auf denen das NGS eine Mutation in dem den Primern zugehörigen Amplicons gefunden hat.
Die Direktsequenzierung nach Sanger von *NOTCH1* folgt vollständig dem Protokoll, welches im Nachfolgenden beschrieben wird.

2.2.2.2 Sequenzierung von *FBXW7*

Hergestellt werden Primer für sämtliche codierenden Exone des Gens. Verwendet werden die von Iluminaa vorgegebenen Exone. Hierbei werden nur die Primer verwendet, in deren Amplicon eine Mutation im NGS in den Proben gefunden wird. Es werden also nur die Samples und Primer benutzt, welche zur Bestätigung der im NGS gefundenen Mutationen nötig sind.
Die Direktsequenzierung nach Sanger von *FBXW7* folgt vollständig dem Protokoll, welches im Nachfolgenden beschrieben wird.

2.2.2.3 Herstellung der Primer

Die Oligonukleotidprimer sollten spezifisch für die zu amplifizierende DNA-Sequenz sein, in der eine oder mehrere Mutationen aufgetaucht sind.
Die Primer ermöglichen das Ablesen dieser Sequenz durch die Polymerasen.
Die Sequenz eines Amplicons wird mithilfe der Software Ensembl (Cunningham et al. 2015) ermittelt, um mit ihr die Primersequenz mit der Software Primer3 (Untergasser et al. 2012) zu erstellen. Der richtige Primer wird anhand seiner Spezifität für das Amplicon, seines Schmelzpunkts und seines Gehalts an den Basen G und C ermittelt.

Mit der Primersequenz kann anschließend der endgültige Primer bestellt werden, wobei jeweils ein Vorwärts-und Rückwärtsprimer für ein Amplicon erworben werden sollte. Alle in dieser Arbeit zur Direktsequenzierung nach Sanger verwendeten Primer wurden von der Firma (Fa.) MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) hergestellt. Die gekauften Primer werden als Lypophilisat geliefert. Zuerst wird eine Primerstocklösung erstellt. Dazu werden die lypophylisierten Primer gemäß der Lösungsvolumenangabe für 100 pmol/ µl der Fa. MWG mit frischem Aqua Braun versetzt und 1 Stunde auf einem Rüttler bei 37 °C gelöst. Danach muss eine Primerarbeitslösung erstellt werden. Hierzu wird eine 1:10 Verdünnung aus der Primerstocklösung mit Aqua-Braun hergestellt. Um die Primer am Patientenmaterial benutzen zu können, sollten sie vorher getestet werden. Es ist vor allem wichtig, die optimalen Reaktionstemperaturen für die PCR herauszufinden.

2.2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion wird zur DNA-Amplifikation genutzt (Sanger et al. 1977). Die wesentlichen Schritte für den Amplifikationsvorgang sind:

1. Denaturation der DNA-Doppelstränge in zwei Einzelstränge bei ca. 94 °C
2. Annealing der Primer an die spezifische komplementäre Sequenz bei ca. 55-65 °C → Polymerhybridisierung
3. ‘Elongation“: Replikation der DNA durch eine thermostabile DNA- Polymerase vom 3´-Ende der Primer ausgehend, bei ca. 72°.
   Es werden wieder neue komplementäre DNA Stränge synthetisiert.
4. Wiederholung der Schritte 1-3

Verwendet wurde eine spezielle Taq-Polymerase (HotStar), deren Aktivierung bei etwa 95 °C erfolgte.

Die DNA zweier Zelllinien, MEC2 und Granta, wurde für die Temperaturfindung der Primerhybridisierung verwendet. Bei MEC2 handelt es sich um eine Zelllinie, die aus peripheren Blutzellen einer 64-jährigen Patientin mit chronischem B-Zell-Lymphom etabliert worden ist (Stacchini et al. 1998). Granta wurde aus peripherem Blut einer mit einem Mantelzelllymphom in Stadium IV diagnostizierten Frau etabliert (Jadayel et al. 1997). Die Zelllinien stammen aus spontan proliferierenden Zellklonen. Sie werden auf eine Konzentration von 12,5 ng/ µl verdünnt. Der Master-Mix wird ohne DNA pipettiert.

Tabelle 13: PCR Master-Mix Sanger-Sequenzierung

H_20- Wasser, NTP- Nukleosidtriphosphate, PCR-Polymerase Kettenreaktion

Reagenz	Volumen/ µl
10x Puffer	2,5
NTPs (10mM)	0,5
Primer vorwärts	0,25
Primer rückwärts	0,25
Taq-Polymerase	0,25
H_20	20,25

Die Gene-Amp-dNTP-Gebrauchslösung (100mM) wird auf 1:10 mit Aqua-Braun verdünnt. Beim Erstellen des Ansatzes muss ein Totvolumen einkalkuliert und der fertige Master-Mix kurz gevortext werden. Danach werden 24 µl des Master-Mixes in die 96-Well-Platte pipettiert, wo bereits 2 µl DNA vorgelegt wurde. Zusätzlich wird eine Negativ-Probe zur Kontrolle mitgeführt, in welcher keine DNA vorhanden ist. Die fertige Platte kommt anschließend in den Thermocycler. Hierbei werden mehrere PCR-Programme verwendet, bei denen jeweils die Zeiten und die Temperaturen für die einzelnen Schritte der PCR geändert werden müssen, um das optimale Ergebnis zu bekommen. Das in der Arbeit ermittelte Programm, welches für alle benutzten Primer verwendet werden kann, lautet folgendermaßen:

Tabelle 14: PCR-Programm Sanger-Sequenzierung

min- minute, PCR-Polymerase Kettenreaktion

Prozess	°C	min	
Initiale Denaturierung	95	15	
Denaturierung	95	0,45	35 Zyklen
Primerhybridisierung	60	0,45	
Polymerisation	72	2	
Extension	72	5	
Abkühlung	4	∞	

2.2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Evaluation der DNA-Amplifikation wird das Produkt im Agarose-Gel nach elektrophoretischer Auftrennung sichtbar gemacht. Durch die Positionierung der Primer ist die genaue Größe der amplifizierten DNA-Sequenz bekannt und es kann im Vergleich zu einem DNA-Größenstandard überprüft werden, ob das erwartete Produkt entstanden ist.

Es wird ein 1,5 %iges Agarose-Gel hergestellt. Dazu werden 2,25 g Agarose und 150 ml 1xTAE-Puffer erhitzt und ein Tropfen Ethidiumbromid hinzugegeben. Dieses Gemisch wird lauwarm in einen Gelschlitten gefüllt. Anschließend wird gewartet, bis das Gel fest ist. In der Elektrophoresekammer, welche mit 1xTAE-Laufpuffer gefüllt ist, werden in die erste Geltasche einer jeden Reihe die Längenkontrollen mit 3 µl Aqua-Braun, 2 µl Ladepuffer und 1 µl 100 Basenpaar- (bp) Leiter pipettiert. In die restlichen Taschen werden jeweils 4 µl Aqua-Braun, 4 µl PCR-Produkt und 2 µl 5x BlueJuice-Ladepuffer gegeben. Danach wird über die Kammer 30 min lang bei 150mA Strom appliziert, wobei die DNA-Amplifikate aufgrund ihrer Größe unterschiedlich weit auf dem Gel laufen. Da Ethidiumbromidmoleküle zwischen den Basen der DNA interkalieren und dabei sich das Anregungsspektrum von Ethidiumbromid verändert, können die Banden der verschieden weit gewanderten DNA-Amplifikate mit UV-Licht sichtbar gemacht werden.

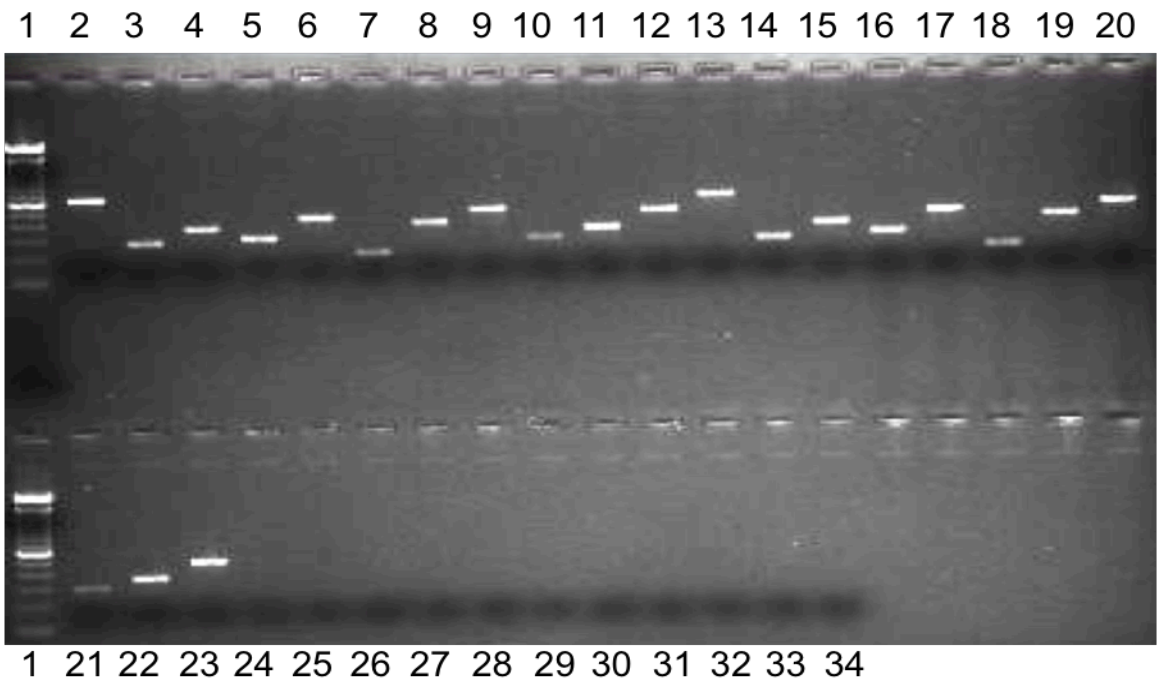


Abbildung 3: Agarose-Gel FBXW7

Auf dem Bild sieht man zwei Agarosegele (oben und unten), die jeweils oberste Reihe bilden die Vertiefungen, in welche man die Proben-Desoxyribonukleinsäure (DNA) pipettiert. 1-100 Basenpaar (bp)- Leiter, die erste hell leuchtenden Bande von oben kennzeichnet eine DNA mit 1000 bp und einer Masse von 95 ng, die zweite hell leuchtende Bande eine DNA mit 500/517 bp und einer Masse von 97 ng ; 2-12 MEC2: 2- Exon 2(ca. 500/517, ca. 97 ng), 3- Exon 5(ca. 300 bp, ca. 29 ng), 4- Exon 6 (300-400 bp, 29-38 ng), 5- Exon 7 (ca. 300 bp, ca. 29 ng) , 6- Exon 8 (ca. 400 bp, ca. 38 ng), 7- Exon 9 (ca.200 bp, ca 25 ng), 8- Exon 10 (ca. 400 bp, ca. 38 ng), 9- Exon 11 (400-500 bp, 38-97 ng), 10- Exon 12 (ca. 300 bp, ca. 29 ng), 11- Exon 13 (300-400 bp, 29-38 ng), 12- Exon 14 (400-500 bp, 38-97 ng); 13-23 Granta: 13- Exon 2 (ca. 500/517, ca. 97 ng), 14- Exon 5 (ca. 300 bp, ca. 29 ng), 15- Exon 6 (300-400 bp, 29-38 ng), 16- Exon 7 (ca. 300 bp, ca. 29 ng), 17- Exon 8 (ca. 400 bp, ca. 38 ng), 18- Exon 9 (ca.200 bp, ca. 25 ng) , 19- Exon 10 (ca. 400 bp, ca. 38 ng), 20- Exon 11 (400-500 bp, 38-97 ng), 21- Exon 12 (ca. 300 bp, ca. 29 ng), 22- Exon 13 (300-400 bp, 29-38 ng), 23- Exon 14 (400-500 bp, 38-97 ng); 24-34 Kontrolle ohne DNA (15.05.2013). Abbildung erstellt am 15.07. 2013 mit GelDoc XR (Fa. Biorad, Hercules, USA), Universitätsklinikum Ulm, 2007-2013.

Durch die deutlich sichtbaren Banden ist erkennbar, dass die Amplifikation für die jeweiligen, den Primer nachstehenden DNA-Abschnitte, erfolgreich war. Nun kann mit dem nächsten Schritt fortgefahren werden.

2.2.2.6 PCR-Aufreinigung

Um die in dem PCR-Produkt noch vorhandenen DNA-Polymerase, Puffer und Primer und nicht verwendeten dNTPs aus der Probe zu entfernen, wird die Probe mit Hilfe des Purification-Kit aufgereinigt.

Es werden 200 µl PB-Puffer mit dem PCR-Produkt vorsichtig gemischt und das Gemisch auf eine sich in einer Säule befindlichen Silikalgelmembran pipettiert und

die Säule bei 13000 xg in für 1 min zentrifugiert. Nun adsorbiert das PCR-Produkt unter hoher Salzkonzentration (Guanidinhydrochlorid) an die Membran, während die nicht verwendeten Reste der PCR wie die Primer oder Verunreinigungen ungehindert durch die Säule fließen. Das Sammelröhrchen, in welcher die Säule sich befindet, wird verworfen und ein neues Röhrchen verwendet. Damit die Salze die Elution der DNA nicht negativ beeinflussen, werden 750 µl eines ethanolhaltigen PE-Puffers, welcher die Salze auswäscht, auf die Säule gegeben. Wiederum wird die Säule bei 13000 xg in für 1 min zentrifugiert und die Sammelröhrchen verworfen. Anschließend werden die Säulen bei 13000 xg in 1 min lang trocken zentrifugiert. Als letzter Schritt werden 30 µl eines salzarmen Elutionspuffers (EB) direkt in die Mitte der Silikalgel-Membran pipettiert, welcher die DNA von der Membran löst. Diese wird für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und bei 13000 xg in 1 min lang zentrifugiert. Die aufgereinigte DNA befindet sich danach in dem 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen, welches als Auffangröhrchen gedient hat.

Zur PCR-Aufreinigung von Proben auf einer 96-Well-Platte wurde das QIAquick96-PCR-Purification-Kit benutzt. Zu dem PCR-Produkt werden 200 µl PM-Puffer gegeben. Das gesamte Gemisch wird auf eine 96-Well-Filter-Platte pipettiert, welche auf einer Vakuumpumpe steht. Die angeschaltete Pumpe zieht nun die Verunreinigungen und überflüssigen PCR-Reste aus dem Filter, während die amplifizierte DNA dort haften bleibt. Zum Auswaschen werden nun 900 µl PE-Puffer auf die Filter pipettiert und das Vakuum wird wieder angeschaltet. Nun muss man das Vakuum 10 min laufen lassen, damit es die Filter komplett trocknet und restliche Verunreinigungen entfernt werden. Zusätzlich sollten die Filter ausgeklopft werden, damit keine Reste in den Filterspitzen hängen bleiben. Danach wird unter die Filterplatte eine 96-Well-Platte gelegt und es werden 40 µl EB-Puffer auf die Filter pipettiert. Dies lässt man 5 min eluieren und beide Platten werden 6 min lang bei 3800 xg in zentrifugiert. Das aufgereinigte PCR-Produkt befindet sich nun in der 96-Well-Platte.

2.2.2.7 Cycle-Sequencing-Reaction

Bei der Cycle-Sequencing-Reaction (CSR) wird von dem gereinigten PCR-Produkt ein komplementärer DNA-Strang synthetisiert. Hierbei werden neben dNTP’s auch Didesoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTP) ohne 3OH-Gruppen eingebaut, welche keine Phosphodiesterasebrücken ausbilden und es hier somit zum Abbruch

der Kettenverlängerung kommt. Die jeweilige Endbase ist spezifisch mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. So entstehen fluoreszenmarkierte DNA-Fragmente, die sich in ihrer Länge um jeweils 1 bp unterscheiden. Im verwendeten Big-Dye-Terminator v1.1 (Big-Dye-Ready-Reaction-Mix) sind bereits fluoreszenzmarkierte ddNTP's (dye-terminators), dNTPs sowie die Discoverase-DNA-Polymerase enthalten. Zusätzlich werden der 5x Sequenzierungs-Puffer und die bei der PCR verwendeten Oligonukleotidprimer hinzugefügt. Allerdings wird hierbei nur der Vorwärts- oder Rückwärtsprimer benutzt, um lineare CSR-Produkte zu erhalten. Aufgrund der Photosensibilität des fluoreszenzmarkierten Big-Dye sollte dieser und der spätere Master-Mix in Alufolie gepackt werden. Außerdem muss der Master-Mix auf Eis vorbereitet werden. Der Master-Mix wird ohne das Template pipettiert und danach gevortext. Anschließend fügt man 13 µl des Master-Mix zu dem in die 96-Well-Platte bereits vorgelegten 2 µl Template und startet die CSR-Reaktion in dem Thermocycler.

Tabelle 15: CSR Master-Mix Sanger-Sequenzierung

H_2O- Wasser, CSR- Cycle-Sequencing-Reaction

Reagenz	Volumen (µl)
H_20	**8,3**
Primer	1
Puffer 5x	1,7
Big-Dye	2

Tabelle 16: CSR Programm Sanger-Sequenzierung

min- minute, CSR- Cycle-Sequencing-Reaction

Prozess	°C	min	
Initiale Denaturierung	96	15	
Denaturierung	95	0,1	25 Zyklen
Primerhybridisierung	60	0,05	
Extension	72	2	
Abkühlung	4	∞	

2.2.2.8 Big-Dye Aufreinigung

Zur Aufreinigung des CSR-Produktes wird das DyeEx-Kit der Firma Qiagen verwendet. In den Säulen der DyeEx-Platte befindet sich eine spezielle Polymermatrix aus Kugeln mit einheitlichen Poren. Moleküle von bestimmter Molekülmasse, welche in die Poren diffundieren, werden so zurückgehalten. Dadurch werden überschüssige freie Stoppnukleotide entfernt, die sonst die weitere Sequenzanalyse behindern würden. Dies beruht auf dem Prinzip der Gel-Chromatographie.

Die bei 4 °C gelagerte DyeEx-Platte wird für 3 min mit 3000 xg in zentrifugiert und die in den Säulen befindliche Flüssigkeit in einer Auffangplatte gesammelt. Derweil werden in die später benötigten Wells einer neuen 96-Well-Platte 5 µl HiDi^{TM}Formamide pipettiert. Diese Platte wird nun unter die DyeEx-Platte gestellt und in die Mitte der Säulen werden 12 µl des CSR-Produktes pipettiert.

Nun werden die sich auf einem Ständer befindlichen, aufeinandergestellten Platten 3 min lang mit 3000 xg in zentrifugiert. Das gereinigte CSR-Produkt befindet sich nun in der 96-Well-Platte. Da der für die Sequenzanalyse benutzte Kapillarsequenzierer 3500xL-Dx-Genetic-Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) in einem Lauf immer 3 Reihen analysiert, dürfen in diesen 3 Reihen keine leeren Vertiefungen sein. Wenn dies doch der Fall ist, müssen diese mit 15 µl HiDi^{TM}Formamide aufgefüllt werden. Nun wird die Platte mit Thermowell-Sealing-Tape abgedeckt und im Gefrierschrank gelagert, bis sie zur Sequenzanalyse kommt. Vor der Sequenzanalyse sollte die Platte erneut zentrifugiert werden, um Kondensat aufzusammeln.

2.2.2.9 Sequenzanalyse

Zur Sequenzanalyse wird der 3500xL-DX-Genetic-Analyzer benutzt. Er dient dazu, die direkte Abfolge der Basen des Amplicon zu bestimmen. Es wird dabei das Prinzip der Kapillarelektrophorese verwendet. Zu Beginn erfolgt eine Auftrennung der verschieden langen fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente der Länge nach. Die Erkennung der Basen geschieht nun nach dem folgenden Prinzip: Bei der Auftrennung passieren die Fragmente einen Festköper-Dioden-Laser. Dieser regt durch ein Detektionsfenster die fluoreszierenden Farbstoffe an, welche jeweils für eines von vier ddNTP’s spezifisch ist. Somit kann eine CCD-Kamera 4 unterschiedliche Lichtsignale detektieren. Zur Auswertung dieser Signale wird die

Software Sequencing-Analysis v5.4 (Applied Biosystems, FosterCity, USA) verwendet. Sie rechnet diese 4 Signale in ein Elektropherogramm (=Reihenfolge der Farbsignale) um, wodurch die direkte Abfolge der Basen des Amplicons wiedergegeben wird. Zusätzlich werden die Ergebnisse der Sequenzierung mit der Software Staden-Package (Slashdot Media and Dice Inc., New York) ausgewertet.

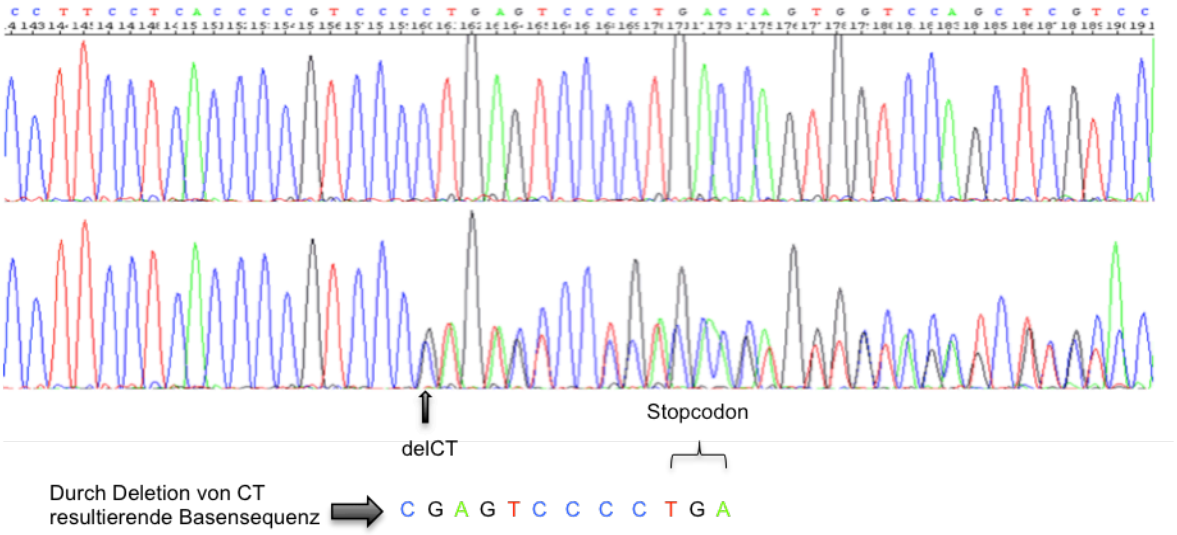


Abbildung 4: Wildtypsequenz und Mutationssequenz *NOTCH1,* EXON34

Die Abbildung zeigt oben eine Wildtypsequenz von *NOTCH1* mit normaler Basenabfolge und unten eine Hotspot-Mutation c .7541_7542delCT (p.P2514fs*4). Als Folge der Mutation kommt es zu einem Frameshift, welcher nach 4 Basentripletts zu einem Stopcodon (TGA) führt und damit zum Abbruch der Translation. Die farbigen Kurven stehen für die jeweilige farbige Base. Die Abbildung wurde mit der Software Sequencing Analysis v 5.4 (Applied Biosystems, FosterCity, USA) erstellt. Der auf der Abbildung zu sehende Genabschnitt von *NOTCH1* auf dem Chromosom 9 geht von Position 136496167 bis 136496216 (ermittelt mit Ensembl Genome Browser, Cunningham et al. 2015). C (blau)- Cytosin, G (schwarz)- Guanin, T (rot)- Thymin, A (grün)- Adenosin, del- deletion, p.- Protein, *P*- Prolin, Universitätsklinikum Ulm, 2013.

Sobald die Sequenzierung mit den Zelllinien funktioniert, kann mit den Primern Patientenmaterial sequenziert werden. Das Protokoll für die Sequenzierung mit Patientenmaterial folgt vollständig dem in 2.2.2 beschriebenen Vorgang.

2.2.3 Statistik

Für die statistische Auswertung wurde das R-Statistikpaket Version 3.1.
(The R Foundation for Statistical Computing, Wien, Austria) verwendet.
Als univariater Test für dichotome Parameter wurde der Exakte-Test nach Fisher benutzt (Mehta und Patel 1986). Der Wilcoxon-Rank-Test wurde als univariater Test für dichotome plus kontinuierliche Parameter durchgeführt (Wilcoxon 1945).

Weiterhin wurde für die univariate Überlebenszeitanalyse der Log-Rank-Test benutzt (Bland und Altmann 2004). Für multivariate Analysen wurde der Cox Regressionstest ohne Vorwärts-/Rückwärts-Selektion eingesetzt (Cox 1972). Für die Analyse der Überlebenszeitdaten wurde das Kaplan-Meier-Verfahren benutzt (Kaplan u. Meier 1958).
Nach der Auswertung wurden die Ergebnisse in das Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel 2011 (Fa. Microsoft, Redmond, USA) eingefügt.

3. Ergebnisse

3.1 Vergleich Sanger-Sequenzierung mit Next-Generation-Sequencing

3.1.1 Sensitivität und Spezifität von NGS anhand der *NOTCH1*-Hotspot-Mutation P2514fs*

Im Gesamten wurden 383 Proben mit NGS und Sanger parallel sequenziert.

Mit der Sanger-Sequenzierung wurden 42 Proben als Hotspot-Mutationen eingestuft, 8 Proben wurden als unklar gewertet und die restlichen 333 Proben als Wildtyp.

Durch NGS konnten 116 Hotspot-Mutationen entdeckt werden, davon war keine Mutation unklar. Die restlichen 267 Proben wurden als *NOTCH1*-Wildtyp gewertet.

Bei näherer Betrachtung der Proben, die mit Sanger, jedoch nicht mit NGS gefunden wurden, ergibt sich folgendes Bild: Die benutzte Pipeline ist nicht dazu im Stande, einen Teil der niedrigprozentigen Mutationen zu erkennen. Jedoch konnten im manuellem Abgleich mittels dem Integrative Genomics Viewer alle durch Sanger-Sequenzierung detektierten Mutationen auch im NGS-Datensatz bestätigt werden.

Mutationen in NGS, die in Sanger nicht gefunden wurden, umfassten Non-Hotspot-Mutationen, die nicht abgedeckt waren, sowie subklonale Mutationen, die initial als Hintergrundrauschen, bei Wissen des Ergebnisses des NGS, jedoch als Mutation bestätigt werden konnten.

Die niedrigste Mutationsfraktion, welche durch Sanger bestätigt werden konnte, betrug 1,2 %, während durch das NGS Mutationsfraktionen von bis zu 0,03 % erkannt werden konnten. 68 Proben wiesen im NGS eine Mutationsfraktion von unter 5 % auf und davon hatten 12 eine Fraktion über 1%.

Alle in der Sanger-Sequenzierung unklaren Proben hatten im NGS eine Mutationsfraktion von über 1 % und sogar 4 von über 5 %.

Da eine Validierung von Mutationen mit einer Allelfrequenz <5% mit herkömmlichen Methoden nicht ohne weiteres möglich ist und für die weiteren Auswertungen nur mit einer zweiten Methode validierte Mutationen berücksichtigt werden sollten, wurden nur Mutationen mit einer Allelfrequenz von 5 % verwendet. Somit konnten alle im NGS gefundenen Mutationen mit Sanger validiert werden.

Proben mit einer Mutationsfraktion unter dieser Grenze wurden als *NOTCH1*-Wildtyp bezeichnet.
Durch NGS wurden 46 Mutationen des Hotspots mit einer Mutationsfraktion von über 5 % gefunden. Somit ergibt sich unter Berücksichtigung der manuellen Untersuchung der NGS Daten für Patienten mit einer Mutationsfraktion über 5% eine Sensitivität von 100 % und Spezifität von 100 %.

3.1.2 Spezifität Next-Generation-Sequencing außerhalb des Hotspots

Neben des *NOTCH1*-Hotspots wurden nicht nur weitere kodierende Sequenzen innerhalb der PEST-Domäne von *NOTCH1* analysiert, sondern darüber hinaus auch das nachgeschaltete Ziel *FBXW7*. Zusammenfassend fanden sich 11 weitere *NOTCH1*-Mutationen außerhalb des Hotspots sowie 14 *FBXW7*-Mutationen. Es konnten alle *FBXW7*-Mutationen ebenso wie 10 von 11 *NOTCH1*-Mutationen mittels Sanger-Sequenzierung bestätigt werden. Bei einer Probe mit *NOTCH1*-Mutation konnte kein Assay mittels Sanger etabliert werden und daher nicht gewertet werden. Die Spezifität des NGS lag somit bei 100%.
Wenn man die Hotspot-Mutationen dazurechnet, betrug die Spezifität des NGS insgesamt 100%.
Insgesamt wurden also 58 *NOTCH1*-Mutationen in 383 Proben mit Sanger-Sequenzierung gefunden. Berücksichtigt man eine Mutationsfraktion von über 5 %, dann wurden auch mit NGS 58 *NOTCH1*-Mutationen in 383 Proben gefunden. Die Überschneidung beträgt also 100%.

3.2 Charakteristika der *NOTCH1*-Mutationen

Betrachtet man nun die *NOTCH1*-Mutationen im Gesamten, dann hatten von den 383 Patienten 58 (15,1 %) eine Mutation. Alle gefundenen Mutationen befanden sich auf Exon 34. Der Anteil der Hotspot-Mutation betrug 47 (81%). Abgesehen von der Hotspotmutation P2514fs*4 traten noch 6 Nonsense-Mutationen (10,3 %), 4 Missense-Mutationen (6,8 %) und eine weitere Frameshift-Mutation (1,7 %) auf. 56 der Mutation waren in der PEST-Domäne (96,5 %) und 2 in der TAD-Domäne (3,4 %) von *NOTCH1* lokalisiert. Es gab 3 Samesense-Mutationen, die aufgrund der fehlenden Auswirkung auf die Aminosäuresequenz mit hoher Wahrscheinlichkeit keine Auswirkung auf die Proteinfunktion haben und somit nicht als Mutationen in die Auswertung mit einbezogen wurden. 29 Mutationen traten in dem Chlorambucil

(Clb)-Therapiearm und 29 in jenem Arm auf, in welchem Clb mit Ofatumumab (Clb+O) kombiniert wurde.

Tabelle 17: *NOTCH1*-Mutationen

SNV- Einzel-Nukleotid-Variante, PEST- Prolin-Glutamat-Serin-Threonin-reiche-Domäne, TAD-Transaktivierungsdomäne, COSM- Katalog der somatischen Mutationen, A- Alanin , P- Prolin, Q- Glutamin, T- Threonin,. V-Valin, G- Glycin, S- Serin, L-Leucin, fs- Frameshift, chr- Chromosom, p.- Protein, Universitätsklinikum Ulm, 2007-2013.

Mutation	Position	Mutations-art	Deutung	Domäne	Vorbekannt	Mutations-fraktion der Allele
p.P2514fs*4	chr9:139390649	Deletion	Frameshift	PEST	COSM12774	0,06
p.P2514fs*4	chr9:139390649	Deletion	Frameshift	PEST	COSM12774	0,06
p.P2514fs*4	chr9:139390649	Deletion	Frameshift	PEST	COSM12774	0,09
p.P2514fs*4	chr9:139390649	Deletion	Frameshift	PEST	COSM12774	0,10
p.P2514fs*4	chr9:139390649	Deletion	Frameshift	PEST	COSM12774	0,12
p.P2514fs*4	chr9:139390650	Deletion	Frameshift	PEST	COSM12774	0,06
p.P2514fs*4	chr9:139390650	Deletion	Frameshift	PEST	COSM12774	0,14
p.P2514fs*4	chr9:139390651	Deletion	Frameshift	PEST	COSM12774	0,07
p.P2514fs*4	chr9:139390651	Deletion	Frameshift	PEST	COSM12774	0,16
p.P2514fs*4	chr9:139390652	Deletion	Frameshift	PEST	COSM12774	0,07
p.P2514fs*4	chr9:139390652	Deletion	Frameshift	PEST	COSM12774	0,19
p.P2514fs*4	chr9:139390653	Deletion	Frameshift	PEST	COSM12774	0,20
p.P2514fs*4	chr9:139390654	Deletion	Frameshift	PEST	COSM12774	0,20
p.P2514fs*4	chr9:139390655	Deletion	Frameshift	PEST	COSM12774	0,24
p.P2514fs*4	chr9:139390656	Deletion	Frameshift	PEST	COSM12774	0,25
p.P2514fs*4	chr9:139390657	Deletion	Frameshift	PEST	COSM12774	0,26
p.P2514fs*4	chr9:139390658	Deletion	Frameshift	PEST	COSM12774	0,27
p.P2514fs*4	chr9:139390659	Deletion	Frameshift	PEST	COSM12774	0,30
p.P2514fs*4	chr9:139390659	Deletion	Frameshift	PEST	COSM12774	0,32
p.P2514fs*4	chr9:139390659	Deletion	Frameshift	PEST	COSM12774	0,35
p.P2514fs*4	chr9:139390659	Deletion	Frameshift	PEST	COSM12774	0,37
p.P2514fs*4	chr9:139390659	Deletion	Frameshift	PEST	COSM12774	0,37
p.P2514fs*4	chr9:139390659	Deletion	Frameshift	PEST	COSM12774	0,37
p.P2514fs*4	chr9:139390659	Deletion	Frameshift	PEST	COSM12774	0,38
p.P2514fs*4	chr9:139390659	Deletion	Frameshift	PEST	COSM12774	0,39
p.P2514fs*4	chr9:139390659	Deletion	Frameshift	PEST	COSM12774	0,40
p.P2514fs*4	chr9:139390659	Deletion	Frameshift	PEST	COSM12774	0,40

Fortsetzung

Fortsetzung Tabelle 17

Mutation	Position	Mutations-art	Deutung	Domäne	Vorbekannt	Mutations-fraktion der Allele
p.P2514fs*4	chr9:139390659	Deletion	Frameshift	PEST	COSM12774	0,40
p.P2514fs*4	chr9:139390659	Deletion	Frameshift	PEST	COSM12774	0,42
p.P2514fs*4	chr9:139390659	Deletion	Frameshift	PEST	COSM12774	0,43
p.P2514fs*4	chr9:139390659	Deletion	Frameshift	PEST	COSM12774	0,43
p.P2514fs*4	chr9:139390659	Deletion	Frameshift	PEST	COSM12774	0,43
p.P2514fs*4	chr9:139390659	Deletion	Frameshift	PEST	COSM12774	0,44
p.P2514fs*4	chr9:139390659	Deletion	Frameshift	PEST	COSM12774	0,47
p.P2514fs*4	chr9:139390659	Deletion	Frameshift	PEST	COSM12774	0,47
p.P2514fs*4	chr9:139390659	Deletion	Frameshift	PEST	COSM12774	0,47
p.P2514fs*4	chr9:139390659	Deletion	Frameshift	PEST	COSM12774	0,48
p.P2514fs*4	chr9:139390659	Deletion	Frameshift	PEST	COSM12774	0,48
p.P2514fs*4	chr9:139390659	Deletion	Frameshift	PEST	COSM12774	0,48
p.P2514fs*4	chr9:139390659	Deletion	Frameshift	PEST	COSM12774	0,49
p.P2514fs*4	chr9:139390659	Deletion	Frameshift	PEST	COSM12774	0,49
p.P2514fs*4	chr9:139390659	Deletion	Frameshift	PEST	COSM12774	0,53
p.P2514fs*4	chr9:139390659	Deletion	Frameshift	PEST	COSM12774	0,58
p.P2514fs*4	chr9:139390659	Deletion	Frameshift	PEST	COSM12774	0,64
p.P2514fs*4	chr9:139390659	Deletion	Frameshift	PEST	COSM12774	0,77
p.P2514fs*4	chr9:139390660	Deletion	Frameshift	PEST	COSM12774	0,31
p.P2514fs*4	chr9:139390661	Deletion	Frameshift	PEST	COSM12774	0,31
p.P2471fs*3	chr9:139390780	Deletion	Frameshift	PEST	neu	0,41
p.A2463T	chr9:139390804:C>T	SNV	Missense	PEST	neu	0,55
p.Q2416*	chr9:139390945:G>A	SNV	Nonsense	PEST	COSM27387	0,54
p.P2410L	chr9:139390962:G>A	SNV	Missense	PEST	neu	0,53
p.Q2409*	chr9:139390966:G>A	SNV	Nonsense	PEST	COSM28668	0,31
p.Q2404*	chr9:139390981:G>A	SNV	Nonsense	PEST	neu	0,08
p.Q2394*	chr9:139391011:G>A	SNV	Nonsense	PEST	COSM13062	0,85
p.Q2307*	chr9:139391272:G>A	SNV	Nonsense	PEST	neu	0,83
p.A2250V	chr9:139391442:G>A	SNV	Missense	TAD	neu	0,59
p.G2188S	chr9:139391629:C>T	SNV	Missense	TAD	neu	0,52
p.Q2444*	chr9.139390861:G>A	SNV	Nonsense	PEST	COSM27925	0,45

3.3 Charakteristika der *FBXW7*-Mutationen

Im nächsten Schritt wurden die FBXW7-Mutationen genauer untersucht. Hier hatten von den 383 Patienten 13 Patienten eine Mutation (3,4 %). Einer dieser Patienten hatte zwei Mutationen in *FBXW7*. Bei diesem Patienten traten eine Frameshift- und eine Missense-Mutation von *FBXW7* auf. Es zeigte sich, dass alle gefundenen Mutationen eine Mutationsfraktion von über 10 % besaßen. Bei Betrachtung der Mutationstypen fanden sich 11 Missense-Mutationen (84,6 %), 2 (15,3 %) Frameshift-Mutationen (von der eine in einer Splice-Site auftrat), sowie 1 (7,6 %) Nonsense-Mutation. Die Mutationen verteilten sich über 6 Exons, wobei jeweils 4 in Exon 11 und 12 auftraten. Zudem wurden 5 Samesense-Mutationen gefunden, welche nicht gewertet wurden. Weiterhin fiel auf, dass bei zwei Patienten zusätzlich zu einer *NOTCH1*-Hotspotmutation (P2514fs*4) noch eine Missense-Mutation (T196A) bzw. eine Frameshift-Mutation (G16fs*10) in *FBXW7* vorkam.

Tabelle 18: *FBXW7*-Mutationen

SNV- Einzel-Nukleotid-Variante, PEST- Prolin-Glutamat-Serin-Threonin-reiche Domäne, COSM- Katalog der somatischen Mutationen, R- Arginin, W- Tryptophan, D- Asparaginsäure, L- Leucin, H- Histidin, C- Cystein, fs- Frameshift, A- Alanin, P- Prolin, Q- Glutamin, T- Threonin, V- Valin, G- Glycin, p.- Protein, Universitätsklinikum Ulm, 2007-2013.

Mutation	Position	Mutationsart	Deutung	Vorbekannt	Mutationsfraktion beider Allele
p.R689W	g.chr4:153244092:G>A	SNV	missense	COSM27083	0,413
p.D643V	g.chr4:153244229:T>A	SNV	missense	neu	0,474
p.L630*	g.chr4:153244268:A>C	SNV	nonsense	neu	0,549
p.V544A	g.chr4:153247171:A>G	SNV	missense	neu	0,204
p.A503V	g.chr4:153247294:G>A	SNV	missense	neu	0,473
p.R479Q	g.chr4:153247366:C>T	SNV	missense	COSM22974	0,101
p.R479L	g.chr4:153247366:C>A	SNV	missense	COSM27058	0,39
p.R465H	g.chr4:153249384:C>T	SNV	missense	COSM117310	0,318
p.R465C	g.chr4:153249385:G>A	SNV	missense	COSM22932	0,392
p.R465C	g.chr4:153249385:G>A	SNV	missense	COSM22932	0,32
p.W425L	g.chr4:153249504:C>A	SNV	missense	neu	0,354
p.R274fs*8	g.chr4:153244303	Deletion	splice site	neu	0,364
p.T196A	g.chr4:153268222:T>C	SNV	missense	neu	0,43
p.G16fs*10	g.chr4:153332910	Insertion	Frameshift	neu	0,456

3.4 Korrelation der Mutationen mit prognostischen Faktoren

3.4.1 Häufigkeit prognostischer Faktoren

Um zu zeigen, dass die analysierte Kohorte in ihren Charakteristika der gesamten Studienpopulation entspricht, wurde die Häufigkeit verschiedener prognostischer Faktoren in den Proben bestimmt (siehe Tabelle 19). Es fand sich in keinem der Parameter ein signifikanter Unterschied zwischen der Studienkohorte und der in dieser Untersuchung analysierten Patientengruppe, die 86 % der Studienpopulation entsprach.

Tabelle 19: Häufigkeit verschiedener prognostischer Faktoren in COMPLEMENT1

ECOG- Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status, CIRS- Skala zur kumulierten Bewertung von Erkrankungen, Clb- Chlorambucil, O- Ofatumumab, WBC- Anzahl weißer Blutkörperchen, IGHV- schwere Kette des Immunglobulin, Universitätsklinikum Ulm, 2007-2013.

Faktoren	Komplette Studie	Analysierte Kohorte
Patienten	447	383
Alter ≥ 75	119 (26,6%)	96 (25,1%)
Binet C	139 (31,1%)	113 (29,5%)
Geschlecht: Mann	282 (63,1%)	246 (64,2%)
B-Symptome	240 (53,7%)	214 (55,8%)
ECOG ≥ 1	275 (61,5%)	240 (62,7%)
CIRS ≥ 8	275 (61,5%)	236 (61,6%)
Clb+O	221 (49,4%)	183 (47,8%)
WBC ≥ 50G/L	257 (63,1%)	226 (59,0%)
IGHV mutiert	181 (44,5%)	156 (40,7%)

3.4.2 Korrelation *NOTCH1*-*Mut*ation mit klinischen Parametern

Es standen unterschiedliche klinische und genetische Parameter zur Korrelation aus der Studie zur Verfügung. Von den Charakteristika Alter, Binet-Stadium, ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status), CIRS (Skala zur kumulierten Bewertung von Erkrankungen), B-Symptomen, Anzahl der Leukozyten, ß2-Mikroglobulin und Geschlecht fand sich eine signifikante Assoziation mit weiblichem Geschlecht (p= 0,02).

3.4.3 Korrelation *NOTCH1-Mut*ation mit Zytogenetik und Immunglobulinschwerekette (IGHV) und anderen Mutationen

Weiterhin wurde analysiert, ob eine Korrelation mit +12q, del13q, del17p, del11q, del6q und einem mutierten oder einem unmutierten IGHV-Status vorlag.

Hierbei wurden signifikante Assoziationen von *NOTCH1-Mut*ationen mit +12q (p= 0,01) und einem unmutierten IGHV (p< 0,01) entdeckt.

Außerdem waren für die untersuchte Kohorte neben *NOTCH1* und *FBXW7* auch Mutationsanalysen für 6 weitere Gene verfügbar. Somit konnte auch die Assoziation mit den in der CLL häufig vorkommenden Mutationen von *TP53, SF3B1, ATM, MYD88, BIRC3* und *POT1* untersucht werden.

NOTCH1-Mutationen traten signifikant gehäuft bei Patienten mit *BIRC3*-Mutationen (p< 0,01) und *POT1*-Mutationen (p= 0,02) auf. Außerdem zeigte sich, dass sich Mutationen in *SF3B1* und *NOTCH1* in dieser Studie gegenseitig ausschlossen (p= 0,01).

3.4.4 Korrelation *FBXW7*-Mutation mit klinischen Parametern

Auch die *FBXW7*-Mutationen wurden mit den Parametern Charakteristika Alter, Binet-Stadium, ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status), CIRS (Skala zur kumulierten Bewertung von Erkrankungen), B-Symptomen, Anzahl der Leukozyten und ß2-Mikroglobulin und Geschlecht korreliert, wobei sich keine signifikante Assoziation zeigte.

3.4.5 Korrelation *FBXW7*-Mutation mit Zytogenetik und IGHV und anderen Mutationen

Geprüft wurde, ob eine Korrelation mit +12q, del13q, del17p, del11q, del6q und einem mutierten oder einem unmutierten IGHV-Status vorlag.

Bei *FBXW7* fanden sich signifikante Assoziationen mit der Deletion von 17p (p= 0,02) und ein Trend zur Assoziation mit +12q (p< 0,06). Aufgrund der bereits, wie oben beschrieben, vorhandenen Mutationsanalysen weiterer Gene konnten diese auch mit *FBXW7* assoziiert werden. Es zeigte sich keine Assoziation von *FBXW7*-Mutationen mit Mutationen von *TP53, SF3B1, ATM, MYD88, BIRC3, POT1* und *NOTCH1*.

3.5 Therapieansprechen

3.5.1 Therapieansprechen, progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben von *NOTCH1*-mutierten Patienten

Beim Überprüfen des Therapieansprechens zeigte sich weder im kompletten Patientenkollektiv von 383 Patienten noch in den Therapieunterarmen eine Assoziation von *NOTCH1*-Mutationen mit kompletter Remission (CR) oder Gesamt-Ansprechrate (ORR).

Bei einer durchschnittlichen Nachbeobachtungszeit von 31,7 Monaten traten 249 (66 %) Ereignisse für das progressionsfreie Überleben (PFS) und 63 (16,8 %) für das Gesamtüberleben auf. In jenem Therapiearm der Clb und O enthielt hatten die Patienten im Vergleich zur Monotherapie mit Clb ein signifikant verlängertes PFS (durchschnittlich 22,4 Monate vs. 13,1 Monate; HR= 0,53; $p< 0,01$).

In der univariaten Analyse wurde die *NOTCH1*-Mutation als ein prognostischer Marker für ein kürzeres PFS identifiziert (HR= 1,52; $p< 0,01$).

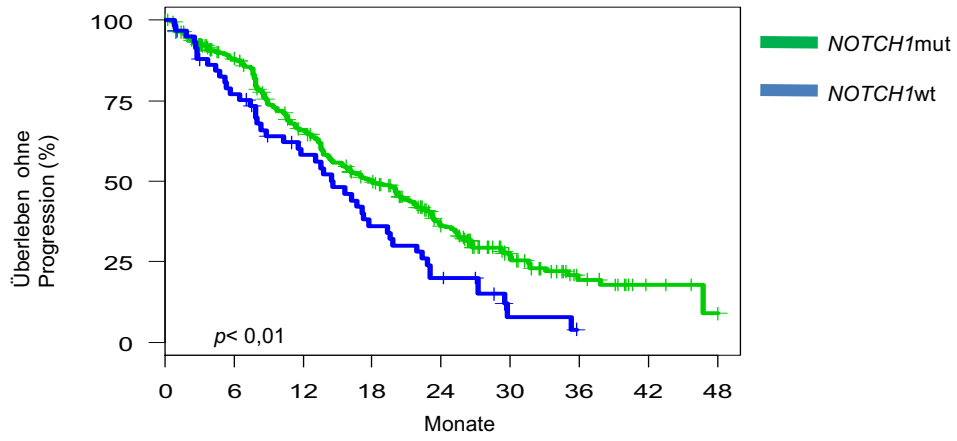


Abbildung 5: Vergleich des Einflusses von *NOTCH1*-Mutation und *NOTCH1*-Wildtyp auf das progressionsfreie Überleben bei Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie

Patienten behandelt mit Chlorambucil oder Chlorambucil plus Ofatumumab, *p*- *p*-Wert, mut- Mutation, wt- Wildtyp, Kaplan Meier plots mit p- Werten ermittelt mit Logrank Test, grün- *NOTCH1*-Mutation, blau- *NOTCH1*-Wildtyp, multizentrische Studie COMPLEMENT1 (NCT00748189) (GlaxoSmithKline, London, UK, 2008-2013)

Patienten mit NOTCH1-Mutation hatten ein vergleichbares Gesamtüberleben wie die Gesamtgruppe aller Patienten (HR= 0,99; $p= 0,98$).

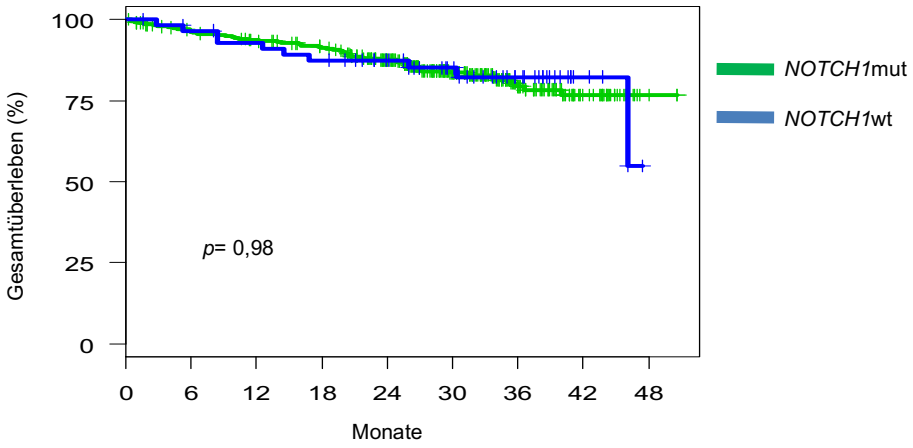


Abbildung 6: Vergleich des Einflusses von *NOTCH1*-Mutation und *NOTCH1*-Wildtyp auf das Gesamtüberleben Überleben bei Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie

Patienten behandelt mit Chlorambucil oder Chlorambucil plus Ofatumumab, wt- Wildtyp, mut- Mutiert, *p*- *p*-Wert, Kaplan Meier Plots mit p- Werten ermittelt mit Logrank Test, grün- *NOTCH1*-Mutation, blau- *NOTCH1*-Wildtyp, multizentrische Studie COMPLEMENT1 (NCT00748189) (GlaxoSmithKline, London, UK, 2008-2013)

3.5.2 Therapieansprechen von *FBXW7*

Es konnte kein statistisch signifikanter Einfluss auf das OS und das PFS gesehen werden, weder in Bezug auf die gesamte Versuchspopulation, noch bei den einzelnen Therapiearme.

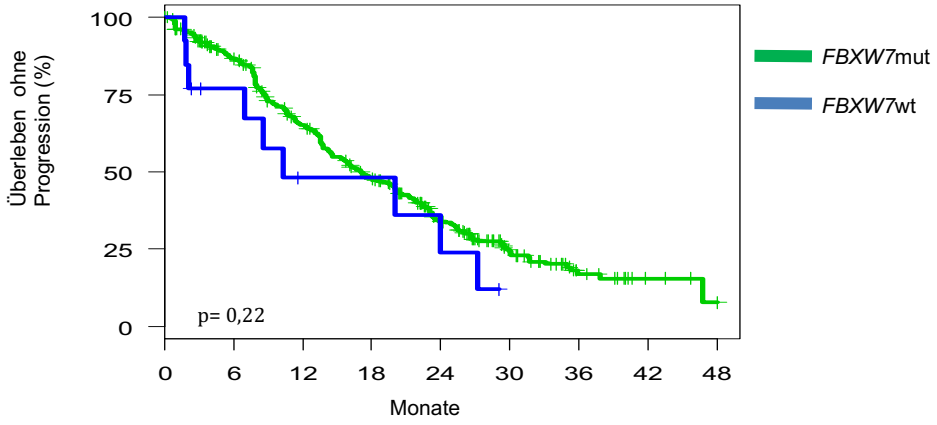


Abbildung 7: Vergleich des Einflusses von *FBXW7*-Mutation und *FBXW7*-Wildtyp auf das Progressionsfreie Überleben bei Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie

Patienten behandelt mit Chlorambucil oder Chlorambucil plus Ofatumumab, wt- Wildtyp, mut- Mutiert, *p*- *p*-Wert, Kaplan Meier Plots mit p- Werten ermittelt mit Logrank Test, grün- *NOTCH1*-Mutation, blau- *NOTCH1*-Wildtyp, multizentrische Studie COMPLEMENT1 (NCT00748189) (GlaxoSmithKline, London, UK, 2008-2013)

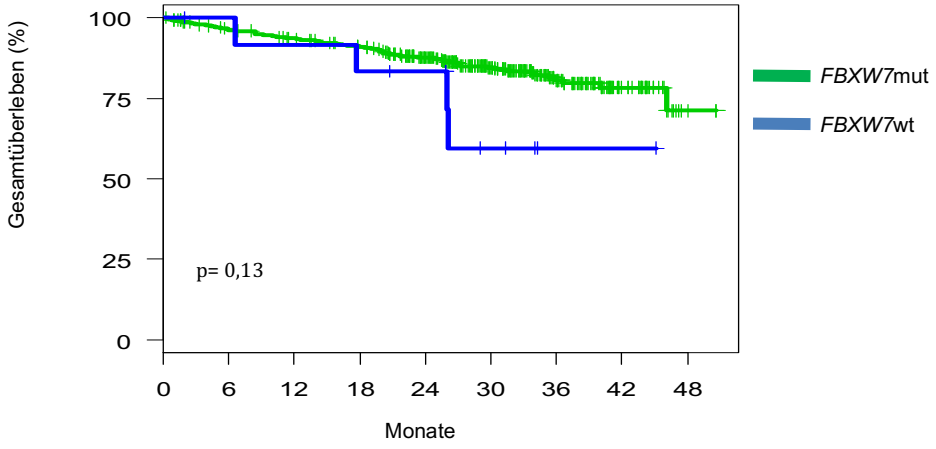


Abbildung 8: Vergleich des Einflusses von *FBXW7*-Mutation und *FBXW7*-Wildtyp auf das Gesamtüberleben bei Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie

Patienten behandelt mit Chlorambucil oder Chlorambucil plus Ofatumumab, wt- Wildtyp, mut- Mutiert, *p*- *p*-Wert, Kaplan Meier Plots mit p- Werten ermittelt mit Logrank Test, grün- *NOTCH1*-Mutation, blau- *NOTCH1*-Wildtyp, multizentrische Studie COMPLEMENT1 (NCT00748189) (GlaxoSmithKline, London, UK, 2008-2013)

3.5.3 *NOTCH1*-*Mut*ationen und *FBXW7*-Mutationen als potentielle prädikative Faktoren

Das hier verwendete Studiendesign ermöglicht, die getrennte Auswertung des Einflusses von *NOTCH1*-Mutationen und *FBXW7*-Mutationen auf die beiden Therapiearme.

Bei Patienten, welche mit einer Monotherapie Chlorambucil behandelt wurden, hatten *NOTCH1*-Mutationen keinen signifikanten Einfluss auf das PFS (HR= 1,16; p= 0,5). Demgegenüber hatten in der Kohorte, welche zusätzlich Ofatumumab erhielt, *NOTCH1*-mutierte Patienten im Vergleich mit *NOTCH1*-Wildtyp-Patienten ein signifikant verkürztes PFS (HR= 2,02; *p*< 0,01). Entsprechend profitierten *NOTCH1*-Wildtyp-Patienten signifikant von der Kombination mit Ofatumumab, (HR= 0,50; *p*< 0,001), während dies für *NOTCH1*-mutierte Patienten nicht gezeigt werden konnte (HR= 0,79; *p*= 0,43).

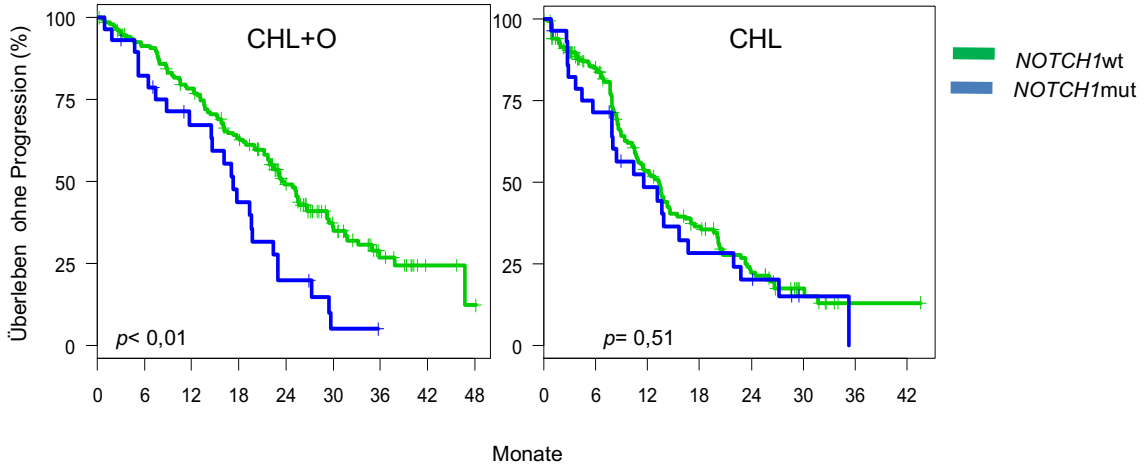


Abbildung 9: Vergleich des Einflusses von *NOTCH1*-Mutation und *NOTCH1*-Wildtyp auf das progressionsfreie Überleben in beiden Therapiearmen bei Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie

Chl- Chlorambucil, O- Ofatumumab, wt- Wildtyp, mut-mutiert, *p*- *p*-Wert, Kaplan Meier Plots mit p- Werten ermittelt mit Logrank Test, grün- *NOTCH1*-Mutation, blau- *NOTCH1*-Wildtyp, multizentrische Studie COMPLEMENT1 (NCT00748189) (GlaxoSmithKline, London, UK, 2008-2013)

Schaut man sich nur die Mutationen an, welche eine Mutationsfraktion von über 20 % (34 von 55) hatten, zeigt sich der Einfluss der *NOTCH1*-Mutation auf das PFS im Clb+O Arm noch stärker. Hier tritt bei Patienten mit *NOTCH1*-Wildtyp ein durchschnittliches PFS von 23,8 Monaten auf, im Vergleich zu 19,7 Monaten bei den Mutierten mit einer Mutationsfraktion von unter 20 % (*p*< 0,001) und 17,2

Monate bei den Patienten mit einer Mutationsfraktion von über 20 % (p< 0,01). Im Gegensatz dazu findet bei Patienten im Clb-Arm keine Veränderung des PFS statt (13,4 Monate, 12,4 Monate und 10,3 Monate; *p*= 0,75).

3.5.4 Multivariate-Analyse

3.6.4.1 Multivariate Analyse des PFS

Um eine Aussage über unabhängige prognostische Faktoren machen zu können, wurde zudem eine multivariate Analyse unter Hinzunahme folgender Faktoren durchgeführt: Arm O + Clb, IGHV unmutiert, del11q, del17p, *NOTCH1* mutiert, *SF3B1* mutiert, *TP53* mutiert, *BIRC3* mutiert, *POT1* mutiert, *ATM* mutiert, *MYD88* mutiert und *FBXW7* mutiert. In Bezug auf das PFS fanden sich für den Therapiearm Chlorambucil plus Ofatumumab (HR= 0,47; *p*< 0,01), eine unmutierte IGHV (HR= 0,69; *p*= 0,01), eine Deletion von 11q (HR= 1,70; *p*< 0,01) und eine Deletion von 17p (HR= 2,89; *p*< 0,01) signifikante Werte. Wurde die Interaktion mit dem Therapiearm außer Acht gelassen, so konnte für *NOTCH1* (HR= 1,54; *p*= 0,02), *SF3B1* (HR= 1,59; *p*= 0,01) und *TP53* (HR= 1,77; *p*= 0,03) eine unabhängige prognostische Wertigkeit gezeigt werden.

Tabelle 20: Assoziation verschiedener prognostischer Faktoren und Mutationen mit dem progressionsfreien Überleben

Clb- Chlorambucil, O- Ofatumumab, del- Deletion, mut- Mutiert, IGHV- schwere Kette des Immunglobulin, Universitätsklinikum Ulm, 2007-2013

Faktoren	Hazard Ratio	Konfidenzintervall = 0,95	*p*- Wert
Arm O + Clb	0,47	0,37-0,59	<0.01
IGHV unmutiert	1,45	1,14-1,85	0,01
del11q	1,70	1,24-2,33	<0.01
del17p	2,89	1,64-5,07	<0.01
*NOTCH1*mut	1,54	1,15-2,05	0,02
*SF3B1*mut	1,59	1,17-2,16	0,01
*TP53*mut	1,77	1,16-2,71	0,03
*BIRC3*mut	0,96	0,49-1,87	0,92
*POT1*mut	1,15	0,76-1,73	0,58
*ATM*mut	1,04	0,73-1,48	0,85
*MYD88*mut	0,73	0,34-1,56	0,5
*FBXW7*mut	1,11	0,62-1,99	0,8

3.5.4.2 Multivariate-Analyse des OS

Auch für das OS wurde eine Multivariate-Analyse durchgeführt. Hierbei zeigten sich als unabhängige prognostische Faktoren ein unmutierter IGHV Status (HR= 1,72; *p*= 0,07), Deletion von 11q (HR= 1,99; *p*= 0,05), Deletion von 17p (HR= 3,27; *p*= 0,01), sowie *TP53*-Mutation (HR= 2,92; *p*= 0,02).

Tabelle 21: Assoziation verschiedener prognostischer Faktoren und Mutationen mit dem Gesamtüberleben

Clb- Chlorambucil, O- Ofatumumab, del- Deletion, mut- mutiert, IGHV- schwere Kette des Immunglobulin, *- nicht bestimmbar da in einer Subgruppe kein Ereignis vorkam, Universitätsklinikum Ulm, 2007-2013

Faktoren	**Hazard Ratio**	**Konfidenzintervall= 0,95**	***p*- Wert**
Arm: O+Clb	0,75	0,48-1,17	0,29
IGHV unmutiert	**1,72**	**1,04-2,78**	**0,07**
del11q	**1,99**	**1,12-3,53**	**0,05**
del17p	**3,27**	**1,42-7,53**	**0,02**
*NOTCH1*mut	1,15	0,63-2,09	0,7
*SF3B1*mut	1,35	0,72-2,55	0,41
*TP53*mut	**2,92**	**1,42-6,01**	**0,02**
*BIRC3*mut	0,55	0,16-1,87	0,43
*POT1*mut	1,52	0,67-3,43	0,4
*ATM*mut	1,14	0,58-2,26	0,75
*MYD88*mut	0,00	*	0,1
*FBXW7*mut	1,64	0,66-4,05	0,37

4. Diskussion

4.1 Methodenvergleich Sanger-Sequenzierung und Next-Generation-Sequencing

Die Einführung der Sequenzierung nach Sanger in den Siebzigerjahren war eine Revolution in der Mutationsdiagnostik (Sanger et al. 1977). Seitdem ist die Sanger-Sequenzierung weltweit in Laboren das Mittel der Wahl, um die Basenpaarsequenz von DNA-Abschnitten darzustellen. Mit dieser Methode ließ sich erstmals in den 2000ern sogar das komplette Genom eines Menschen sequenzieren (International Human Genome Sequencing Konsortium, 2004). Dieses Projekt benötigte jedoch große Mengen an Zeit und Ressourcen und es wurde klar, dass schnellere und kostengünstiger Technologien mit höheren Durchsätzen entwickelt werden müssten (van Dijk et al. 2014).

Durch das Aufkommen des Next Generation Sequencing (NGS) in den letzten Jahren könnte eine neue Ära anbrechen und die Sequenzierung nach Sanger zunehmend in den Hintergrund rücken. NGS wird bereits weltweit in der Forschung genutzt. Mit Whole-Genome-Sequencing (WGS) bzw. Whole-Exome-Sequencing (WES) ist es mittlerweile möglich, mit Hilfe einer massiven Parallelisierung ganze Genome bzw. Exome in einer bisher unvorstellbaren Schnelligkeit zu sequenzieren. Allerdings gibt es bei diesen Methoden einige Nachteile, wie zum Beispiel eine ungleichmäßige Abdeckung oder inkomplette Darstellung mancher Genbereiche, verkürzte Ablesungen und eine große Menge an gewonnenen Daten. Als Konsequenz könnten relevante Mutationen übersehen werden (Behjati u. Tarpey 2013; Sikkema-Raddatz et al. 2013). Daher sind diese Methoden für die gezielte Mutationsdiagnostik von bestimmten kodierenden Exonen oder bestimmten interessanten Regionen schwieriger umzusetzen. Als Konsequenz wurde die gezielte Amplicon-basierte Sequenzierung mit Hilfe von Benchtop-Sequenzierern, wie zum Beispiel dem Illumina MiSeq, entwickelt. Mit Hilfe von Amplicon basierter Amplifikation von Genabschnitten kann eine erhöhte Abdeckung und eine verbesserte Darstellung bestimmter Bereiche bei niedrigeren Kosten sowie einer schnelleren Verarbeitungszeit erreicht werden (Sikkema-Raddatz et al. 2013; Bentley et al. 2008).

Der auch in dieser Studie verwendete, weitverbreitete MiSeq von Illumina wurde mittlerweile sogar von der amerikanischen Food and Drug Administration für die Diagnostik zugelassen (Collins u. Hamburg 2013). Zur Diagnostik von hereditären oder erworbenen Genmutationen benutzen die meisten Labore jedoch aktuell noch die Sanger-Sequenzierung als Standardmethode.
Um diesen Prozess der Umstellung voranzutreiben, muss die Zuverlässigkeit von NGS gewährleistet sein. Vor allem bedeutet dies, dass die Ergebnisse der modernen Sequenzierung mit der Sequenzierung nach Sanger reproduzierbar sind, zumindest soweit die Sensitivität der Sequenzierung nach Sanger dies zulässt. Auch in der CLL-Forschung wurde NGS bereits erfolgreich eingesetzt. Durch Whole-Exome- und Whole-Genome-Sequencing (WES/WGS) konnten viele neue, vorher nicht mit CLL assoziierte Mutationen, darunter auch in *NOTCH1* und *FBXW7*, gefunden werden (Wang et al. 2011; Fabbri et al. 2011).

4.1.1 Vergleich NGS und Sanger-Sequenzierung

Next Generation Sequencing, insbesondere die Ampliconsequenzierung, hat im Vergleich zur Sequenzierung nach Sanger viele Vorteile. Da diese Methode allerdings noch relativ neu ist, gibt es einige Probleme, die gelöst werden müssen. Vorteile der Sequenzierung nach Sanger sind sicherlich die geringeren Anschaffungskosten der Geräte und die weltweite Verfügbarkeit dieser Methode, welche sich über Jahrzehnte bewährt hat.
Probleme bekommt die Ampliconsequenzierung zum Beispiel in GC-reichen Regionen, was bei *NOTCH1* der Fall ist. Hierdurch verringert sich die Sequenziertiefe der Exone erheblich. Entsprechend der Fragestellung steigen entweder die Kosten, falls die gleiche Sequenziertiefe erreicht werden soll oder aber man toleriert eine verringerte Sensitivität gegenüber subklonalen Mutationen.
Ein Vorteil der Ampliconsequenzierung ist unter anderem, dass anstatt des erforderlichen bakteriellen Klonens von DNA-Fragmenten die Herstellung von NGS-Bibliotheken in einem zellfreien System geschieht. Auch sind viel geringere Probenmengen erforderlich als bei der Sequenzierung nach Sanger. Zudem ist für die Sequenzierung nach Sanger eine höhere Reinheit der Proben nötig, da es sonst Probleme mit dem Hintergrund gibt und darunter die Sensitivität sehr stark leidet. Außerdem findet die Auswertung der durch die Sequenzierung gewonnenen Daten direkt statt, ohne dass eine Elektrophorese benötigt wird. Die Basenerkennung

erfolgt also parallel. Trotz der hohen Anschaffungskosten ist die Ampliconsequenzierung desselben DNA-Abschnitts bei hoher Auslastung auf Dauer kostengünstiger. So belaufen sich die Kosten für die Reagenzien zur Sequenzierung einer Probe auf Mutationen in 8 unterschiedlichen Genen, darunter *NOTCH1* und *FBXW7,* mittels NGS auf etwa 60 Euro. Auch der Arbeitsaufwand hält sich aufgrund der Parallelisierung in Grenzen: In 2 Tagen können 96 Proben für die Sequenzierung präpariert, in einem weiteren Tag sequenziert und weiteren 12 Stunden automatisch ausgewertet werden, wobei die manuelle Nachbearbeitung der Ausgabe noch nicht berücksichtigt ist. Dies entspricht pro Probe etwa 300 Sanger-Reaktionen, für die gesamte Platte mit 96 Patienten 28800 Reaktionen. Die automatisierte Auswertung durch eine Bioinformatic Pipeline erfolgt, wie schon im Kapitel 2.2.1 beschrieben, in einer vorgegebenen Reihenfolge: Indexing/Multiplexing- Demultiplexing- Alignment- Variant Calling- Annotation.

4.1.2 Detektion von *NOTCH1*-Mutationen und *FBXW7*-Mutationen

Die Sanger-Sequenzierung ist bei *NOTCH1-M*utationen sehr sicher und sensitiv. Dies liegt vor allem daran, dass die *NOTCH1*-Hotspotmutation P2514fs*, mit einem Anteil von über 80% an allen *NOTCH1*-Mutationen, eine Frameshift-Mutation ist. Im Gegensatz hierzu ist zu beachten, dass die Auswertung der Daten des NGS sehr anspruchsvoll ist und bei Unerfahrenheit sehr viel Zeit benötigt. Bei der initialen Etablierung benötigten insbesondere das für das Variant Calling genutzte Programm und die Justierung der Parameter einen entsprechenden Aufwand.

Anfangs hatte die in dieser Arbeit benutzte Pipeline des MiSeq Reporter 2.2.9 vor allem Probleme bei der Erkennung von Mutationen mit geringer Mutationsfraktion sowie von Insertionen und Deletionen (Malcikova et al. 2015). Die Erkennung eines Basenaustausches erfolgte, wie schon erwähnt, einwandfrei. Nach Softwarewechsel und Anpassungen der Filter wurden auch niedrigprozentige Mutationen zuverlässig aufgefunden und annotiert. Zur Sicherheit wurde der mittels NGS sequenzierte Exon34 Abschnitt bei allen Patienten zusätzlich manuell mit Hilfe des Integrative Genomic Viewer (Broad Institute) betrachtet. Trotz dieser Schwierigkeiten gab es in der vorliegenden Studie eine 100 % Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der Sanger-Sequenzierung und denen des NGS (dies allerdings vor dem Hintergrund einer 5 % Mutationsfraktionsgrenze im NGS). Da das NGS viel sensitiver als die Sanger-Sequenzierung ist, konnten hier zusätzliche

Mutationen mit einer Mutationsfraktion weit unter fünf Prozent gefunden werden. Die Validierung dieser Mutationen war mit der Sequenzierung nach Sanger allerdings nicht möglich, die Etablierung anderer sensitiver Methoden schied aus, da die Untersuchung primär auf die Nicht-Unterlegenheit von NGS gegenüber der Sequenzierung nach Sanger ausgelegt war. Somit kann keine Aussage über die Echtheit dieser niedrigprozentigen Mutationen gemacht werden, falsch positive Befunde sind nicht auszuschließen. Mittels quantitativer Echtzeit PCR könnten auch niedrigprozentige Mutationen validiert werden, so dass auch die Einfluss von kleinsten mutierten Subklonen auf den Krankheitsverlauf untersucht werden könnte. In einer 2014 mit NGS durchgeführten Studie wurde die Mutationsfraktionsgrenze, wie in dieser Arbeit, bei 5 % gesetzt (Luthra et al. 2014). Während in anderen Studien diese Grenze sogar bei 10 % - 33 % gezogen wurde (Luthra et al. 2014; Walsh et al. 2010; Sutton et al. 2015). In Lionetti et al. konnte aufgrund einer sensitiveren Bestätigungsmethode die Mutationsfraktionsgrenze bis auf 0,7 % herabgesetzt werden (Lionetti et al. 2014). Bei diesen Arbeiten lag die Übereinstimmung zwischen NGS und der Bestätigungsmethode, also die Spezifität und Sensitivität, bei 90-100 %. Die meisten Arbeiten, die NGS verwendeten, verzichteten allerdings auf eine untere Mutationsfraktionsgrenze und somit auf die komplette Validierung der NGS-Methode (Weissmann et al. 2013; Landau et al. 2013; Sikkema-Raddatz et al. 2013; Jethwa et al. 2013; Rossi et al. 2014). Aufgrund dem in der vorliegenden Arbeit und in weiteren Studien gefundenen sehr hohen positiven prädikativen Wert der verwendeten NGS-Methoden, vor allem der Amplicon-basierten gezielten Gensequenzierung, lässt sich die Möglichkeit der Abschaffung einer Mutationsfraktionsgrenze diskutieren. Dagegen sprechen neben der erhöhten Chance, falsch positiver Befunde zu erhalten, allerdings auch der unklare prognostische Wert subklonaler Mutationen. Zwar ist insbesondere für TP53 die klinische Relevanz von Mutationen mit niedriger Allelfrequenz beschrieben (Rossi et al. 2014; Malcikova et al. 2015). Allerdings fehlen insbesondere für *NOTCH1* und *SF3B1* qualitativ hochwertige Daten aus klinischen Studien. Dies führte zu zu einer fehlenden Empfehlung offizieller Forschungsgremien wie ERIC (European Research in CLL) für die Verwendung von kleinen subklonalen Mutationen.

Die Empfehlungen des ERIC betreffen nur Mutationsfraktionen von über 10 % (Pospisilova et al. 2016).

Bei *FBXW7* ist die Situation anders. Hier wurde in dieser Arbeit ein Screening aller kodierenden Exons durchgeführt. Außerdem sind bei *FBXW7* die Mutationen vorwiegend SNVs (Einzelnukleotid-Varianten). In dieser wie auch in anderen Studien gab es bei der Sequenzierung nach Sanger Probleme mit der Erkennung von SNVs (Thomas et al. 2006).
Auch bei den anderen Mutationen schneidet das NGS in der Erkennung nicht schlechter ab als die Methode nach Sanger.
Ein weiterer Schritt, der bisher nur teilweise durch die Software gemacht wird, ist die Annotation, also die Deutung des Einflusses der Mutation. Hier muss durch den Untersucher mittels Benutzung verschiedener Analysesoftware, welche im Kapitel 2.2.2 beschrieben wird, nachgeholfen werden.
Insgesamt sollte eine Einführung der Amplicon basierten gezielten Gensequenzierung oder anderer NGS-Systeme in die Mutationsdiagnostik erwogen werden. Vor allem bei den in dieser Studie untersuchten Genen *FBXW7* und *NOTCH1,* könnte in Zukunft auf eine Validierung des MiSeq durch eine weitere Methode verzichtet werden. Ob die Übereinstimmung der Sequenzierung nach Sanger und NGS auch bei anderen Genmutationen ähnlich hoch ist, sollte durch weitere Studien herausgefunden werden.

4.2 Auswertung der Daten von *NOTCH1* und *FBXW7*

Der Vergleich dieser Studie mit anderen Studien ist schwierig. Dafür gibt es verschiedene Gründe, deren wichtigste hier aufgeführt werden. In den meisten Untersuchungen wurden heterogene Patientenkohorten außerhalb klinischer Studien verwendet, viele davon mit unbehandelten Patienten ohne Therapieindikation. Daneben wurden Kohorten aus Patienten mit unterschiedlicher Therapie, unterschiedlichen Krankheitsstadien, aus vorbehandelten und therapienaiven, alten und jungen, fitten und komorbiden Patienten zusammengesetzt und diese Charakteristika bei der Auswertung nicht ausreichend berücksichtigt. Im Gegensatz hierzu gibt es in dieser Studie eine klar definierte Kohorte unbehandelter, älterer, komorbider Patienten mit Indikation zur Therapie. Das heißt, eine klar definierte Kohorte mit all den in der Studie erhobenen laborchemischen, genetischen und klinischen Daten in hoher Qualität. Ferner weicht die Anzahl der in der Studie aufgenommenen Patienten von anderen Studien meist ab. Auch wurden in den Vergleichsstudien oft unterschiedliche

Analysemethoden verwendet. Auf weitere, spezifischere Unterschiede wird in den einzelnen Abschnitten eingegangen.

4.2.1 Vergleich der Mutationshäufigkeiten

Um die in dieser Studie gefundenen Häufigkeit an *NOTCH1*-Mutationen mit 58 von 383 (15,1 %), mit einem Anteil der Hotspotmutation von 81 % zu vergleichen, sind am besten Studien anzuführen, in welchen derselbe Bereich des Gens sequenziert wurde, v.a. also WGS- bzw. WES-Projekte. Diese erlauben nicht nur die Beurteilung einzelner interessanter Genbereiche, sondern geben auch eine Auskunft über das gesamte Genom bzw. Exom. Hier wurden Häufigkeiten der *NOTCH1*-Mutationen von 12,6 % - 12,8 % gesehen. In diesen WES-Studien, in welchen *NOTCH1* komplett sequenziert wurde, konnten keine Mutationen in kodierenden Bereichen außerhalb des Exons 33 und 34 entdeckt werden (Puente et al. 2015, Landau et al. 2015). Daher sind Untersuchungen, wie in dieser Arbeit, welche sich auf die Exons 33 und 34 beschränken, stellvertretend für das komplette Gen für den *NOTCH1*-Status zulässig. Dass die Häufigkeit der *NOTCH1*-Mutationen in dieser Arbeit leicht über den anderen Studien liegt, kann zum einen, wie oben angeführt, an den unterschiedlichen Kohorten liegen, aber auch an der guten Sensitivität der Amplicon-basierten gezielten Gensequenzierung und der verwendeten Pipeline. Die Sequenziertiefe ist mit der Amplicon basierten Sequenzierung deutlich höher als mit WES insbesondere in Berücksichtigung der GC-reichen Region. Somit ist die Detektion von Mutationen mit niedriger Fraktion wahrscheinlicher. Zwischenzeitlich wurden in einer großen WES-Studie interessanterweise eine große Anzahl von nichtkodierenden Mutationen in *NOTCH1* gefunden. Der Effekt dieser nichtkodierenden Mutationen ist bislang noch unklar und wird noch erforscht (Puente et al. 2015)

Die in dieser Arbeit gefundene Mutationshäufigkeit von *FBXW7* entspricht mit 3,5 % den in anderen Arbeiten gefundenen Häufigkeiten von 1,1-4 % (Wang et al. 2011; Landau et al. 2015; Puente et al. 2015). Diese minimalen Unterschiede liegen vor allem am niedrigen Vorkommen dieser Mutation, wobei bereits einzelne zusätzliche Mutationen große Unterschiede in den Prozentzahlen bewirken.

4.2.2 Assoziationen der Mutationen

Interessanterweise zeigte sich eine gegenseitige Exklusivität zwischen del13q und +12q und assoziierten Mutationen. Während man mit del13q keine Assoziation sah, fand man, wie in den meisten bisherigen Studien, eine signifikante Korrelation von Trisomie 12 mit *NOTCH1*-Mutationen und *FBXW7*-Mutationen (Schnaiter et al. 2013; Stilgenbauer et al. 2014; Baliakis et al. 2015; Falisi et al. 2015). Dies bedeutet wahrscheinlich, dass beide Aberrationen voneinander unabhängige, mit der Tumorgenese assoziierte, klonale Ereignisse in der CLL sind. Weiterhin konnte eine Korrelation der Deletion von 17p mit Mutationen in *FBXW7* gefunden werden.

Unter den Mutationen, welche zur Korrelation zu Verfügung standen, ergab sich eine bisher unbeschriebene signifikante Assoziation von *NOTCH1*-Mutationen mit *POT1*-Mutationen und *BIRC3*-Mutationen. Im Gegensatz hierzu zeigte sich die gegenseitige Exklusivität von *NOTCH1*-Mutationen und Mutationen in *SF3B1* auch in anderen Studien und könnte auf unterschiedliche Pathomechanismen und auf mögliche verschiedene Klassen von Driver-Mutationen in der CLL schließen lassen (Schnaiter et al. 2013; Stilgenbauer et al. 2014).

Darüberhinaus lag eine Exklusivität von Mutationen in *TP53* und 17p-Deletion mit *NOTCH1*-Mutationen vor. Diese Anomalien sind mit einem Wachstumsvorteil und einer Akkumulation in vorbehandelter CLL assoziiert. Hieraus lässt sich schließen, dass entweder die Mutation von *TP53* oder die Mutation von *NOTCH1* ausreicht, einen klonalen Überlebensvorteil zu verursachen. Dies widerspricht der These, dass hier ein kooperativer Effekt besteht (Stilgenbauer et al. 2014; Jeromin et al. 2014).

Die, wie in anderen Arbeiten, fehlende signifikante Korrelation von *FBXW7*-Mutationen mit den untersuchten klinischen Parametern und anderen Mutationen, ist wahrscheinlich in der niedrigen Anzahl an vorkommenden Mutationen begründet (Wang et al. 2011; Jeromin et al. 2014).

Einer anderen Studienschlussfolgerung widersprechend, hatten 2 Patienten eine Mutation in *FBXW7* und *NOTCH1*, was eine gegenseitige Exklusivität dieser beiden Mutationen ausschließt (Puente et al. 2011).

4.2.5 Analyse des progressionsfreien Überleben (PFS) und des Gesamtüberleben (OS)

In der univariaten Analyse von *FBXW7* offenbarte sich kein statistisch signifikanter Einfluss auf das OS und das PFS, weder in Bezug auf die gesamte

Versuchspopulation, noch auf die einzelnen Therapiearme. Dies liegt, wie auch in einer anderen Studie begründet, wahrscheinlich an der zu niedrigen Mutationsfrequenz von *FBXW7* (Jeromin et al. 2014).

In der univariaten Analyse beider Therapiearme gemeinsam wurde die *NOTCH1*-Mutation als ein prognostischer Marker für ein kürzeres PFS identifiziert. Sie hat jedoch keinen Effekt auf das Gesamtüberleben. Außerdem hatte die *NOTCH1*-Mutation keinen Einfluss auf das Therapieansprechen, weder bei der CR noch der ORR. In der einzigen vergleichbaren Studie mit einer randomisierten, klar definierten Studienkohorte wurde ebenso das Therapieansprechen nicht beeinflusst, jedoch war hier in der univariaten Analyse das OS und PFS signifikant verkürzt (Oscier et al. 2013). In beiden Studien waren therapienaive Patienten eingeschlossen. Ein signifikanter Unterschied ist jedoch, dass in der vorliegenden Arbeit nur Patienten berücksichtigt wurden, welche für eine Fludarabine-Therapie aufgrund von Alter oder Komorbidität nicht in Frage kamen, welche also von Anfang an eine schlechtere Prognose hatten. Weitere Gründe für diesen Unterschied werden in Kapitel 4.4 beschrieben.

Wichtig ist es, für eine Krankheit unabhängige prognostische Faktoren zu finden. Da in den Vergleichsstudien jeweils unterschiedliche Parameter für die multivariable Analyse verwendet wurden, ist hier eine Gegenüberstellung schwierig. In der oben beschriebenen Arbeit mit einer vergleichbaren Studienkohorte wurde die *NOTCH1*-Mutation für das OS, nicht jedoch wie in dieser Arbeit für das PFS als unabhängiger prognostischer Marker identifiziert (Oscier et al. 2013). In der CLL8-Studie der DCLLSG zeigte sich die *NOTCH1*-Mutation in der Multivariaten-Analyse hinsichtlich des prognostischen Wertes für PFS und OS ohne Signifikanz (Stilgenbauer et al. 2014).

4.3 Die *NOTCH1*-Mutation als prädikativer Marker

Wie in den Ergebnissen beschrieben, lässt der Vergleich der Auswirkungen der *NOTCH1*-Mutation auf die beiden Behandlungsarme den Schluss zu, dass eine *NOTCH1*-Mutation ein prädiktiver Marker für einen verringerten Nutzen der zusätzlichen Gabe von Ofatumumab im O-Chl-Behandlungsarm ist. Während also Patienten ohne Mutation in *NOTCH1* von der Hinzunahme von Ofatumumab zu Chlorambucil profitieren, zeigt sie bei *NOTCH1* mutierten Patienten keinen Einfluss. Eine ähnliche Schlussfolgerung zogen auch die Autoren der CLL8-Studie. Diese ebenfalls zweiarmige Studie bestand aus einem Arm mit Fludarabin und

Cyclophosphamid (FC) und einem Arm, in dem zusätzlich Rituximab (FCR) gegeben wurde. Hierbei zeigte sich die Therapie mit FCR durch ein signifikant verlängertes PFS und OS überlegen. Jedoch brachte der Zusatz von Rituximab zu FC bei *NOTCH1*-mutierten Patienten keinen Anstieg im Therapieansprechen, im Ansprechen auf die minimale residuale Resterkrankung und keine Verbesserung des PFS und OS. In der CLL8-Studie war die *NOTCH1*-Mutation nur in dem FCR-Arm mit einem signifikant verkürzten PFS und einem Trend zu verschlechtertem OS assoziiert. Es wurde die These formuliert, dass die *NOTCH1*-Mutation ein prädiktiver Marker für einen verringerten Nutzen der zusätzlichen Gabe von Rituximab zu FC ist. In der CLL8-Studie wurde also die Interaktion von *NOTCH1*-Mutationen mit der Therapie als prognostischer Marker identifiziert und nicht die *NOTCH1*-Mutation an sich. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Behauptung aufgestellt werden, dass die *NOTCH1*-Mutation generell ein prädiktiver Marker für den verringerten Nutzen einer zusätzlichen Gabe von CD20-Antikörpern bei CLL-Patienten ist (Stilgenbauer et al. 2014).

Die Gründe, weshalb in allen bisherigen Studien, außer in der CLL8, *NOTCH1*-Mutationen als prognostischer Faktor, aber nicht als prädiktiver Faktor gefunden wurden, sind vielfältig. Vor allem liegt dies daran, dass in den anderen Studien die meisten Patienten mit Rituximab oder einem anderen CD20-Antikörper behandelt werden oder im Vorfeld behandelt wurden. In diesen Studien haben Patienten mit *NOTCH1*-Mutationen eine schlechtere Prognose. Hierbei war allerdings noch nicht klar, dass dies am CD20-Antikörper Rituximab liegen könnte. Eine Feststellung dieser Art war nur in einer randomisierten Studie mit zwei Therapiearmen möglich. Allein in solch einem Studiendesign kann herausgefunden werden, dass ein Parameter, wie die *NOTCH1*-Mutation, nicht prognostisch, sondern prädiktiv ist. Diese Studien sind aber selten, da eine zusätzliche Gabe von CD20-Antikörpern in der CLL zwischenzeitlich zum Standard gehört. In der einzigen Studie mit vergleichbarer Studienkohorte, der UK CLL4, war die *NOTCH1*-Mutation in der multivariaten Analyse nicht mit einem verkürzten PFS assoziiert. Der Grund dafür ist, dass in dieser Studie drei Therapiearme ohne Zusatz von CD20-Antikörpern miteinander verglichen wurden.

4.4 Schlussfolgerung

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Studiendesign erlaubt erstmalig, den in der CLL8-Studie beschriebenen prädiktiven Effekt zu validieren. Erneut zeigte sich im Therapiearm mit CD20-Antikörpern und nicht im Kontrollarm eine Verkürzung des PFS in der *NOTCH1*-mutierten Subgruppe. Wie in der CLL8-Studie war auch hier der CD20-Antikörper nur bei Patienten mit *NOTCH1*-Wildtyp mit einer Verlängerung des PFS assoziiert, nicht aber bei Patienten mit *NOTCH1*-Mutation. Im Gegensatz hierzu stehen Mutationen wie *SF3B1* und *TP53*. Diese haben bei einer ähnlichen oder sogar geringeren Mutationshäufigkeit einen klaren Effekt in beiden Therapiearmen und sind damit nicht prädiktiv wie die *NOTCH1*-Mutation.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der hier beschrieben prädiktive Effekt von *NOTCH1*-Mutationen nicht allein bei dem CD20-Antikörper Rituximab zu finden ist, sondern auch bei Ofatumumab, einem CD20-Antikörper mit anderem Wirkmechanismus, wie in der Einleitung beschrieben.

Die Ursache für diesen Effekt liegt bisher noch weitgehend im Dunkeln. In einer Studie, welche den Zusammenhang zwischen CD20 und *NOTCH1*-Mutationen untersucht hat, wurde kürzlich eine mögliche Erklärung gefunden. Hier wurde eine Assoziation von *NOTCH1*-mutierten CLL-Patienten mit einer verminderten CD20-Expression entdeckt (Pozzo et al. 2015). Eine weitere mögliche Ursache könnte eine verminderte komplementabhängige Zelltoxizität oder antikörperabhängige, zellvermittelte Zelltoxizität bei *NOTCH1*-mutierten Zellen sein. Es werden allerdings noch weitere Untersuchungen benötigt, um diesen Zusammenhang vollständig aufzuklären.

Es ist also wahrscheinlich egal, mit welchem Typ1-CD20-Antikörper therapiert wird. Der prädikative Effekt der *NOTCH1*-Mutation tritt generell bei allen auf. Anders verhält es sich bei Typ2-CD20-Antikörpern. Diese haben einen anderen Wirkmechanismus. Somit lässt sich noch keine Aussage darübermachen, ob dieser prädiktive Effekt auch bei Typ2-CD20-Antikörpern auftritt.

Die Bestätigung der CLL8-Studeinergebnisse liegt nun vor. Man könnte zukünftig vor einer Therapie den *NOTCH1*-Mutationsstatus mithilfe von NGS festlegen, um bei möglichen Nebenwirkungen von Typ1-CD20-Antikörpern ein sofortiges Absetzen zu ermöglichen, ohne einen größeren Nachteil für den Patienten fürchten zu müssen.

5. Zusammenfassung

Die chronische lymphatische Leukämie (CLL) ist die häufigste Leukämie der Erwachsenen in den Industrieländern. Dieses indolente Lymphom ist durch die klonale Akkumulation immuninkompetenter Cluster of Differentiation (CD)19- und CD20-positiver Lymphozyten im peripheren Blut gekennzeichnet. Durch die Einführung von Next-Generation-Sequencing (NGS) konnten in den letzten Jahren neue, mit der CLL bisher nicht assoziierte, Mutationen entdeckt werden.

Die Mutation von *FBXW7* gehört mit einer Häufigkeit von 2,5-4 % zu diesen Neuentdeckungen. Zudem ist eine der häufigsten unter den neu gefundenen Mutationen mit 4-18 % die Mutation des *NOTCH1*-Rezeptors. Sie wurde bisher meist mit einem klinisch ungünstigen Verlauf, einem verringerten progressionsfreien Überleben (PFS) und einem verringerten Gesamtüberleben (OS) assoziiert. In der CLL8-Studie der Deutschen-CLL-Studiengruppe konnte die *NOTCH1*-Mutation als prädikativer Faktor für einen verringerten Nutzen von Rituximab in Kombination mit Chemotherapie etabliert werden.

In der Studie COMPLEMENT1 von GlaxoSmithKline erhielt, randomisiert kontrolliert, jeweils die Hälfte von 383 Patienten entweder eine Monotherapie mit Chlorambucil (Clb) oder eine Kombination aus Clb und Ofatumumab. Von diesen Studienpatienten wurde mittels NGS der *NOTCH1*- und der *FBXW7*-Mutationsstatus ermittelt. Die gefundenen Mutationen wurden anschließend mittels der Sequenzierung nach Sanger validiert und ein Vergleich von NGS und der Methode nach Sanger erstellt. Alle mittels NGS gefundenen Mutationen über einer Mutationsfraktionsgrenze von 5 % konnten mit der Sequenzierung nach Sanger bestätigt werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das NGS der Sequenzierung nach Sanger in der Mutationsdetektion hinsichtlich der Spezifität mindestens ebenbürtig, bei Sensitivität von subklonalen Mutationen sogar überlegen ist und in diesem Bereich in Zukunft die neue Methode der Wahl sein wird.

Weiterhin wurde das unterschiedliche Ansprechen der Patienten mit Wildtyp und der mutierten Patienten auf die in dieser Studie verwendete Therapie untersucht.

Die ermittelte Mutationshäufigkeit von *NOTCH1* betrug 15,1 % (58/383), davon waren 81 % (47/58) Hotspot-Mutationen. Die Mutationshäufigkeit von *FBXW7* betrug 3,4 % (13/383). *NOTCH1*-Mutationen konnten mit weiblichem Geschlecht,

Trisomie 12 (+12q), Deletion (del)13q, einer unmutierten schweren Kette des Immunglobulins, *BIRC3*-Mutation und *POT1*-Mutation assoziiert werden. Außerdem schlossen sich *NOTCH1*-Mutationen und *SF3B1*-Mutationen gegenseitig aus. Für *FBXW7*-Mutationen fanden sich, außer mit del17p und +12q, keine signifikanten Assoziationen.

Die *NOTCH1*-Mutation korrelierte in der univariaten Analyse mit einem signifikant verkürzten PFS, nicht aber mit einem verkürzten OS. Allerdings beruht das verkürzte PFS ausschließlich auf dem Behandlungsarm mit Ofatumumab und Chlorambucil, während die *NOTCH1*-Mutation auf mit Chlorambucil behandelte Patienten keinen Einfluss hatte. Somit handelt es sich bei der *NOTCH1*-Mutation nicht um einen therapieunabhängigen prognostischen, sondern einen prädiktiven Marker, der mit der Therapie interagiert. Die *FBXW7*-Mutation zeigte keine signifikante Korrelation in der univariaten Analyse für PFS und OS. Weiterhin erwies sich, dass *NOTCH1*-Wildtyp-Patienten signifikant von der Kombination mit Ofatumumab profitierten, während bei *NOTCH1*-mutierten Patienten nur ein reduzierter Nutzen, welcher nicht signifikant war, beobachtet werden konnte. Bei *NOTCH1*-mutierten Patienten brachte die Kombination von Clb mit Ofatumumab also keinen signifikanten Vorteil gegenüber der Monotherapie mit Clb. Somit war es in dieser Arbeit möglich, die *NOTCH1*-Mutation als prädikativen Marker zu etablieren. Hierdurch konnte das Ergebnis der CLL8-Studie bestätigt werden. Darüber hinaus konnte herausgefunden werden, dass der prädiktive Effekt von *NOTCH1*-Mutationen nicht allein bei Verwendung des Typ1-CD20-Antikörpers Rituximab zu finden ist, sondern auch bei Ofatumumab, einem Typ1-CD20-Antikörper mit anderer Epitopbindungsstelle und etwas anderem Wirkmechanismus. Als Konsequenz aus diesen Ergebnissen empfiehlt sich die Bestimmung des *NOTCH1*-Mutationsstatus bei CLL-Patienten mit Therapieindikation. Bei Detektion einer Mutation sollten diese Patienten ähnlich wie Hochrisiko-Patienten mit neuen zielgerichteten Therapien oder Immunochemotherapien mit Typ2-CD20 Antikörpern behandelt werden.

6. Literaturverzeichnis

1. 1000 Genomes Project Consortium, Abecasis G R, Altshuler D, Auton A, Brooks L D, Durbin R M, Gibbs R A, Hurles M E, McVean G A: A map of human genome variation from population-scale sequencing. Nature, 467: 1061-1073 (2010)

2. Abbott B L: Chronic lymphocytic leukemia: Recent advances in diagnosis and treatment. Oncologist, 11: 21-30 (2006)

3. Akhoondi S, Sun D, von der Lehr N, Apostolidou S, Klotz K, Maljukova A, Cepeda D, Fiegl H, Dafou D, Marth C, Mueller-Holzner E, Corcoran M, Dagnell M, Nejad S Z, Nayer B N, Zali M R, Hansson J, Egyhazi S, Petersson F, Sangfelt P, Nordgren H, Grander D, Reed S I, Widschwendter M, Sangfelt O, Spruck C: FBXW7/hCDC4 is a general tumor suppressor in human cancer. Cancer research, 67: 9006-9012 (2007)

4. Bai C, Sen P, Hofmann K, Ma L, Goebl M, Harper J W, Elledge S J: SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. Cell, 86: 263-274 (1996)

5. Baliakas P, Hadzidimitriou A, Sutton L A, Rossi D, Minga E, Villamor N, Larrayoz M, Kminkova J, Agathangelidis A, Davis Z, Tausch E, Stalika E, Kantorova B, Mansouri L, Scarfo L, Cortese D, Navrkalova V, Rose-Zerilli M 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, European Research Initiative on CLL (ERIC): Recurrent mutations refine prognosis in chronic lymphocytic leukemia. Leukemia, 29: 329-336 (2015)

6. Begleiter A, Mowat M, Israels LG, Johnston JB: Chlorambucil in chronic lymphocytic leukemia: mechanism of action. Leukemia & lymphoma, 23: 187-201 (1996)

7. Behjati S, Tarpey PS: What is next generation sequencing? Archives of Disease in Childhood. Education & Practice, 98: 236-238 (2013)

8. Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, Smith GP, Milton J, Brown CG, Hall KP, Evers DJ, Barnes CL, Bignell HR, Boutell JM, Bryant J, Carter RJ, Keira Cheetham R, Cox AJ, Ellis DJ, Flatbush MR, Gormley NA, Humphray SJ, Irving LJ, Karbelashvili MS, Kirk SM, Li H, Liu X, Maisinger KS, Murray LJ, Obradovic B, Ost T, Parkinson ML, Pratt MR, Rasolonjatovo IM, Reed MT, Rigatti R, Rodighiero C,

Ross MT, Sabot A, Sankar SV, Scally A, Schroth GP, Smith ME, Smith VP, Spiridou A, Torrance PE, Tzonev SS, Vermaas EH, Walter K, Wu X, Zhang L, Alam MD, Anastasi C, Aniebo IC, Bailey DM, Bancarz IR, Banerjee S, Barbour SG, Baybayan PA, Benoit VA, Benson KF, Bevis C, Black PJ, Boodhun A, Brennan JS, Bridgham JA, Brown RC, Brown AA, Buermann DH, Bundu AA, Burrows JC, Carter NP, Castillo N, Chiara E Catenazzi M, Chang S, Neil Cooley R, Crake NR, Dada OO, Diakoumakos KD, Dominguez-Fernandez B, Earnshaw DJ, Egbujor UC, Elmore DW, Etchin SS, Ewan MR, Fedurco M, Fraser LJ, Fuentes Fajardo KV, Scott Furey W, George D, Gietzen KJ, Goddard CP, Golda GS, Granieri PA, Green DE, Gustafson DL, Hansen NF, Harnish K, Haudenschild CD, Heyer NI, Hims MM, Ho JT, Horgan AM, Hoschler K, Hurwitz S, Ivanov DV, Johnson MQ, James T, Huw Jones TA, Kang GD, Kerelska TH, Kersey AD, Khrebtukova I, Kindwall AP, Kingsbury Z, Kokko-Gonzales PI, Kumar A, Laurent MA, Lawley CT, Lee SE, Lee X, Liao AK, Loch JA, Lok M, Luo S, Mammen RM, Martin JW, McCauley PG, McNitt P, Mehta P, Moon KW, Mullens JW, Newington T, Ning Z, Ling Ng B, Novo SM, O'Neill MJ, Osborne MA, Osnowski A, Ostadan O, Paraschos LL, Pickering L, Pike AC, Pike AC, Chris Pinkard D, Pliskin DP, Podhasky J, Quijano VJ, Raczy C, Rae VH, Rawlings SR, Chiva Rodriguez A, Roe PM, Rogers J, Rogert Bacigalupo MC, Romanov N, Romieu A, Roth RK, Rourke NJ, Ruediger ST, Rusman E, Sanches-Kuiper RM, Schenker MR, Seoane JM, Shaw RJ, Shiver MK, Short SW, Sizto NL, Sluis JP, Smith MA, Ernest Sohna Sohna J, Spence EJ, Stevens K, Sutton N, Szajkowski L, Tregidgo CL, Turcatti G, Vandevondele S, Verhovsky Y, Virk SM, Wakelin S, Walcott GC, Wang J, Worsley GJ, Yan J, Yau L, Zuerlein M, Rogers J, Mullikin JC, Hurles ME, McCooke NJ, West JS, Oaks FL, Lundberg PL, Klenerman D, Durbin R, Smith AJ: Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. Nature, 456: 53-59 (2008)

9. 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)

10. Bland J M, Altman D G: The logrank test. British Medical Journal, 328: 1073 (2004)

11. Byrd J C, Brown J R, O'Brien S, Barrientos J C, Kay N E, Reddy N M, Coutre S, Tam C S, Mulligan S P, Jaeger U, Devereux S, Barr P M, Furman R R, Kipps T J, Cymbalista F, Pocock C, Thornton P, Caligaris-Cappio F, Robak T, Delgado J, Schuster S J, Montillo M, Schuh A, de Vos S, Gill D, Bloor A, Dearden C, Moreno C, Jones J J, Chu A D, Fardis M, McGreivy J, Clow F, James D F, Hillmen P: Ibrutinib versus Ofatumumab in previously treated Chronic Lymphoid Leukemia. New England Journal of Medicine, 371: 213-223 (2014)

12. Collins F S, Hamburg M A: First FDA Authorization for Next-Generation Sequencer. New England Journal of Medicine, 369: 2369-2371 (2013)

13. Cox D R: Regression Models and Life-Tables. Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological), 34: 187-220 (1972)

14. Cunningham F, Amode M R, Barrell D, Beal K, Billis K, Brent S, Carvalho-Silva D, Clapham P, Coates G, Fitzgerald S, Gil L, Girón C G, Gordon L, Hourlier T, Hunt S E, Janacek S H, Johnson N, Juettemann T, Kähäri A K, Keenan S, Martin F J, Maurel T, McLaren W, Murphy D N, Nag R, Overduin B, Parker A, Patricio M, Perry E, Pignatelli M, Riat H S, Sheppard D, Taylor K, Thormann A, Vullo A, Wilder S P, Zadissa A, Aken B L, Birney E, Harrow J, Kinsella R, Muffato M, Ruffier M, Searle S M J, Spudich G, Trevanion S J, Yates A, Zerbino D R, Flicek P: Ensembl 2015. Nucleic Acids Research. 2016;44 (Database issue): D710-D716 (2015)

15. 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)

16. Delgado J, Pratt G, Phillips N, Briones J, Fegan C, Nomdedeu J, Pepper C, Aventin A, Ayats R, Brunet S, Martino R, Valcarcel D, Milligan D, Sierra J: Beta2-microglobulin is a better predictor of treatment-free survival in patients with chronic lymphocytic leukaemia if adjusted according to glomerular filtration rate. British journal of haematology, 145: 801-805 (2009)

17. Demarest R M, Ratti F, Capobianco A J: It's T-ALL about Notch. Oncogene, 27: 5082-5091 (2008)

18. Döhner H, Fischer K, Bentz M, Hansen K, Benner A, Cabot G, Diehl D, Schlenk R, Coy J, Stilgenbauer S: p53 gene deletion predicts for poor survival and non-

response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. Blood, 85: 1580-1589 (1995)
19. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, Dohner K, Bentz M, Lichter P: Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. New England Journal of Medicine, 343: 1910-1916 (2000)
20. 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)
21. Dou S, Zeng X, Cortes P, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Honjo T, Vales L D: The recombination signal sequence-binding protein RBP-2N functions as a transcriptional repressor. Molecular & Cellular Biology, 14: 3310-3319 (1994)
22. Dreger P, Dohner H, Ritgen M, Bottcher S, Busch R, Dietrich S, Bunjes D, Cohen S, Schubert J, Hegenbart U, Beelen D, Zeis M, Stadler M, Hasenkamp J, Uharek L, Scheid C, Humpe A, Zenz T, Winkler D, Hallek M, Kneba M, Schmitz N, Stilgenbauer S, German CLL Study Group: Allogeneic stem cell transplantation provides durable disease control in poor-risk chronic lymphocytic leukemia: long-term clinical and MRD results of the German CLL Study Group CLL3X trial. Blood, 116: 2438-2447 (2010)
23. Eichhorst B, Hallek M: Prognostication of chronic lymphocytic leukemia in the era of new agents. American Society of Hematology Education Program, 2016: 149-155 (2016)
24. 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, Foa R, Pasqualucci L, Rabadan R, Dalla-Favera R, Gaidano G: Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. Journal of Experimental Medicine, 208: 1389-1401 (2011)
25. Falisi E, Novella E, Visco C, Guercini N, Maura F, Giaretta I, Pomponi F, Nichele I, Finotto S, Montaldi A, Neri A, Rodeghiero F: B-cell receptor configuration and mutational analysis of patients with chronic lymphocytic leukaemia and trisomy 12 reveal recurrent molecular abnormalities. Hematological oncology, 32: 22-30 (2014)

26. Flanagan SE, Patch AM, Ellard S: Using SIFT and PolyPhen to predict loss-of-function and gain-of-function mutations. Genetic Testing & Molecular Biomarkers, 14: 533-537 (2010)

27. Forbes S A, Beare D, Gunasekaran P, Leung K, Bindal N, Boutselakis H, Ding M, Bamford S, Cole C, Ward S, Kok C Y, Jia M, De T, Teague J W, Stratton M R, McDermott U, Campbell P J: COSMIC: Exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. Nucleic acids research, 43: D805-D811 (2015)

28. Fryer C J, White J B, Jones K A: Mastermind recruits CycC:CDK8 to phosphorylate the Notch ICD and coordinate activation with turnover. Molecular cell, 16: 509-520 (2004)

29. Furman R R, Sharman J P, Coutre S E, Cheson B D, Pagel J M, Hillmen P, Barrientos J C, Zelenetz A D, Kipps T J, Flinn I, Ghia P, Eradat H, Ervin T, Lamanna N, Coiffier B, Pettitt A R, Ma S, Stilgenbauer S, Cramer P, Aiello M, Johnson D M, Miller L L, Li D, Jahn T M, Dansey R D, Hallek M, O'Brien S M: Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. New England Journal of Medicine, 370: 997-1007 (2014)

30. Gianfelici V: Activation of the NOTCH1 pathway in chronic lymphocytic leukemia. Haematologica, 97: 328-330 (2012)

31. Goede V, Fischer K, Busch R, Engelke A, Eichhorst B, Wendtner C M, Chagorova T, de l S, 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. New England Journal of Medicine, 370: 1101-1110 (2014)

32. Goldin L R, Bjorkholm M, Kristinsson S Y, Turesson I, Landgren O: Elevated risk of chronic lymphocytic leukemia and other indolent non-Hodgkin's lymphomas among relatives of patients with chronic lymphocytic leukemia. Haematologica, 94: 647-653 (2009)

33. Goldin L R, Slager S L: Familial CLL: Genes and environment. Hematology, 339-345 (2007)

34. Gordon W R, Vardar-Ulu D, Histen G, Sanchez-Irizarry C, Aster J C, Blacklow S C: Structural basis for autoinhibition of Notch. Nature Structural & Molecular Biology, 14: 295-300 (2007)

35. Gravanis I, Ersboll J, Skovlund E, Abadie E, Marty M, Pignatti F: The European medicines agency review of ofatumumab (Arzerra) for the treatment of chronic lymphocytic leukemia in patients refractory to fludarabine and alemtuzumab: Summary of the scientific assessment of the European medicines agency committee for medicinal products for human use. Oncologist, 15: 1335-1343 (2010)
36. Hallek M: Chronic lymphocytic leukemia: 2015 Update on diagnosis, risk stratification, and treatment. American Journal of Hematology, 90: 446-460 (2015)
37. Hallek M, Cheson B D, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, Hillmen P, Keating M J, Montserrat E, Rai K R, Kipps T J: International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia : Guidelines for the diagnosis and treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia: A report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. Blood, 111: 5446-5456 (2008)
38. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, Fink A M, Busch R, Mayer J, Hensel M, Hopfinger G, Hess G, von Grunhagen U, Bergmann M, Catalano J, Zinzani P L, Caligaris-Cappio F, Seymour J F, Berrebi A, Jager U, Cazin B, Trneny M, Westermann A, Wendtner C M, Eichhorst B F, Staib P, Buhler A, Winkler D, Zenz T, Bottcher S, Ritgen M, Mendila M, Kneba M, Dohner H, Stilgenbauer S, International Group of I, German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group: Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukemia: A randomised, open-label, phase 3 trial. Lancet, 376: 1164-1174 (2010)
39. Hallek M, Pflug N: State of the art treatment of chronic lymphocytic leukemia. Blood reviews, 25: 1-9 (2011)
40. 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)
41. Hamidi H, Gustafason D, Pellegrini M, Gasson J: Identification of novel targets of CSL-dependent Notch signaling in hematopoiesis. Public library of Science ONE, 6: e20022 (2011)
42. Hillmen P, Robak T, Janssens A, Babu K G, Kloczko J, Grosicki S, Doubek M, Panagiotidis P, Kimby E, Schuh A, Pettitt A R, Boyd T, Montillo M, Gupta I V, Wright O, Dixon I, Carey J L, Chang C N, Lisby S, McKeown A, Offner F, COMPLEMENT 1 Study Investigators: Chlorambucil plus ofatumumab versus chlorambucil alone in

previously untreated patients with chronic lymphocytic leukaemia (COMPLEMENT 1): A randomised, multicentre, open-label phase 3 trial. Lancet, 385: 1873-1883 (2015)

43. Ho M S, Tsai P I, Chien C T: F-box proteins: The key to protein degradation. Journal of Biomedical Science, 13: 181-191 (2006)

44. International Human Genome Sequencing C: Finishing the euchromatic sequence of the human genome. Nature, 431: 931-945 (2004)

45. Jadayel D M, Lukas J, Nacheva E, Bartkova J, Stranks G, De Schouwer P J, Lens D, Bartek J, Dyer M J, Kruger A R, Catovsky D: Potential role for concurrent abnormalities of the cyclin D1, p16CDKN2 and p15CDKN2B genes in certain B cell non-Hodgkin's lymphomas. Functional studies in a cell line (Granta 519). Leukemia, 11: 64-72 (1997)

46. Jeromin S, Weissmann S, Haferlach C, Dicker F, Bayer K, Grossmann V, Alpermann T, Roller A, Kohlmann A, Haferlach T, Kern W, Schnittger S: SF3B1 mutations correlated to cytogenetics and mutations in NOTCH1, FBXW7, MYD88, XPO1 and TP53 in 1160 untreated CLL patients. Leukemia, 28: 108-117 (2014)

47. Jethwa A, Hullein J, Stolz T, Blume C, Sellner L, Jauch A, Sill M, Kater A P, te Raa G D, Geisler C, van Oers M, Dietrich S, Dreger P, Ho A D, Paruzynski A, Schmidt M, von Kalle C, Glimm H, Zenz T: Targeted resequencing for analysis of clonal composition of recurrent gene mutations in chronic lymphocytic leukaemia. British journal of haematology, 163: 496-500 (2013)

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

49. Kipps T J, Stevenson F K, Wu C J, Croce C M, Packham G, Wierda W G, O'Brien S, Gribben J, Rai K: Chronic lymphocytic leukaemia. 3: 16096 (2017)

50. Klein C, Lammens A, SchÃ¤fer W, Georges G, Schwaiger M, Mössner E, Hopfner K, Umata P, Niederfellner G: Epitope interactions of monoclonal antibodies targeting CD20 and their relationship to functional properties. Monoclonal Antibodies, 5: 22-33 (2013)

51. Knuutila S, Aalto Y, Autio K, Bjorkqvist A M, El-Rifai W, Hemmer S, Huhta T, Kettunen E, Kiuru-Kuhlefelt S, Larramendy M L, Lushnikova T, Monni O, Pere H, Tapper J, Tarkkanen M, Varis A, Wasenius V M, Wolf M, Zhu Y: DNA copy number losses in human neoplasms. American Journal of Pathology, 155: 683-694 (1999)

52. Landau DA, Carter SL, Stojanov P, McKenna A, Stevenson K, Lawrence MS, Sougnez C, Stewart C, Sivachenko A, Wang L, Wan Y, Zhang W, Shukla SA, Vartanov A, Fernandes SM, Saksena G, Cibulskis K, Tesar B, Gabriel S, Hacohen N, Meyerson M, Lander ES, Neuberg D, Brown JR, Getz G, Wu CJ: Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. Cell, 152: 714-726 (2013)

53. Landau D A, Tausch E, Taylor-Weiner A, Stewart C, Reiter J G, Bahlo J, Kluth S, Bozic I, Lawrence M, Bottcher S, Carter S L, Cibulskis K, Mertens D, Sougnez C L, Rosenberg M, Hess J M, Edelmann J, Kless S, Kneba M, Ritgen M, Fink A, Fischer K, Gabriel S, Lander E S, Nowak M A, Dohner 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)

54. Lemery S J, Zhang J, Rothmann M D, Yang J, Earp J, Zhao H, McDougal A, Pilaro A, Chiang R, Gootenberg J E, Keegan P, Pazdur R: U.S. Food and Drug Administration approval: Ofatumumab for the treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia refractory to fludarabine and alemtuzumab. Clinical Cancer Research, 16: 4331-4338 (2010)

55. Li H, Durbin R: Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. Bioinformatics, 25: 1754-1760 (2009)

56. Lionetti M, Fabris S, Cutrona G, Agnelli L, Ciardullo C, Matis S, Ciceri G, Colombo M, Maura F, Mosca L, Gentile M, Recchia A G, Ilariucci F, Musolino C, Molica S, Di Raimondo F, Cortelezzi A, Rossi D, Gaidano G, Morabito F, Ferrarini M, Neri A: High-throughput sequencing for the identification of NOTCH1 mutations in early stage chronic lymphocytic leukaemia: Biological and clinical implications. British journal of haematology, 165: 629-639 (2014)

57. 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)

58. Luthra R, Patel KP, Reddy NG, Haghshenas V, Routbort MJ, Harmon MA, Barkoh BA, Kanagal-Shamanna R, Ravandi F, Cortes JE, Kantarjian HM, Medeiros LJ, Singh RR: Next-generation sequencing-based multigene mutational screening for acute myeloid leukemia using MiSeq: Applicability for diagnostics and disease monitoring. Haematologica, 99: 465-473 (2014)

59. 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)

60. Maloney D G, Grillo-Lopez A J, White C A, Bodkin D, Schilder R J, Neidhart J A, Janakiraman N, Foon K A, Liles T M, Dallaire B K, Wey K, Royston I, Davis T, Levy R: IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. Blood, 90: 2188-2195 (1997)

61. Marti G, Abbasi F, Raveche E, Rawstron A C, Ghia P, Aurran T, Caporaso N, Shim Y K, Vogt R F: Overview of monoclonal B-cell lymphocytosis. British journal of haematology, 139: 701-708 (2007)

62. McLaren W, Pritchard B, Rios D, Chen Y, Flicek P, Cunningham F: Deriving the consequences of genomic variants with the Ensembl API and SNP Effect Predictor. Bioinformatics, 26: 2069-2070 (2010)

63. Mehta C, Patel N: Algorithm 643. FEXACT: a FORTRAN subroutine for Fisher’s exact test on unordered rxc contingency tables. ACM Transactions on Mathematical Software. 12(2):154-161 (1986)

64. Montillo M, Hamblin T, Hallek M, Montserrat E, Morra E: Chronic lymphocytic leukemia: novel prognostic factors and their relevance for risk-adapted therapeutic strategies. Haematologica, 90: 391-399 (2005)

65. Moreau E J, Matutes E, A'Hern R P, Morilla A M, Morilla R M, Owusu-Ankomah K A, Seon B K, Catovsky D: Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). American Journal of Clinical Pathology, 108: 378-382 (1997)

66. Nam Y, Sliz P, Song L, Aster J C, Blacklow S C: Structural basis for cooperativity in recruitment of MAML coactivators to Notch transcription complexes. Cell, 124: 973-983 (2006)

67. Oberg C, Li J, Pauley A, Wolf E, Gurney M, Lendahl U: The Notch Intracellular Domain is
ubiquitinated and negatively regulated by the Mammalian Sel-10 Homolog. Journal of Biological Chemistry, 276: 35847-35853 (2001)

68. O'Neil J, Grim J, Strack P, Rao S, Tibbitts D, Winter C, Hardwick J, Welcker M, Meijerink J P, Pieters R, Draetta G, Sears R, Clurman B E, Look A T: FBW7 mutations in leukemic cells mediate NOTCH pathway activation and resistance to

gamma-secretase inhibitors. Journal of Experimental Medicine, 204: 1813-1824 (2007)

69. Orlicky S, Tang X, Willems A, Tyers M, Sicheri F: Structural basis for phosphodependent substrate selection and orientation by the SCFCdc4 ubiquitin ligase. Cell, 112: 243-256 (2003)

70. Oscier D G, Rose-Zerilli M J, Winkelmann N, Gonzalez de Castro D, Gomez B, Forster J, Parker H, Parker A, Gardiner A, Collins A, Else M, Cross N C, 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. Pospisilova S, Sutton L, Malcikova J, Tausch E, Rossi D, Montserrat E, Moreno C, Stamatopoulos K, Gaidano G, Rosenquist R, Ghia P: Innovation in the prognostication of chronic lymphocytic leukemia: How far beyond *TP53* gene analysis can we go? Haematologica, 101: 263-265 (2016)

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 (2015)

73. Puente X S, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordonez G R, Villamor N, Escaramis G, Jares P, Bea S, Gonzalez-Diaz M, Bassaganyas L, Baumann T, Juan M, Lopez-Guerra M, Colomer D, Tubio J M, Lopez C, Navarro A, Tornador C, Aymerich M, Rozman M, Hernandez J M, Puente D A, Freije J M, Velasco G, Gutierrez-Fernandez A, Costa D, Carrio A, Guijarro S, Enjuanes A, Hernandez L, Yague J, Nicolas P, Romeo-Casabona C M, Himmelbauer H, Castillo E, Dohm J C, de Sanjose S, Piris M A, de Alava E, San Miguel J, Royo R, Gelpi J L, Torrents D, Orozco M, Pisano D G, Valencia A, Guigo R, Bayes 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, Lopez-Guillermo A, Estivill X, Montserrat E, Lopez-Otin C, Campo E: Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. Nature, 475: 101-105 (2011)

74. Puente X S, Bea S, Valdes-Mas R, Villamor N, Gutierrez-Abril J, Martin-Subero J, 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, 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, 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)

75. Radtke F, Wilson A, Mancini S J, MacDonald H R: Notch regulation of lymphocyte development and function. Nature immunology, 5: 247-253 (2004)

76. Rai K R, Montserrat E: Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia. Seminars in hematology, 24: 252-256 (1987)

77. 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)

78. Rawstron A C, Green M J, Kuzmicki A, Kennedy B, Fenton J A, Evans P A, O'Connor S J, Richards S J, Morgan G J, Jack A S, Hillmen P: Monoclonal B lymphocytes with the characteristics of "indolent" chronic lymphocytic leukemia are present in 3.5% of adults with normal blood counts. Blood, 100: 635-639 (2002)

79. Rebay I, Fleming R J, Fehon R G, Cherbas L, Cherbas P, Artavanis-Tsakonas S: Specific EGF repeats of Notch mediate interactions with Delta and Serrate: Implications for Notch as a multifunctional receptor. Cell, 67: 687-699 (1991)

80. Riley J K, Sliwkowski M X: CD20: a gene in search of a function. Seminars in oncology, 27: 17-24 (2000)

81. Robinson J T, Thorvaldsdottir H, Winckler W, Guttman M, Lander E S, Getz G, Mesirov J P: Integrative genomics viewer. Nature biotechnology, 29: 24-26 (2011)

82. Rossi D, Khiabanian H, Spina V, Ciardullo C, Bruscaggin A, Fama R, Rasi S, Monti S, Deambrogi C, De Paoli L, Wang J, Gattei V, Guarini A, Foa R, Rabadan R, Gaidano G: Clinical impact of small TP53 mutated subclones in chronic lymphocytic leukemia. Blood, 123: 2139-2147 (2014)

83. Rossi D, Bruscaggin A, Spina V, Rasi S, Khiabanian H, Messina M, Fangazio M, Vaisitti T, Monti S, Chiaretti S, Guarini A, Del Giudice I, Cerri M, Cresta S, Deambrogi C, Gargiulo E, Gattei V, Forconi F, Bertoni F, Deaglio S, Rabadan R, Pasqualucci L, Foa R, Dalla-Favera R, Gaidano G: Mutations of the SF3B1 splicing

factor in chronic lymphocytic leukemia: Association with progression and fludarabine-refractoriness. Blood, 118: 6904-6908 (2011)
84. Rummel M: Diagnosis and treatment of chronic lymphatic leukemia. Onkologe, 8: 708-720 (2002)
85. Salvi F, Miller M D, Grilli A, Giorgi R, Towers A L, Morichi V, Spazzafumo L, Mancinelli L, Espinosa E, Rappelli A, Dessi-Fulgheri P: A manual of guidelines to score the modified cumulative illness rating scale and its validation in acute hospitalized elderly patients. Journal of the American Geriatrics Society, 56: 1926-1931 (2008)
86. Sanchez-Irizarry C, Carpenter A C, Weng A P, Pear W S, Aster J C, Blacklow S C: Notch subunit heterodimerization and prevention of ligand-independent proteolytic activation depend, respectively, on a novel domain and the LNR repeats. Molecular & Cellular Biology, 24: 9265-9273 (2004)
87. Sanger F, Nicklen S, Coulson A R: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74: 5463-5467 (1977)
88. Sarfati M, Chevret S, Chastang C, Biron G, Stryckmans P, Delespesse G, Binet J L, Merle-Beral H, Bron D: Prognostic importance of serum soluble CD23 level in chronic lymphocytic leukemia. Blood, 88: 4259-4264 (1996)
89. Schnaiter A, Paschka P, Rossi M, Zenz T, Buhler A, Winkler D, Cazzola M, Dohner 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)
90. Schroeter E H, Kisslinger J A, Kopan R: Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. Nature, 393: 382-386 (1998)
91. Sherry S T, Ward M, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski E M, Sirotkin K: dbSNP: The NCBI database of genetic variation. Nucleic acids research, 29: 308-311 (2000)
92. Sikkema-Raddatz B, Johansson LF, de Boer EN, Almomani R, Boven LG, van den Berg MP, van Spaendonck-Zwarts KY, van Tintelen JP, Sijmons RH, Jongbloed JD, Sinke RJ: Targeted next-generation sequencing can replace Sanger sequencing in clinical diagnostics. Human mutation, 34: 1035-1042 (2013)

93. Stacchini A, Aragno M, Vallario A, Alfarano A, Circosta P, Gottardi D, Faldella A, Rege-Cambrin G, Thunberg U, Nilsson K, Caligaris-Cappio F: MEC1 and MEC2: two new cell lines derived from B-chronic lymphocytic leukaemia in prolymphocytoid transformation. Leukemia research, 23: 127-136 (1999)
94. Stilgenbauer S, Schnaiter A, Paschka P, Zenz T, Rossi M, Dohner K, Buhler A, Bottcher S, Ritgen M, Kneba M, Winkler D, Tausch E, Hoth P, Edelmann J, Mertens D, Bullinger L, Bergmann M, Kless S, Mack S, Jager 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, Dohner H: Gene mutations and treatment outcome in chronic lymphocytic leukemia: Results from the CLL8 trial. Blood, 123: 3247-3254 (2014)
95. Sutton L A, Ljungstrom 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)
96. Tan Y, Sangfelt O, Spruck C: The Fbxw7/hCdc4 tumor suppressor in human cancer. Cancer letters, 271: 1-12 (2008)
97. Tausch E, Stilgenbauer S: Chronic lymphocytic leukemia: Current standards and novel approaches. Der Internist, 55: 1400, 1402-4, 1406-9 (2014)
98. Teeling J L, French R R, Cragg M S, van den Brakel J, Pluyter M, Huang H, Chan C, Parren P W, Hack C E, Dechant M, Valerius T, van de Winkel J G, Glennie M J: Characterization of new human CD20 monoclonal antibodies with potent cytolytic activity against non-Hodgkin lymphomas. Blood, 104: 1793-1800 (2004)
99. Thomas RK, Nickerson E, Simons JF, Janne PA, Tengs T, Yuza Y, Garraway LA, LaFramboise T, Lee JC, Shah K, O'Neill K, Sasaki H, Lindeman N, Wong KK, Borras AM, Gutmann EJ, Dragnev KH, DeBiasi R, Chen TH, Glatt KA, Greulich H, Desany B, Lubeski CK, Brockman W, Alvarez P, Hutchison SK, Leamon JH, Ronan MT, Turenchalk GS, Egholm M, Sellers WR, Rothberg JM, Meyerson M: Sensitive mutation detection in heterogeneous cancer specimens by massively parallel picoliter reactor sequencing. Nature medicine, 12: 852-855 (2006)
100. Thompson B J, Jankovic V, Gao J, Buonamici S, Vest A, Lee J M, Zavadil J, Nimer S D, Aifantis I: Control of hematopoietic stem cell quiescence by the E3 ubiquitin ligase Fbw7. Journal of Experimental Medicine, 205: 1395-1408 (2008)

101. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth B C, Remm M, Rozen S G: Primer3--new capabilities and interfaces. Nucleic acids research, 40: e115 (2012)
102. van Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, Thermes C: Ten years of next-generation sequencing technology. Trends in Genetics, 30: 418-426 (2014)
103. Walsh T, Lee M K, Casadei S, Thornton A M, Stray S M, Pennil C, Nord A S, Mandell J B, Swisher E M, King M C: Detection of inherited mutations for breast and ovarian cancer using genomic capture and massively parallel sequencing. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107: 12629-12633 (2010)
104. Wang L, Lawrence M S, Wan Y, Stojanov P, Sougnez C, Stevenson K, Werner L, Sivachenko A, DeLuca D S, Zhang L, Zhang W, Vartanov A R, Fernandes S M, Goldstein N R, Folco E G, Cibulskis K, Tesar B, Sievers Q L, Shefler E, Gabriel S, Hacohen N, Reed R, Meyerson M, Golub T R, Lander E S, Neuberg D, Brown J R, Getz G, Wu C J: SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. New England Journal of Medicine, 365: 2497-2506 (2011)
105. Weissmann S, Roller A, Jeromin S, Hernandez M, Abaigar M, Hernandez-Rivas JM, Grossmann V, Haferlach C, Kern W, Haferlach T, Schnittger S, Kohlmann A: Prognostic impact and landscape of NOTCH1 mutations in chronic lymphocytic leukemia (CLL): A study on 852 patients. Leukemia, 27: 2393-2396 (2013)
106. Welcker M, Clurman B E: FBW7 ubiquitin ligase: A tumour suppressor at the crossroads of cell division, growth and differentiation. Nature Reviews.Cancer, 8: 83-93 (2008)
107. Wendtner C, Dreger P, Gregor M, Greil R, Knauf W, Pritzkuleit R, Schetelig J, Steurer M and Stilgenbauer S. Chronische Lymphatische Leukämie (CLL)- Leitlinie (2017): https://www.dgho-onkopedia.de/de/onkopedia/leitlinien/cll (20.08.2017)
108. Weng A P, Ferrando A A, Lee W, Morris J P,4th, 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: 269-271 (2004)
109. Wierda W G, Kipps T J, Mayer J, Stilgenbauer S, Williams C D, Hellmann A, Robak T, Furman R R, Hillmen P, Trneny M, Dyer M J, Padmanabhan S, Piotrowska M, Kozak T, Chan G, Davis R, Losic N, Wilms J, Russell C A, Osterborg A, Hx-CD20-406 Study I: Ofatumumab as single-agent CD20 immunotherapy in

fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia. Journal of Clinical Oncology, 28: 1749-1755 (2010)

110. Wierda W G, Padmanabhan S, Chan G W, Gupta I V, Lisby S, Osterborg A, Hx-CD20-406 Study I: Ofatumumab is active in patients with fludarabine-refractory CLL irrespective of prior rituximab: Results from the phase 2 international study. Blood, 118: 5126-5129 (2011)

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

112. Yada M, Hatakeyama S, Kamura T, Nishiyama M, Tsunematsu R, Imaki H, Ishida N, Okumura F, Nakayama K, Nakayama K I: Phosphorylation-dependent degradation of c-Myc is mediated by the F-box protein Fbw7. European Molecular Biology Organization Journal, 23: 2116-2125 (2004)

113. Zenz T, Fröhling S, Mertens D, Döhner H, Stilgenbauer S: Moving from prognostic to predictive factors in chronic lymphocytic leukaemia (CLL). Best Practice & Research Clinical Haematology, 23: 71-84 (2010)

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

Die Danksagung wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.