

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

*Die prognostische Bedeutung
von RPS15 Mutationen in der
Chronischen lymphatischen Leukämie*

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

Verfasst von Ann-Kathrin Binder
Geburtsort: Karlsruhe

2020

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Stephan Stilgenbauer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Barth

Tag der Promotion: 16.04.2021

Daten dieser Dissertation wurden bereits bei der Jahrestagung der American Society of Hematology (ASH) 2017 in Form einer Posterpräsentation vorgestellt und als Abstract im Tagungsband Blood Supplement veröffentlicht:

Sven Estenfelder, Ann-Kathrin Holland-Letz, Eugen Tausch, Sandra Robrecht, Jasmin Bahlo, Valentin Goede, Veronika Opatrna, Matthias Ritgen, Jacques JM van Dongen, Anton W Langerak, Günter Fingerle-Rowson, Michael Kneba, Kirsten Fischer, Michael Hallek, Hartmut Döhner, Stephan Stilgenbauer; RPS15 mutations and Treatment Outcome in Chronic Lymphocytic Leukemia - Results from the CLL11 Phase III Trial (Chlorambucil (Clb) with or without the Addition of Rituximab (R) or Obinutuzumab (GA101, G)) of the German CLL Study Group. Blood 2017; 130 (Supplement 1): 1738.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1. Die Chronische lymphatische Leukämie (CLL)	1
1.2. Therapie der CLL	2
1.3. CLL11 Studie.....	4
1.4. Prognostische und prädiktive Faktoren.....	5
1.5. <i>RPS15</i>	7
1.6. Fragestellung der Arbeit	9
2 Material und Methoden	10
2.1. Patientenkollektiv	10
2.2. Verwendete Materialien	11
2.3. Sequenzierung nach Sanger	14
2.3.1. Polymerasekettenreaktion.....	14
2.3.2. Agarose-Gelelektrophorese	16
2.3.3. PCR Purifikation.....	17
2.3.4. Sequenzreaktion	17
2.3.5. Aufreinigung der Sequenzreaktionsprodukte.....	18
2.3.6. Sequenzanalyse	19
2.4. Statistische Auswertung	20
3 Ergebnisse	22
3.1. Analyse der <i>RPS15</i> Mutationen.....	22
3.2. Assoziation zwischen <i>RPS15</i> Mutationen und anderen Merkmalen.....	24
3.3. Auswirkung auf Therapieansprechen, progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben	26
3.4. Getrennte Betrachtung der drei Therapiearme	30

3.5. Multivariate Analyse	34
4 Diskussion	36
5 Zusammenfassung	43
6 Literaturverzeichnis	44
Anhang	52
Tabellenverzeichnis.....	52
Abbildungsverzeichnis.....	53
Danksagung	54
Lebenslauf	55

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AA	Aminosäure
C	Cytosin
CIRS	Cumulative Illness Rating Scale
Clb	Chlorambucil
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CLL-IPI	CLL International Prognostic Index
DCLLSG	Deutsche CLL Studiengruppe
ddNTPs	Didesoxyribonukleosidtriphosphate
Del	Deletion
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
FCR	Fludarabin + Cyclophosphamid + Rituximab
G	Guanin
G-Clb	Obinutuzumab (GA-101, G) + Chlorambucil
Hb	Hämoglobin
HR	Hazard Ratio
IGHV	Immunoglobulin heavy chain variable region genes
iwCLL	International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia
MRD	Minimale Resterkrankung
Mut	mutiert

NCI	National Cancer Institute
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFS	Progressionsfreies Überleben
R-CIb	Rituximab + Chlorambucil
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus
T	Thymin
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
Thr	Thrombozyten
Unmut	unmutiert
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1. Die Chronische lymphatische Leukämie (CLL)

Gemäß der Definition der Weltgesundheitsorganisation (WHO) handelt es sich bei der Chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) um ein reifzelliges, lymphozytisches B-Non-Hodgkin-Lymphom mit einem leukämischen Verlauf. Es ist die häufigste Leukämieform der westlichen Welt und betrifft vor allem Menschen des höheren Lebensalters mit einem medianen Erkrankungsalter von 72 Jahren (Siegel et al., 2012).

1996 veröffentlichte eine vom National Cancer Institute (NCI) konstituierte Arbeitsgruppe Diagnose- und Therapieleitlinien der CLL (Cheson et al., 1996). Nach mehreren Überarbeitungen liegen die neuen Richtlinien zur Diagnostik und Therapie in der aktualisierten Version von 2018 vor und beinhalten klinische und laborwissenschaftliche Ergebnisse der letzten 20 Jahre (Hallek et al., 2018).

Zur Diagnosestellung einer CLL wird eine Lymphozytose des peripheren Blutes von mindestens 5.000 Lymphozyten pro Mikroliter gefordert. Typisch sind morphologisch reife Lymphozyten; der Anteil an unreifen Vorstufen darf ein Maximum von 55 % nicht überschreiten. Mit Hilfe der Immunphänotypisierung werden die Oberflächenantigene nachgewiesen; typischerweise trägt die vorherrschende Zellpopulation B-Zell Marker (CD19, CD20, CD23), der T-Zell Marker CD5 wird zusätzlich exprimiert. Einen Hinweis auf das Vorliegen einer monoklonalen B-Zell-Population wird durch die Leichtkettenrestriktion erbracht, da der CLL Klon mit wenigen Ausnahmefällen ausschließlich Leichtketten vom Typ κ oder Typ λ exprimiert. Im Gegensatz zu normalen B-Lymphozyten sind die Oberflächen-Immunglobuline weniger stark exprimiert (Cheson et al., 1996).

Die in Europa häufig verwendete Stadieneinteilung nach Binet teilt die CLL in drei Risikogruppen ein (Binet et al., 1981). Diese Einteilung nach individuellem Schweregrad und Ausmaß der Erkrankung erlaubt eine Prognoseeinschätzung und wird zur Therapieentscheidung herangezogen. Bei der Stadieneinteilung werden der Hämoglobinwert, die Thrombozytenzahl sowie das Vorhandensein von

vergrößerten Lymphknoten- und/oder Organregionen, welche durch eine körperliche Untersuchung festgestellt werden, berücksichtigt.

Tabelle 1: Stadieneinteilung der CLL nach Binet

Stadieneinteilung in drei Risikogruppen unter Berücksichtigung von Hämoglobinwert, Thrombozytenzahl, vergrößerten Lymphknoten- und/oder Organregionen.

Stadium	Vergrößerte Lymphknoten-/Organregionen*	Hämoglobin (Hb) und Thrombozyten (Thr)
A	maximal 2	Hb $\geq$ 10 g/dl Thr $\geq$ 100.000/ μ l
B	mindestens 3	
C	unabhängig	Hb $<$ 10 g/dl und/oder Thr $<$ 100.000/ μ l

*zervikale, axilläre oder inguinale Lymphknotenvergrößerungen uni- oder bilateral, Vergrößerung von Leber und Milz (Erfassung durch körperliche Untersuchung)

(Binet et al., 1981)

1.2. Therapie der CLL

Bei Erstdiagnose besteht meist keine Therapieindikation. Insbesondere asymptomatische Patienten in frühen Stadien sollten zunächst im Sinne einer „watch and wait“ Strategie beobachtet werden, solange sie keine Progression zeigen (Hallek et al., 2018). Tatsächlich zeigte sich in einer großen Metaanalyse kein Überlebensvorteil für Patienten mit einem frühen Behandlungsbeginn mit Chemotherapie (Hoechstetter et al., 2017). Die Indikation zum Therapiebeginn besteht grundsätzlich im Stadium Binet C, also bei Auftreten von CLL bedingter Anämie oder Thrombozytopenie. Des Weiteren kann auch eine Therapie in den Stadien A und B nach Binet notwendig werden. Dies ist der Fall bei ausgeprägter B-Symptomatik, bei symptomatischer Lymphadenopathie, bei begleitender Fatigue, aber auch bei einem raschen Anstieg der Lymphozytenzahl, gemessen anhand der Lymphozytenverdoppelungszeit. Liegt diese bei weniger als sechs Monaten oder ist ein Anstieg vom Ausgangswert um mindestens 50 % innerhalb von zwei Monaten zu beobachten, besteht ebenfalls die Indikation zur Therapie (Eichhorst et al., 2015). Die Therapie sollte wann immer möglich im Rahmen klinischer Studien erfolgen und ist abhängig vom genetischen Status, dem Alter sowie den Komorbiditäten des Patienten, welche beispielsweise mit Hilfe des CIRIS-Scores (Cumulative Illness Rating Scale) ermittelt werden.

Bis 2018 war die Kombination aus konventioneller Chemotherapie und einem CD20-Antikörper Standard in der Therapie. Aktuell erfahren wir allerdings eine Ergänzung der Therapieoptionen um neue Substanzen, die zu einer Änderung der Behandlungsalgorithmen führen.

Dabei zeigte sich der Bruton-Tyrosinkinaseinhibitor Ibrutinib in der E1912 Studie der Kombinationstherapie aus Fludarabin, Cyclophosphamid und Rituximab (FCR) überlegen hinsichtlich des progressionsfreien Überlebens (PFS) und des Gesamtüberlebens bei Patienten < 70 Jahren ohne Hochrisikomarker (Shanafelt et al., 2019). Für ältere Patienten konnte in der iLLUMINATE Studie gezeigt werden, dass eine Therapie mit Ibrutinib und Obinutuzumab das progressionsfreie Überleben verlängert, im Vergleich zu einer Therapie mit Chlorambucil und Obinutuzumab. Insbesondere Patienten mit unmutiertem IGHV-Status profitieren dabei von der Therapie mit Ibrutinib (Moreno et al., 2019). Auch der BCL2 Inhibitor Venetoclax war bei Patienten mit mehreren Begleiterkrankungen in Kombination mit dem CD20-Antikörper Obinutuzumab einer Chemoimmuntherapie überlegen (Fischer et al., 2019).

Neben den spezifischen Inhibitoren Ibrutinib oder Venetoclax stellt die Chemoimmuntherapie auch weiterhin eine Therapiealternative für bestimmte Patientengruppen dar. Insbesondere für Patienten mit mutiertem IGHV-Status, die aufgrund von Komorbiditäten für Ibrutinib ungeeignet sind oder sich gegen eine kontinuierliche Therapie entscheiden, kommen für eine Immunchemotherapie in Frage und zeigen häufig lange Remissionsdauern (Hallek et al., 2010). Tatsächlich zeigte die Kombination aus antikörpervermittelter Immuntherapie und Chemotherapie einen Überlebensvorteil gegenüber alleiniger Chemotherapie, wie unter anderem in der randomisierten CLL8 Studie der Deutschen CLL Studiengruppe (DCLLSG) gezeigt werden konnte (Hallek et al., 2010). Die Therapie mit FCR stellt bei Patienten in gutem Allgemeinzustand (CIRS-Score < 6) und ohne Deletion 17p oder *TP53* Mutation eine Alternative zur Therapie mit Ibrutinib dar (Eichhorst et al., 2015). Für ältere, fitte Patienten stellt eine Kombinationstherapie mit Rituximab und Bendamustin neben Ibrutinib eine Alternative dar aufgrund des besseren Nebenwirkungsprofils im Vergleich zur FCR Therapie: Insbesondere das Auftreten schwerer Infektionen in dieser Patientengruppe kam mit Rituximab und Bendamustin seltener vor (Eichhorst et al., 2015). Kommen erhebliche Komorbiditäten dazu, so kann auch Bendamustin nicht ohne Bedenken appliziert

werden und wird durch Chlorambucil ersetzt (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF).

Eine Heilung ist allerdings mit keiner der bislang genannten Therapien möglich. Diese ist nur mit einer allogenen Stammzelltransplantation zu erzielen, für die allerdings ein Großteil der Patienten aufgrund des hohen Alters, Komorbiditäten oder dem guten Ansprechen auf andere Therapieoptionen nicht geeignet ist. Bei Hochrisiko-CLL mit entsprechendem genetischen Risikoprofil (siehe 1.4.) stellt die allogene Stammzelltransplantation eine sinnvolle Option dar (Dreger et al., 2014). Die Möglichkeit der allogenen Stammzelltransplantation muss in diesen Fällen gegen die Möglichkeit einer Langzeittherapie mit neuen Substanzen abgewogen werden (Eichhorst et al., 2015).

1.3. CLL11 Studie

Bei der CLL11 Studie handelt es sich um eine offene, multizentrische, randomisierte dreiarmlige Studie, mit dem Ziel die Sicherheit und Wirksamkeit von Obinutuzumab (GA-101, G) + Chlorambucil (G-Clb) mit Rituximab + Chlorambucil (R-Clb) und alleiniger Chlorambucil (Clb) Therapie zu vergleichen. Hinsichtlich der Wirksamkeit wurde das progressionsfreie Überleben als primärer Endpunkt herangezogen. Eingeschlossen in die Studie wurden 781 CD20 positive CLL Patienten mit Komorbiditäten (CIRS-Score > 6 und/oder Kreatinin-Clearance < 70 ml/min), die zuvor noch keine Therapie erhalten hatten und nach NCI Kriterien therapiebedürftig waren.

Die Studie wurde von der deutschen CLL Studiengruppe in Zusammenarbeit mit dem Sponsor F. Hoffmann-La Roche entworfen, durch unabhängige Ethikkommissionen der teilnehmenden Institutionen genehmigt und in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki und den Richtlinien der „International Conference on Harmonization Guidelines for Good Clinical Practice“ durchgeführt.

Die Ergebnisse dieser Studie wurden 2014 publiziert, mit einer ersten Aktualisierung nach verlängerter Beobachtungszeit 2015 und bestätigten ein längeres progressionsfreies Überleben sowie ein längeres Gesamtüberleben unter den beiden Immunchemotherapien, verglichen mit alleiniger Chlorambucil Therapie (Goede et al., 2014; Goede et al., 2015).

Die Therapie mit Obinutuzumab-Chlorambucil führte zudem auch zu einer Verlängerung des progressionsfreien Überlebens, verglichen mit der Rituximab-Chlorambucil Therapie (medianes PFS: 26,7 Monate vs. 16,3 Monate). Ein signifikanter Vorteil für Obinutuzumab-Chlorambucil hinsichtlich der Verlängerung des progressionsfreien Überlebens zeigte sich in allen untersuchten Subgruppen außer bei Patienten mit Deletion 17p (del17p), bei denen keine der Therapien für ein dauerhaftes Ansprechen geeignet ist. Zudem wurde in der Obinutuzumab-Chlorambucil Gruppe zehnmal häufiger eine nicht mehr detektierbare Minimale Resterkrankung (MRD) erreicht (Goede et al., 2015). Nach einem verlängerten Beobachtungszeitraum konnte überdies eine Verlängerung des Gesamtüberlebens in der Obinutuzumab-Chlorambucil Gruppe, verglichen mit der Rituximab-Chlorambucil Gruppe, belegt werden (Goede et al., 2018).

Die Ergebnisse der CLL11 Studie führten im Juli 2014 in der EU zur Zulassung von Obinutuzumab in Kombination mit Chlorambucil für unfitte Patienten mit zuvor unbehandelter CLL.

1.4. Prognostische und prädiktive Faktoren

Die CLL zeichnet sich durch sehr heterogene Krankheitsverläufe aus. Prognostische Faktoren ermöglichen eine Risikoeinschätzung und lassen Aussagen über den weiteren Verlauf der Erkrankung unabhängig von der Therapie zu. Prädiktive Faktoren helfen dabei, Therapieentscheidungen zu treffen, indem sie Vorhersagen über das Therapieansprechen unter bestimmten tumorgenetischen Voraussetzungen zulassen.

Eine internationale Arbeitsgruppe konnte durch eine Metaanalyse von acht prospektiven, randomisierten, kontrollierten klinischen Studien fünf unabhängige Prognosefaktoren identifizieren. Diese unabhängigen Faktoren sind der *TP53* Status (del17p oder/und *TP53* Mutation), IGHV Mutationsstatus, Serum β_2 -Mikroglobulin Konzentration, Klinisches Stadium nach Rai oder Binet sowie Alter (The International CLL-IPI working group, 2016). Anhand dieser Faktoren wurde ein Modell entwickelt, welches es ermöglicht, eine Risikoeinschätzung vorzunehmen und die durchschnittliche Lebenserwartung für Patienten anhand der zugeordneten Risikogruppe zu bestimmen.

Tabelle 2: CLL International Prognostic Index (CLL-IPI) Einteilung zu Risikogruppen (The International CLL-IPI working group, 2016)

Die Einteilung zu den Risikogruppen nach CLL-IPI erfolgt anhand der Kriterien Alter, Klinisches Stadium, β_2 -Mikroglobulin Konzentration, IGHV-Status sowie del17p/*TP53* Status. Dabei werden die Punkte zum Score addiert und darüber das Risiko für ein verkürztes Überleben ermittelt.

Ungünstiger prognostischer Faktor	Punkte
Alter > 65 Jahre	1
Klinisches Stadium Binet B/C oder Rai I-IV	1
β_2 -Mikroglobulin Konzentration > 3,5 mg/L	2
IGHV unmutiert	2
del17p/ <i>TP53</i> mut	4

Risiko-Score	Punkte	5-Jahres-Überlebensrate
Niedrig	0-1	93 %
Mittel	2-3	79 %
Hoch	4-6	63 %
Sehr hoch	7-10	23 %

Der stärkste Risikofaktor, der damit auch mit den meisten Punkten in die Bewertung eingeht und per se eine Hochrisiko-Kohorte definiert, ist die Mutation von *TP53* beziehungsweise die Präsenz einer Deletion des Chromosoms 17p. Letztere wird in über 90 % der Fälle von einer zusätzlichen Mutation des *TP53* Gens begleitet, während 40 % der Patienten mit *TP53* Mutation keine Deletion 17p besitzen (Butler & Gribben, 2010). Beide Veränderungen führen zu einem deutlich verkürzten progressionsfreien Überleben, einem verkürzten Gesamtüberleben und haben unter Standardtherapie ein hohes Risiko für schlechtes Therapieansprechen (Grever et al., 2007; Stilgenbauer et al., 2014; Strati et al., 2014). Demzufolge erweisen sich die *TP53* Mutation sowie die Deletion 17p als prognostische Parameter.

Ein Ansatz aktueller Forschung ist eine Risikoeinschätzung mit Hilfe der Bestimmung des genetischen Status zu realisieren und mit Hilfe dessen individuelle Therapiekonzepte zu entwickeln. Das Ziel hierbei ist die Erstellung risikoadaptierter Therapiekonzepte für spezifische Subgruppen an Patienten.

Dabei kann es auch sinnvoll sein, biologische Gruppen mit niedrigem Risiko zu identifizieren, um ihre Therapieintensität gering zu halten sowie Subgruppen ausfindig zu machen, die ein hohes Risiko besitzen und die von einer intensiven, wenn möglich, zielgerichteten Therapie profitieren (Zenz et al., 2010).

Durch die Möglichkeiten moderner genetischer Forschung und insbesondere durch Whole Exome Sequencing, also Sequenzierung aller proteincodierenden Bereiche des Genoms, wurden in den letzten Jahren zahlreiche neue, wiederkehrende genetische Veränderungen beobachtet. Zu den am häufigsten mutierten Genen zählen *SF3B1* und *NOTCH1*, die in 5-20 % der Fälle mutiert sind (Stilgenbauer et al., 2014). Beide Faktoren zeigen in klinischen Studien einen negativen prognostischen Einfluss und weisen eine Assoziation mit unmutiertem IGHV-Status sowie mit Mutationen in *TP53* auf (Stilgenbauer et al., 2014; The International CLL-IPI working group, 2016). Darüber hinaus zeigte sich *NOTCH1* in unterschiedlichen Studienkohorten als prädiktiver Marker, da Patienten mit einer Mutation in *NOTCH1* geringer von der Hinzunahme von CD20-Antikörpern zur Chemotherapie profitierten als Patienten ohne Mutation in diesem Gen (Stilgenbauer et al., 2014; Tausch et al., 2020).

Darüber hinaus wurden 44 weitere rekurrent mutierte Gene durch die Sequenzierung des Exoms von über 400 Patienten entdeckt. Darunter war auch eine bislang noch nicht in Zusammenhang mit Tumorerkrankungen gebrachte Veränderung in *RPS15* (4,3 % mutiert) (Landau et al., 2015). Mutationen in *RPS15* waren bis dahin lediglich als seltene Mutationen bei Diamond-Blackfan-Anämie bekannt (Gazda et al., 2008). Trotz der niedrigen Inzidenz von *RPS15* Mutationen hatten in der CLL8 Kohorte betroffene Patienten ein signifikant verkürztes progressionsfreies Überleben (Landau et al., 2015).

1.5. *RPS15*

Das Gen, welches für das ribosomale Protein S15 (*RPS15*) codierend ist, besteht aus vier Exonen und hat seinen Genlokus auf dem kurzen Arm von Chromosom 19 (19p13.3) (UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009). Das Gen codiert für das ribosomale Protein S15, welches Teil der Ribosomen ist, welche wiederum die Proteinbiosynthese der Zelle katalysieren. Aufgebaut sind sie aus vier RNA-Strängen sowie zahlreichen Proteinen. In der eukaryotischen Zelle bestehen sie aus

einer 40S und einer 60S Untereinheit. Das ribosomale Protein S15 ist Bestandteil der 40S Untereinheit (O'Leary et al., 2016).

Es agiert als nuklearer Exportfaktor für die 40S Untereinheit (Léger-Silvestre et al., 2004). Darüber hinaus besitzt das ribosomale Protein S15 sowohl ribosomale als auch extraribosomale Funktionen.

Unter anderem besteht ein Einfluss auf den p53 Signalweg. *TP53* besitzt eine zentrale Rolle in der Zellzyklusregulation, DNA-Reparatur und Apoptoseregulation. Kommt es zu potentiell DNA schädigenden Reizen, wird p53 aktiviert und führt in erster Linie zu einem Zellzyklusarrest; bei schwerwiegenden Schäden induziert p53 die Apoptose. Veränderungen in der Funktion von p53 spielen eine wichtige Rolle in der Tumorgenese. In über der Hälfte aller menschlicher Malignome ist der Tumorsuppressor, der auch als „Wächter des menschlichen Genoms“ bezeichnet wird, mutiert (Levine & Oren, 2009). Über Interaktionen mit Mdm2 sowie MdmX wird die Aktivität sowie die Konzentration von p53 in der Zelle reguliert (Daftuar et al., 2013). In Zellversuchen konnte gezeigt werden, dass verschiedene ribosomale Proteine die Fähigkeit besitzen, an Mdm2 zu binden, darunter auch das ribosomale Protein S15. Über die Bindung an das Mdm2 Protein kommt es zu einer Hemmung der E3-Ubiquitin-Ligase Aktivität von Mdm2. Die Polyubiquitinierung von p53 führt zu dessen Abbau am Proteasom, die Hemmung der Ubiquitin-Ligase Aktivität von Mdm2 führt demnach zu einer Stabilisierung von p53.

Des Weiteren zeigte sich in Zellversuchen ein Zusammenhang zwischen der Überexpression von ribosomalem Protein S15 und dem Anteil an Zellen, die sich in Apoptose begaben, sowie an Zellen, die in den Zellzyklusarrest der G2 Phase übergingen (Daftuar et al., 2013).

Auch p53 unabhängige Einflüsse ribosomaler Proteine spielen eine Rolle. So konnte gezeigt werden, dass mutiertes ribosomales Protein S15 Bestandteil der Ribosomen werden kann und sich so auf die Translation auswirken kann (Bretones et al., 2018).

Die erste Beschreibung von *RPS15* Mutationen erfolgte bei Patienten mit Diamond-Blackfan Anämie, einer kongenitalen, aplastischen, makrozytären Anämie, die mit einem erhöhten Risiko für Neoplasien einhergeht (Gazda et al., 2008; Hoefele et al., 2010).

Durch den Einsatz von Whole Exome Sequencing konnten bei CLL Patienten bis dahin unentdeckte genetische Varianten nachgewiesen werden. Dabei wurde ein

wiederholtes Auftreten von Mutationen im *RPS15* Gen beschrieben, wobei es sich um Mutationen, die hoch konserviert im Exon 4 des Gens auftreten, handelt. Patienten mit diesen Mutationen zeigten ein kürzeres progressionsfreies Überleben (Landau et al., 2015). Zudem wurden bei einem hohen Anteil von Patienten (19,5 %, 8 von 41), die einen Rückfall unter FCR Therapie hatten, Mutationen in *RPS15* nachgewiesen (Ljungström et al., 2016). In der Studienpopulation von Ljungström et al. wiesen alle Patienten mit mutiertem *RPS15* einen unmutierten IGHV-Status auf, zudem zeigte sich eine Häufung von *TP53* Mutationen (36 % bei *RPS15*mut vs. 18 % bei *RPS15*unmut, $p < 0,01$). Des Weiteren zeigte sich ein geringeres Auftreten von Trisomie 12 (3 % vs. 13 %, $p < 0,05$) und *SF3B1* Mutationen (6 % vs. 20 %, $p < 0,05$).

1.6. Fragestellung der Arbeit

Bisherige Erkenntnisse deuten darauf hin, dass es sich bei *RPS15* um einen relevanten prognostischen Faktor für CLL Patienten handelt. Dennoch fehlen Untersuchungen in großen Studienkollektiven, die den prognostischen Wert validieren. Mit der Verfügbarkeit von Blutproben von 700 Patienten aus der CLL11 Studie der Deutschen CLL Studiengruppe bietet sich die Möglichkeit, die prognostische Bedeutung von *RPS15* in einem besonders großen, gut charakterisierten Studienkollektiv zu untersuchen. Die Verfügbarkeit weiterer genetischer Faktoren der CLL11 Studie erlaubt die Korrelation von *RPS15* mit der Inzidenz chromosomaler Aberrationen, rekurrenter Genmutationen und dem IGHV-Status. Zudem wird der Einfluss auf Therapieansprechen, progressionsfreies Überleben sowie das Gesamtüberleben untersucht. Um einen möglichen prädiktiven Einfluss zu erkennen, besteht in der dreiarmlig angelegten Studienkohorte überdies die Möglichkeit, den Einfluss von *RPS15* Mutationen auf unterschiedliche Therapien zu untersuchen und zu vergleichen. Zuletzt soll mittels einer multivariaten Analyse untersucht werden, ob es sich hierbei um einen unabhängigen prognostischen Faktor handelt.

2 Material und Methoden

2.1. Patientenkollektiv

Die hier untersuchten Patienten entstammen der CLL11 Studienpopulation (n = 781), einer prospektiven, multizentrischen, dreiarmligen randomisierten Phase-III-Studie (Hoffmann-La Roche (außerhalb der USA), Genentech (USA) in Zusammenarbeit mit der DCLLSG). Dabei wird die Wirksamkeit sowie Sicherheit von Obinutuzumab (GA-101, G) + Chlorambucil (G-Clb), Rituximab + Chlorambucil (R-Clb) oder Chlorambucil (Clb) allein verglichen. Einschlusskriterien sind ein Binet Stadium C oder behandlungsbedürftige Stadien B sowie A nach NCI Kriterien. Eingeschlossen wurden Patienten mit relevanten Komorbiditäten (CIRS-Score > 6 und/oder Kreatinin-Clearance < 70 ml/min). Alle Patienten sind älter als 18 Jahre und haben noch keine Vortherapie bezüglich ihrer CLL Erkrankung erhalten. Der Rekrutierungszeitraum erstreckte sich von 2010 bis 2012. Primärer Endpunkt der Studie ist das progressionsfreie Überleben, sekundäre Endpunkte sind Ansprechrate, ereignisfreies Überleben der Patienten in Vollremission, Gesamtüberleben, molekulare Remission sowie die Lebensqualität (EORTC-Fragebogen). Der Beobachtungszeitraum für das progressionsfreie Überleben sowie für das Gesamtüberleben wurde auf fünf Jahre nach Einschluss des letzten Patienten festgelegt.

Uns standen 700 repräsentative Proben aus der Studienpopulation zur Verfügung, was einem Anteil von 89,6 % entspricht.

Tabelle 3: Verteilung der Patienten der CLL11 Studie auf die drei Therapiearme

Gesamte Studienpopulation n = 781	Verfügbare Proben n = 700
Clb n = 118	Clb n = 100
R-Clb n = 330	R-Clb n = 297
G-Clb n = 333	G-Clb n = 303

2.2. Verwendete Materialien

Tabelle 4: Verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller
2720 Thermal Cycler	Fa. Applied Biosystems, Foster City, USA
37 °C Wasserbad	Fa. Heraeus, Hanau
Abfallständer für Vernichtungsbeutel	Fa. Ratiolab, Dreieich
Abschlussschiene für Gelschlitten	Wissenschaftliche Werkstatt der Uniklinik Ulm
Bechergläser (50 ml, 200 ml, 500 ml)	Fa. Schott AG, Mainz
Biofuge Fresco	Fa. Heraeus, Hanau
Biofuge Pico	Fa. Heraeus, Hanau
Chemikalienlöffel, beidseitig	Fa. RSG Solingen, Solingen
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
Elektr. 8-Kanal-Pipette 100-1250 µl	Fa. VWR, Darmstadt
Elektrophoresekammern (4617)	Fa. MBT Brand, Gießen
Eppendorf Tubes-Ständer	Fa. VWR, Darmstadt
Erlenmeyerkolben 500 ml	Fa. Duran, Wertheim/Mainz
Gel Doc XR	Fa. Biorad, Hercules, USA
Gelschlitten	Wissenschaftliche Werkstatt der Uniklinik Ulm
Heat Block, 96-well SciGene, Hybex Microsample Incubator for PCR plate	Fa. Scigene, Sunnyvale, USA
Heizblock	Fa. Liebisch GmbH & Co. KG Labortechnik, Bielefeld
Magnetrührer	Fa. IKA, Staufen
Magnetrührstäbchen	Fa. VWR, Darmstadt
Mehrkanal-Pipetten mit variabler Volumeneinstellung, 8-Kanal (0,5-10 µl)	Fa. Eppendorf, Hamburg
Mikrowelle	Fa. Siemens, München
Minizentrifuge	Fa. Qualitron, Rescaldina, Italien
Multipette plus	Fa. Eppendorf, Hamburg
Multipette stream	Fa. Eppendorf, Hamburg

Sequencer 3130XL	Fa. Applied Biosystems, Foster City, USA
Thermomixer comfort	Fa. Eppendorf, Hamburg
Vortexer	Fa. Scientific Industries, Bohemia, USA
Waage Precisa 400M	Fa. PAG Oerlikon AG, Pfäffikon, Schweiz

Tabelle 5: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
15 ml konische Röhrchen (15 ml-Falcon)	Fa. BD Falcon, New Jersey
96 Well Plate Septa	Fa. Applied Biosystems, Foster City, USA
96-well skirted PCR plates, 0,2 ml, polypropylene	Fa. Biorad, Hercules, USA
Adhesive aluminum foil seal	Fa. Beckman Coulter, Krefeld
Alufolie	Fa. Ecopla, Andenne, Belgien
ART Aerosol Resistant Tips, 10	Fa. Fisher Scientific, Waltham, USA
ART Aerosol Resistant Tips, 1000	Fa. Fisher Scientific, Waltham, USA
ART Aerosol Resistant Tips, 100	Fa. Fisher Scientific, Waltham, USA
ART Aerosol Resistant Tips, 200	Fa. Fisher Scientific, Waltham, USA
ART Aerosol Resistant Tips, 20	Fa. Fisher Scientific, Waltham, USA
Combitips plus 1,0 ml	Fa. Eppendorf, Hamburg
Combitips plus 5,0 ml	Fa. Eppendorf, Hamburg
Einmalhandschuhe Derma-Clean (Größe S)	Fa. Ansell, Iselin, USA
Einmaltücher	Fa. Kimberly Clark, Dallas, USA
Entsorgungsbeutel 200x300 mm	Fa. Ratiolab, Dreieich
Eppendorf microcentrifuge tubes	Fa. Eppendorf, Hamburg
Half Skirt 96 Well PCR plate	Fa. VWR, Darmstadt
Kryo-Box, beschichtet 136x136x50 mm	Fa. Ratiolab, Dreieich
MicroAmp 8-Cap Strip	Fa. Applied Biosystems, Foster City, USA
MicroAmp 8-Tube Strip	Fa. Applied Biosystems, Foster City, USA
MicroAmp Adhesive Film Applicator	Fa. Applied Biosystems, Foster City, USA
MicroAmp Optical 96 Well Reaction Plate	Fa. Applied Biosystems, Foster City, USA
Multi-Safe 0,7 l (Tischabfall)	Fa. Sarstedt, Nümbrecht

Pipettenspitze 1000 µl	Fa. Kinesis GmbH, Langenfeld
Pipettenspitze 10 µl	Fa. Kinesis GmbH, Langenfeld
Pipettenspitze 200 µl	Fa. Kinesis GmbH, Langenfeld
QIAquick 96 Plates	Fa. Qiagen GmbH, Hilden
Rastereinsatz für Kryo-Box	Fa. Ratiolab, Dreieich
Safe-Lock Reaktionsgefäß 1,5 ml	Fa. Ratiolab, Dreieich
Safe-Lock Reaktionsgefäß 2 ml	Fa. Ratiolab, Dreieich

Tabelle 6: Verwendete Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
100 bp DNA-Ladder (500 µg/ml)	Fa. New England Biolabs Inc, Ipswich, USA
10x BlueJuice Loading Buffer	Fa. Invitrogen, Karlsruhe
10x PCR-Puffer	Fa. Qiagen GmbH, Hilden
5x Sequencing Buffer	Fa. Applied Biosystems, Foster City, USA
Aqua ad iniectionem Braun Mini-Plasco	Fa. Braun, Melsungen
BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Fa. Applied Biosystems, Foster City, USA
Deoxynucleoside Triphosphate Set PCR Grade	Fa. Roche, Basel, Schweiz
DNA-Polymerase 1 (10.000 U/ml)	Fa. New England Biolabs Inc, Ipswich, USA
DyeEx 2.0 Spin Kit	Fa. Qiagen GmbH, Hilden
DyeEx 96 Kit	Fa. Qiagen GmbH, Hilden
EDTA Puffer 0,5 M EDTA	Fa. Thermo Fisher, Waltham, USA
Essigsäure 100 %	Fa. AppliChem, Darmstadt
Ethanol absolut	Fa. VWR, Darmstadt
Ethidiumbromid 0,07 %	Fa. AppliChem, Darmstadt
Hi-Di Formamide	Fa. Applied Biosystems, Foster City, USA
HotStarTaq DNA-Polymerase 1000 units	Fa. Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Fa. Qiagen GmbH, Hilden
TrackIt 100 bp Ladder	Fa. Thermo Fisher, Waltham, USA
TRIS EDTA Buffer Solution pH 7,4	Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Tabelle 7: Verwendete Primer

Die verwendeten Primer stammen von der Firma Eurofins Genomics.

<i>RPS15</i> Exon 4	Sequenz (5' → 3')
vorwärts	atcagctgacacccagctt
rückwärts	actaccacacacccccgaa

2.3. Sequenzierung nach Sanger

Zur Sequenzanalyse des Exon 4 aus dem *RPS15* Gen wird eine Sequenzierung nach Sanger durchgeführt (Sanger et al., 1977). Aus der Studienpopulation der CLL11 Kohorte stehen uns Proben von 700 Patienten zur Verfügung. Die Proben, aus denen die genetische Analyse erfolgt, sind aus dem peripheren Blut der Patienten gewonnen und nach CD19-positiven Zellen selektioniert worden.

2.3.1. Polymerasekettenreaktion

Zunächst wird in der Polymerasekettenreaktion (PCR) die zu untersuchende DNA-Sequenz, das Exon 4 des *RPS15* Gens, amplifiziert. Aus den im Folgenden beschriebenen Komponenten wird ein Mastermix hergestellt, dem dann die zu untersuchende Patientenprobe, welche das zu untersuchende Zielgen enthält, zugesetzt wird.

Es wird ein Primerpaar benötigt, welches durch seine Basensequenz spezifisch an die DNA-Einzelstränge der zu untersuchenden Region bindet. Da die Synthese des neuen DNA-Stranges nur in 5' → 3' erfolgen kann, wird sowohl ein Vorwärts- als auch ein Rückwärtsprimer benötigt.

Des Weiteren wird eine thermostabile Polymerase eingesetzt. Während der PCR werden die DNA-Doppelstränge durch Erhitzen denaturiert; die Polymerase darf während dieser Phasen nicht in ihrer Struktur geschädigt werden. Die Taq-Polymerase bleibt in ihrer Struktur auch bei Temperaturen um 100 °C stabil, was sie in besonderem Maße geeignet macht.

Die Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs) dienen als Substrate für die Polymerase. Aus ihnen entsteht – durch Ausbildung von Phosphodiesterbrücken unter Abspaltung von Diphosphat zwischen den Nukleotiden – der neu synthetisierte komplementäre DNA-Strang.

Um ein Milieu zu erzeugen, in dem die Polymerase optimal arbeiten kann, wird Wasser sowie eine Pufferlösung zugegeben.

Tabelle 8: PCR-Ansatz für *RPS15*

Reagenz	Volumen (µl)
H ₂ O	20,25
10 x PCR-Puffer	2,5
dNTPs (10 mM)	0,5
<i>RPS15</i> Primer vorwärts	0,25
<i>RPS15</i> Primer rückwärts	0,25
Taq-Polymerase	0,25
Probe (Patient)	1

Nach der Herstellung des Mastermixes wird der Ansatz auf dem Vortexer gemischt und zu je 24 µl auf die Vials der 96 well-Platte verteilt. Schließlich wird jedem Vial noch 1 µl der zu untersuchenden DNA-Arbeitslösung zugefügt. Ein Vial pro Ansatz verbleibt ohne Patientenprobe und dient als Negativkontrolle, um eventuelle Verunreinigungen des Mastermixes mit DNA zu erkennen.

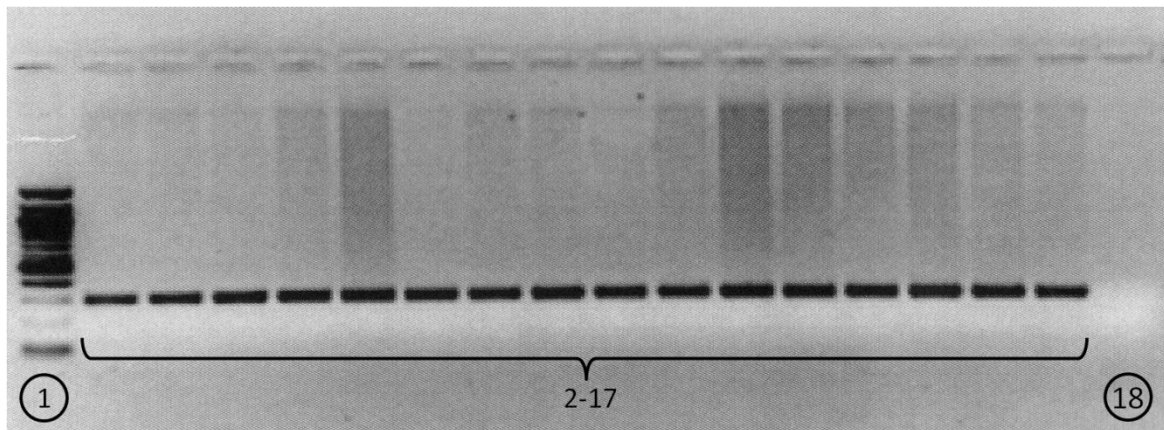
Im Thermocycler erfolgt in mehreren Schritten die PCR. Er bringt die Reaktionsgefäße präzise auf die im jeweiligen Schritt benötigte Temperatur. Zunächst wird die DNA-Doppelhelix denaturiert; hier werden durch Erhitzen auf 95 °C die Wasserstoffbrückenbindungen der DNA-Doppelhelix gespalten. Anschließend folgt das Annealing; bei 60 °C binden die Primer an die DNA-Einzelstränge. Die Primer dienen der Polymerase als Starter zur Synthese der komplementären DNA-Stränge aus den Desoxyribonukleotidtriphosphaten.

Tabelle 9: Thermocyclerprogramm für die PCR von *RPS15*

	Zeit (Min.)	Temp. (°C)	
Initiale Denaturierung	15	95	
Denaturierung	0,5	95	35 Zyklen
Primerhybridisierung	0,5	60	
Polymerisation	1	72	
Extension	5	72	

2.3.2. Agarose-Gelelektrophorese

Um den Erfolg der PCR zu kontrollieren, wird eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wird zunächst ein 1,5 % Agarosegel aus TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) und Agarose hergestellt. Der TAE-Puffer wird zusammen mit der Agarose aufgekocht, danach kühlt das Gel unter ständigem Rühren ab. Bevor es in den Gelschlitten gegossen wird, wird es mit Ethidiumbromid versetzt. Das vollständig abgekühlte Gel wird im Gelschlitten in die Elektrophoresekammer gelegt. Zur Probenvorbereitung werden jeweils 5 µl des PCR-Produktes mit 3 µl Aqua Braun und 2 µl Loading Puffer versetzt. Die Proben werden daraufhin in die dafür vorgesehenen Geltaschen überführt. Zur Längenkontrolle der entstandenen DNA-Amplifikate wird 1 µl Ladder mit 3 µl Aqua Braun sowie 2 µl Loading Puffer gemischt und in eine der Geltaschen pipettiert. Die DNA-Fragmente wandern, entsprechend ihrer Länge, unterschiedlich schnell im elektrischen Feld Richtung Anode, kürzere Fragmente wandern dabei schneller als längere. Zur Dokumentation der DNA-Banden im Agarosegel dient der im Gel befindliche Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid, er bindet an die DNA und lässt sich unter UV-Beleuchtung darstellen.



1: DNA-Ladder; 2-17: DNA-Amplifikate (Exon 4 *RPS15*); 18: Negativkontrolle

Abbildung 1: Agarose-Gel nach der Elektrophorese

2.3.3. PCR Purifikation

Die PCR-Aufreinigung wird mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits durchgeführt. PCR-Produkte mit einer Größe zwischen 100 bp und 10 kb können mit dieser Methode von unerwünschten Bestandteilen wie Oligonukleotidprimern, Enzymen und Nukleotiden befreit werden. Für die Aufreinigung der PCR-Produkte werden zunächst die DNA-Fragmente unter hoher Salzkonzentration an einer Siliciagel-Membran gebunden. Spezielle Bindungseigenschaften der Membran führen dazu, dass ausschließlich die DNA-Fragmente mit einer Größe zwischen 100 bp und 10 kb gebunden werden; Nukleotide und Primer werden durch die Säule gespült und verworfen. Anschließend findet ein Waschschriff mit einem ethanolhaltigen Puffer statt. Die PCR-Produkte werden schließlich mit einem salzarmen Puffer von der Siliciagel-Membran eluiert.

2.3.4. Sequenzreaktion

Die Sequenzreaktion dient der Synthetisierung von Kettenabbruchfragmenten, welche zur Dekodierung der DNA-Sequenz mittels Kapillarelektrophorese benötigt werden. Verwendet wird der BigDye-Ready-Reaction-Mix; enthalten sind eine Polymerase, Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) sowie Didesoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTPs). Die Polymerase synthetisiert ausgehend von den zugesetzten Primern komplementäre DNA-Stränge – als Amplicon dienen die aufgereinigten PCR-Produkte. Im Reaktionsansatz befinden sich neben den zur DNA-Synthese benötigten dNTPs auch ddNTPs. Wird ein solches ddNTP während der Elongation des komplementären DNA-Stranges in den

neu synthetisierten Strang eingebaut, kommt es zum Synthesestopp. Das Fehlen der 3'-Hydroxy-Gruppe der ddNTPs verhindert die Ausbildung einer weiteren Phosphodiesterasebrücke und führt folglich zum Kettenabbruch. Es entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, da die ddNTPs jeweils zufällig von der Polymerase in den DNA-Strang eingebaut werden. Die ddNTPs als Kettenabbruchnukleotide bilden jeweils den Abschluss der DNA-Fragmente. Durch unterschiedliche Fluoreszenzmarkierungen der jeweiligen Basen können sie in einer hochauflösenden Gelelektrophorese dargestellt werden. Über die Laufstrecke in der Elektrophorese sowie der unterschiedlich farbigen Fluoreszenzmarkierung der Basen wird die DNA-Sequenz ermittelt. In den Ansätzen werden separat Vorwärts- und Rückwärtsprimer eingesetzt, um lineare DNA-Sequenzen zu erhalten.

Tabelle 10: Ansatz für die Sequenzreaktion

Reagenz	Volumen (µl)
H ₂ O	9,5
Seq. Puffer	2
BigDye	4
Primer (1 µM)	3,2
Template	1,5

Tabelle 11: Thermocyclerprogramm für die Sequenzreaktion

	Zeit (Min.)	Temp. (°C)	
Initiale Denaturierung	1	96	
Denaturierung	0,1	96	25 Zyklen
Primerhybridisierung	0,05	52	
Polymerisation	2	60	

2.3.5. Aufreinigung der Sequenzreaktionsprodukte

Zur Aufreinigung der Produkte aus der Sequenzreaktion wird das DyeEx-Kit der Firma Qiagen verwendet. Da überschüssige Stoppnukleotide die Sequenzanalyse behindern, werden sie durch eine Gel-Filtration aus dem Reaktionsprodukt entfernt.

Die Säulen der DyeEx-Platten enthalten eine Polymermatrix mit gleichförmigen Poren. Werden die Produkte der Sequenzreaktion auf die Säulen aufgebracht, diffundieren die freien Stoppnukleotide in diese Poren und werden darin zurückgehalten. Nach der Zentrifugation der DyeEx-Platten befinden sich die DNA-Fragmente der Sequenzreaktion im Eluat, befreit von ungebundenen Stoppnukleotiden.

2.3.6. Sequenzanalyse

Mit Hilfe des DNA-Sequencer 3130xl erfolgt die elektrophoretische Auftrennung der Kettenabbruchfragmente. Die aufgereinigten Produkte der Sequenzreaktion werden in die, mit einem Polymer gefüllten, Kapillaren des Sequenzierers eingebracht. An die Kapillaren wird Spannung angelegt, wodurch die DNA-Fragmente von der Kathode Richtung Anode wandern. Kürzere Fragmente wandern dabei schneller durch das Polymer als lange Fragmente und finden sich somit näher an der Anode. Im Detektionsabschnitt des Sequenzierers werden die fluoreszenzmarkierten Stoppnukleotide über einen Laser angeregt; das emittierte Lichtsignal wird erfasst. Die Basen sind mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen gekennzeichnet (Adenin (A) = grün, Thymin (T) = rot, Guanin (G) = schwarz, Cytosin (C) = blau), sodass über die registrierte Wellenlänge des Lichtes auf die Base des Stoppnukleotides rückgeschlossen werden kann. Über die Information aus Laufstrecke in der Kapillarelektrophorese sowie der Base des Stoppnukleotides wird die DNA-Sequenz Base für Base entsprechend der Fluoreszenzsignale ermittelt.

Die ermittelten Sequenzen werden mit den Reference sequence Daten für das Exon 4 des *RPS15* Gens anhand der UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 Assembly verglichen. Der somatische Ursprung gefundener Veränderungen wird durch den Abgleich mit nicht-Tumor (Normalgewebe) Proben des gleichen Patienten validiert. Diese werden durch CD19 Aufreinigung peripherer Blutzellen gewonnen (Negativ-Fraktion der Aufreinigung).

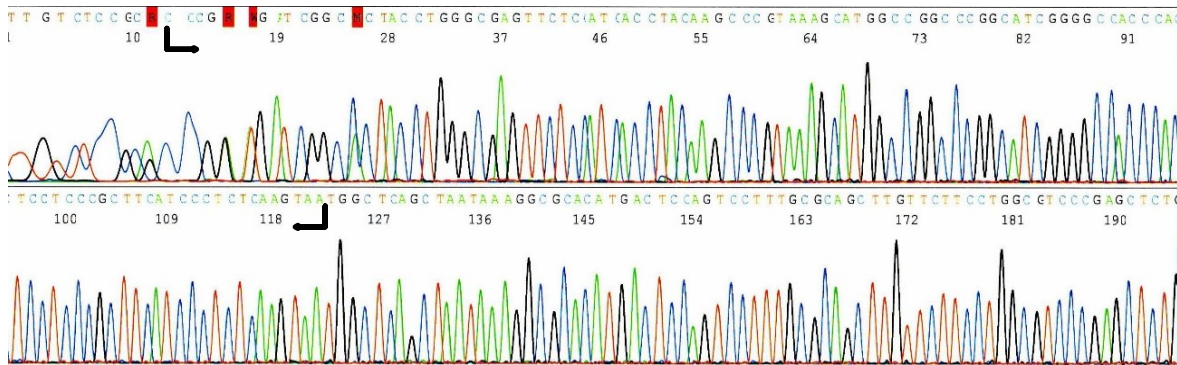


Abbildung 2: Vorwärtssequenz *RPS15* Exon 4

2.4. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des Statistikprogrammes R-Studio 1.1.447 (RStudio Inc., Boston, USA) mit Survival package sowie SPSS v23 (SPSS, Chicago, USA).

Für alle statistischen Betrachtungen wurde ein Signifikanzniveau von 5 % festgelegt. Nach der statistischen Analyse erfolgte die Übertragung der Ergebnisse in das Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel (Microsoft Corporation, 2010).

Als Signifikanztest für unabhängige dichotome Variablen wurde der Exakte Test nach Fisher eingesetzt (Mehta & Patel, 1986). Der Wilcoxon-Test wurde als nichtparametrischer statistischer Test für lineare Parameter und dichotome Parameter zur Überprüfung der Signifikanz der Übereinstimmung zweier Verteilungen durchgeführt (Wilcoxon, 1945). Für die grafische Darstellung von Überlebenszeitanalysen sowie die Analysen des progressionsfreien Überlebens wurde das Kaplan-Meier-Verfahren gewählt. Dieses Verfahren ermöglicht die Darstellung von Überlebensraten sowie die Angabe der medianen Überlebenszeit, sobald bei der Hälfte der Patienten des Beobachtungskollektivs ein Ereignis eintritt (Kaplan & Meier, 1958). Als Signifikanztest dieser Darstellung sowie zum statistischen Vergleich der Überlebenszeiten zweier Gruppen wurde als Standardverfahren der Log-Rank-Test verwendet. Hierbei erfolgt der Vergleich der Überlebensraten über den gesamten Beobachtungszeitraum (Mantel, 1966). Zur Untersuchung des Einflusses mehrerer Variablen auf die Überlebenszeit wurde die Cox-Regression als multivariates Testverfahren herangezogen (Cox, 1972). Voraussetzung für die Cox-Regression ist eine über die Zeit konstante Hazard

Ratio (HR). Zum Vergleich zweier Gruppen, dem Einfluss von Mutation sowie Therapie auf die Überlebenszeit, wurden die Hazardfunktionen bestimmt. Aus den Quotienten der Hazardfunktionen erfolgte die Bestimmung der Hazard Ratio als Maß für das Ereignisrisiko in einer Gruppe im Verhältnis zu einer zweiten Gruppe.

$$\text{Hazard Ratio} = \frac{h_2(t)}{h_1(t)}$$

Hazard Ratio > 1 → Ereignisrisiko in Gruppe 2 höher als in Gruppe 1

Hazard Ratio < 1 → Ereignisrisiko in Gruppe 1 höher als in Gruppe 2

Hazard Ratio = 1 → Ereignisrisiko in beiden Gruppen gleich hoch

3 Ergebnisse

3.1. Analyse der *RPS15* Mutationen

Da in vorangegangenen Analysen des gesamten *RPS15* Gens gezeigt werden konnte, dass sich bei der CLL Mutationen auf ein hoch konserviertes Areal des Exons 4 beschränken, verzichteten wir auf die Sequenzierung der Exons 1-3. Von den uns zur Verfügung stehenden Proben wiesen 4,7 % (33 von 700) Mutationen in *RPS15* auf. Es handelte sich ausschließlich um Punktmutationen im Sinne einer Substitution. Dabei beobachteten wir in 24 Fällen eine Transition, also eine Substitution einer Purinbase gegen eine andere Purinbase ($A \leftrightarrow G$), beziehungsweise den Austausch zweier Pyrimidinbasen ($C \leftrightarrow T$) gegeneinander. Am häufigsten fand sich der Austausch von Cytosin gegen Thymin, welcher in 16 Fällen beobachtet wurde. Die Transitionen der Basen Guanin zu Adenin wurde in vier Fällen beobachtet, Adenin zu Guanin in drei Fällen sowie Thymin zu Cytosin in einem Fall. In neun Fällen konnten wir eine Transversion beobachten, was entsprechend der Begriffsdefinition die Substitution von einer Purinbase gegen eine Pyrimidinbase oder andersherum bezeichnet. Dabei wurden die Transversionen $A \rightarrow C$ (1 Fall), $A \rightarrow T$ (1 Fall), $C \rightarrow A$ (2 Fälle), $C \rightarrow G$ (2 Fälle), $G \rightarrow T$ (1 Fall) und $T \rightarrow G$ (2 Fälle) beobachtet.

Bei der weiteren Einordnung der oben genannten Mutationen wurden insgesamt 18 unterschiedliche Missense Mutationen gefunden, bei denen der Basenaustausch eine Veränderung der Aminosäuresequenz herbeiführte. Daneben wurden zwei Basenpaarvariationen ohne Veränderung der Aminosäuresequenz gefunden. G124G taucht bereits in Datenbanken als Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) auf. Zudem konnten wir den Basenaustausch auch in nicht-tumor DNA bei 2 von 2 untersuchten Patienten nachweisen, was ebenfalls auf eine nicht-tumorassoziierte Veränderung hinweist. Dieser SNP wurde bei der weiteren Analyse nicht als Mutation berücksichtigt. Für I128I gehen wir von einer stillen Mutation unklarer Signifikanz aus. Die Veränderung ist nicht in einer Polymorphismus-Datenbank aufgeführt. Zudem sind mehrere stille Mutationen in *RPS15* als somatische, tumor-

assoziierte Veränderungen in der Mutationsdatenbank COSMIC annotiert, sodass wir auch bei I128I von einer solchen ausgehen.

Die Mutationen fanden sich in einer hoch konservierten Genregion, wobei 87,9 % (29 von 33) der Mutationen in einen Bereich von 10 Aminosäuren lagen.

Tabelle 12: Auflistung aller Mutationen

Dargestellt ist die genomic DNA-Position, Basenaustausch, betroffenes Codon und Aminosäure sowie Wildtyp Häufigkeit.

g.DNA: genomic DNA, WT: Wildtyp, Mut: Mutiert, AA: Aminosäure

g.DNA Position	Basen-austausch	Codon	WT Codon	Mut Codon	WT AA	Mut AA	Protein	WT
1.440.386	C > T	128	ATC	ATT	Ile	Ile	I128I	60 %
1.440.414	C > T	138	CCC	TCC	Pro	Ser	P138S	50 %
1.440.414	C > T	138	CCC	TCC	Pro	Ser	P138S	50 %
1.440.415	C > G	138	CCC	CGC	Pro	Arg	P138R	70 %
1.440.415	C > T	138	CCC	CTC	Pro	Leu	P138L	50 %
1.440.415	C > T	138	CCC	CTC	Pro	Leu	P138L	90 %
1.440.417	G > A	139	GGC	AGC	Gly	Ser	G139S	90 %
1.440.421	T > G	140	ATC	AGC	Ile	Ser	I140S	90 %
1.440.421	T > G	140	ATC	AGC	Ile	Ser	I140S	80 %
1.440.423	G > A	141	GGG	AGG	Gly	Arg	G141R	40 %
1.440.423	G > A	141	GGG	AGG	Gly	Arg	G141R	60 %
1.440.429	A > G	143	ACC	GCC	Thr	Ala	T143A	50 %
1.440.429	A > G	143	ACC	GCC	Thr	Ala	T143A	60 %
1.440.429	A > G	143	ACC	GCC	Thr	Ala	T143A	40 %
1.440.432	C > G	144	CAC	GAC	His	Asp	H144D	70 %
1.440.432	C > T	144	CAC	TAC	His	Tyr	H144Y	60 %
1.440.432	C > T	144	CAC	TAC	His	Tyr	H144Y	90 %
1.440.436	C > T	145	TCC	TTC	Ser	Phe	S145F	50 %
1.440.436	C > T	145	TCC	TTC	Ser	Phe	S145F	60 %
1.440.436	C > T	145	TCC	TTC	Ser	Phe	S145F	50 %
1.440.436	C > T	145	TCC	TTC	Ser	Phe	S145F	80 %

1.440.436	C > T	145	TCC	TTC	Ser	Phe	S145F	50 %
1.440.436	C > T	145	TCC	TTC	Ser	Phe	S145F	90 %
1.440.436	C > A	145	TCC	TAC	Ser	Tyr	S145Y	50 %
1.440.438	T > C	146	TCC	CCC	Ser	Pro	S146P	50 %
1.440.439	C > T	146	TCC	TTC	Ser	Phe	S146F	50 %
1.440.439	C > T	146	TCC	TTC	Ser	Phe	S146F	40 %
1.440.439	C > T	146	TCC	TTC	Ser	Phe	S146F	40 %
1.440.439	C > A	146	TCC	TAC	Ser	Tyr	S146Y	40 %
1.440.442	G > A	147	CGC	CAC	Arg	His	R147H	90 %
1.440.456	A > C	152	AAG	CAG	Lys	Gln	K152Q	50 %
1.440.457	A > T	152	AAG	TAG	Lys	Met	K152M	80 %
1.440.458	G > T	152	AAG	AAT	Lys	Asn	K152N	50 %

3.2. Assoziation zwischen *RPS15* Mutationen und anderen Merkmalen

Um mögliche Mutationsmuster zu erkennen, hatten wir die Möglichkeit, innerhalb der CLL11 Kohorte nach Zusammenhängen zwischen *RPS15* Mutationen und klinischen sowie genetischen Merkmalen zu suchen.

Ein Zusammenhang zwischen *RPS15* Mutationen und Alter, Geschlecht, Binet Stadium, dem Vorhandensein von B-Symptomen, ECOG- oder CIRS-Score wurde nicht gefunden.

Bei der Betrachtung der Leukozytenzahlen beobachteten wir bei Patienten mit mutiertem *RPS15* Status signifikant häufiger eine erhöhte Leukozytenzahl. Unter den Patienten mit *RPS15* Mutation fand sich bei 29 der 33 Patienten eine Leukozytenzahl von $50 \times 10^9/L$ oder höher, was einem Anteil von 87,9 % entspricht. In der Vergleichsgruppe ohne *RPS15* Mutation trat diese Laborkonstellation bei 431 der 666 Patienten auf, was einem Anteil von 64,7 % entspricht ($p = 0,006$).

Ein Zusammenhang zwischen den Serummarkern Thymidinkinase sowie β_2 -Mikroglobulin mit *RPS15* Mutationen besteht in der untersuchten Population nicht. Des Weiteren wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen *RPS15* Mutationen und anderen genetischen Faktoren besteht.

Dabei fiel auf, dass ein Großteil der Patienten mit Mutationen im *RPS15* Gen einen unmutierten IGHV-Status aufweist, was ebenfalls ein ungünstiger prognostischer Faktor ist. Es wurden 673 Patienten auf den *RPS15* sowie auf den IGHV-Status untersucht. Von diesen 673 Proben wurden 31 Proben positiv auf *RPS15* Mutationen getestet. 30 von 31 (96,8 %) *RPS15* mutierten Patienten hatten einen unmutierten IGHV-Status, ein Patient war in IGHV hypermutiert. Bei Patienten mit *RPS15* Wildtyp fand sich ein Anteil von 61,8 % ($n = 397$) mit unmutiertem IGHV-Status ($p < 0,001$).

Ein weiterer signifikanter Zusammenhang wurde beim Auftreten von *TP53* Mutationen beobachtet. Von 690 Patienten, deren genetischer Status sowohl auf *TP53* Mutationen als auch auf Mutationen im *RPS15* Gen untersucht wurde, zeigte sich bei 32 dieser Patienten eine Mutation im *RPS15* Gen. Bei insgesamt 67 der 690 Patienten konnte eine *TP53* Mutation nachgewiesen werden. Aufgefallen ist hier, dass ein vergleichsweise hoher Anteil an Patienten mit positivem *RPS15* Status ebenfalls eine Mutation im *TP53* Gen aufwies. Bei Patienten ohne *RPS15* Mutation lag die Mutationshäufigkeit von *TP53* bei 9,1 % ($n = 60$). Im Gegensatz dazu fand sich bei 21,9 % ($n = 7$) der Patienten mit *RPS15* Mutationen ebenfalls ein mutiertes *TP53* ($p = 0,028$).

Das Auftreten weiterer genetischer Marker wurde auf eine Assoziation mit *RPS15* untersucht. Es konnte allerdings kein Zusammenhang mit dem Auftreten der chromosomalen Aberrationen 17p Deletion, 11q Deletion oder Trisomie 12 hergestellt werden. Auch andere Genmutationen wie in *SF3B1* oder *NOTCH1* korrelierten nicht mit dem *RPS15* Mutationsstatus.

Bei der Betrachtung der CLL-IPI Risikogruppen fand sich ein Zusammenhang zwischen *RPS15* Mutation und der Zuordnung zu den Risikogruppen „hoch“ beziehungsweise „sehr hoch“. 27 der 33 Patienten (81,8 %) mit *RPS15* Mutation waren den Risikogruppen „hoch“ oder „sehr hoch“ zugeordnet. Auf Patienten ohne *RPS15* Mutation traf dies in 396 Fällen bei 655 Patienten zu, was einem Anteil von 60,5 % entspricht. Die Assoziation zwischen hoher Risikoeinordnung in der CLL-IPI Klassifikation und *RPS15* Mutation zeigte sich in unserer Kohorte als signifikant ($p = 0,014$) und ist maßgeblich auf die hohe Co-Inzidenz mit mutiertem *TP53* und unmutiertem IGHV-Status zurückzuführen.

3.3. Auswirkung auf Therapieansprechen, progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben

Das Therapieansprechen, das progressionsfreie Überleben sowie das Gesamtüberleben wurde zunächst in allen drei Therapiearmen zusammen betrachtet, unabhängig von der jeweiligen Therapie. Untersucht wurde das Therapieansprechen, definiert durch die iwCLL Kriterien (International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia) im Sinne einer kompletten Remission (Abwesenheit einer Lymphozytose im peripheren Blut, Abwesenheit einer Lymphadenopathie, Hepatomegalie oder Splenomegalie, Abwesenheit eines Knochenmarkbefalls sowie Symptombefreiheit und normales Blutbild), einer partiellen Remission ($\geq 50\%$ Abfall der Lymphozytenzahl, $\geq 50\%$ Reduktion der Lymphadenopathie oder $\geq 50\%$ Reduktion der Leber- oder Milzgröße, in Kombination mit einer Verbesserung des Blutbildes) oder einem Nicht-Ansprechen auf die Therapie. Des Weiteren wurde das Therapieansprechen mit Hilfe des Status der minimalen Resterkrankung (MRD) betrachtet.

Patienten ohne *RPS15* Mutation erreichten in 18,7 % ($n = 110$) eine komplette Remission, in 57,1 % ($n = 336$) eine partielle Remission und in 24,1 % ($n = 142$) kam es zu einem Nicht-Ansprechen auf die Therapie. Im Vergleich dazu zeigten Patienten mit *RPS15* Mutation eine komplette Remission in 9,7 % ($n = 3$), eine partielle Remission in 61,3 % ($n = 19$) sowie ein Nicht-Ansprechen in 29 % ($n = 9$). Somit erreichten Patienten mit *RPS15* Mutation etwas seltener komplette Remissionen, der Unterschied war allerdings nicht signifikant ($p = 0,205$). Bei 11,8 % ($n = 79$) der Patienten ohne Mutation ebenso wie bei 6,1 % ($n = 2$) der Patienten mit *RPS15* Mutationen lagen keine Daten bezüglich der Remission vor.

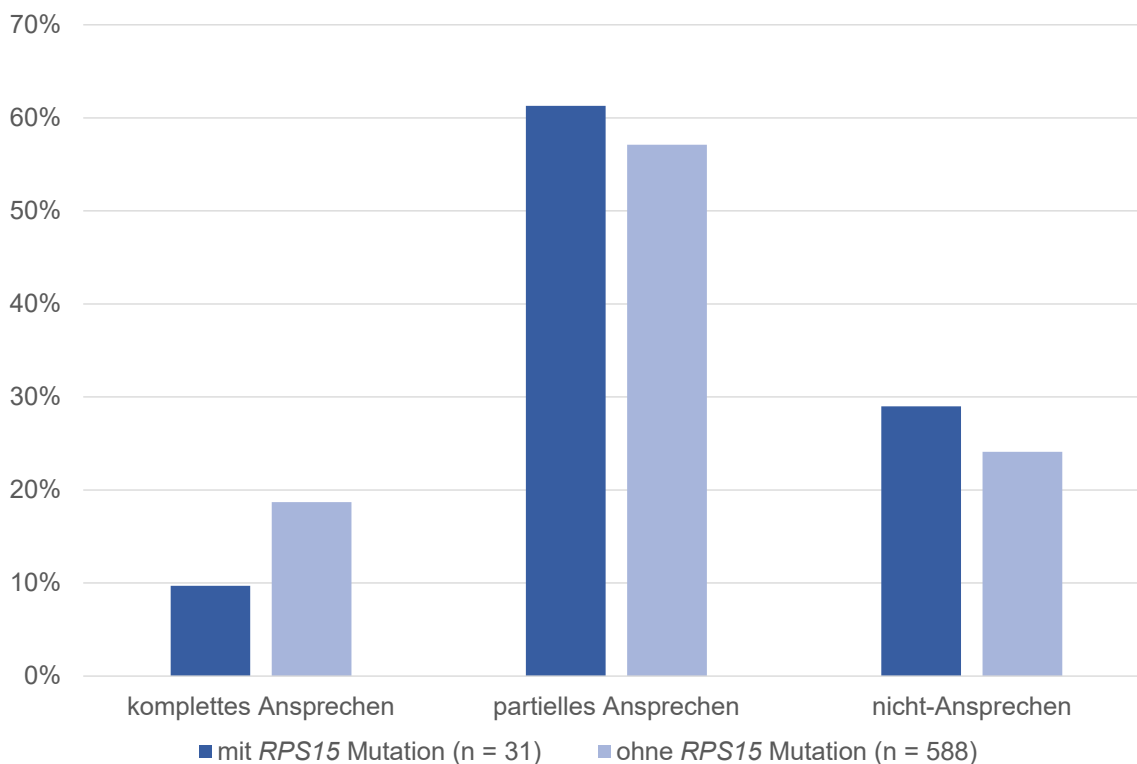


Abbildung 3: Säulendiagramm zur Darstellung des Therapieansprechens für 619 Patienten aus der CLL11 Studie

Als weiterer Indikator für das Therapieansprechen wurde bestimmt, bei wie vielen Patienten nach Therapieende eine nicht-detektierbare minimale Resterkrankung erreicht werden konnte. Die MRD Freiheit ist definiert als Vorkommen von weniger als einer Leukämiezelle unter 10.000 (1×10^4) regulären Lymphozyten. Für 24 Patienten mit *RPS15* Mutation lagen Ergebnisse bezüglich des MRD Status vor. Von diesen erreichte keiner den Status MRD negativ. Im Vergleichskollektiv ohne entsprechende Mutation kam es bei 83 (17,1 %) zu einer Beseitigung der MRD ($p = 0,021$).

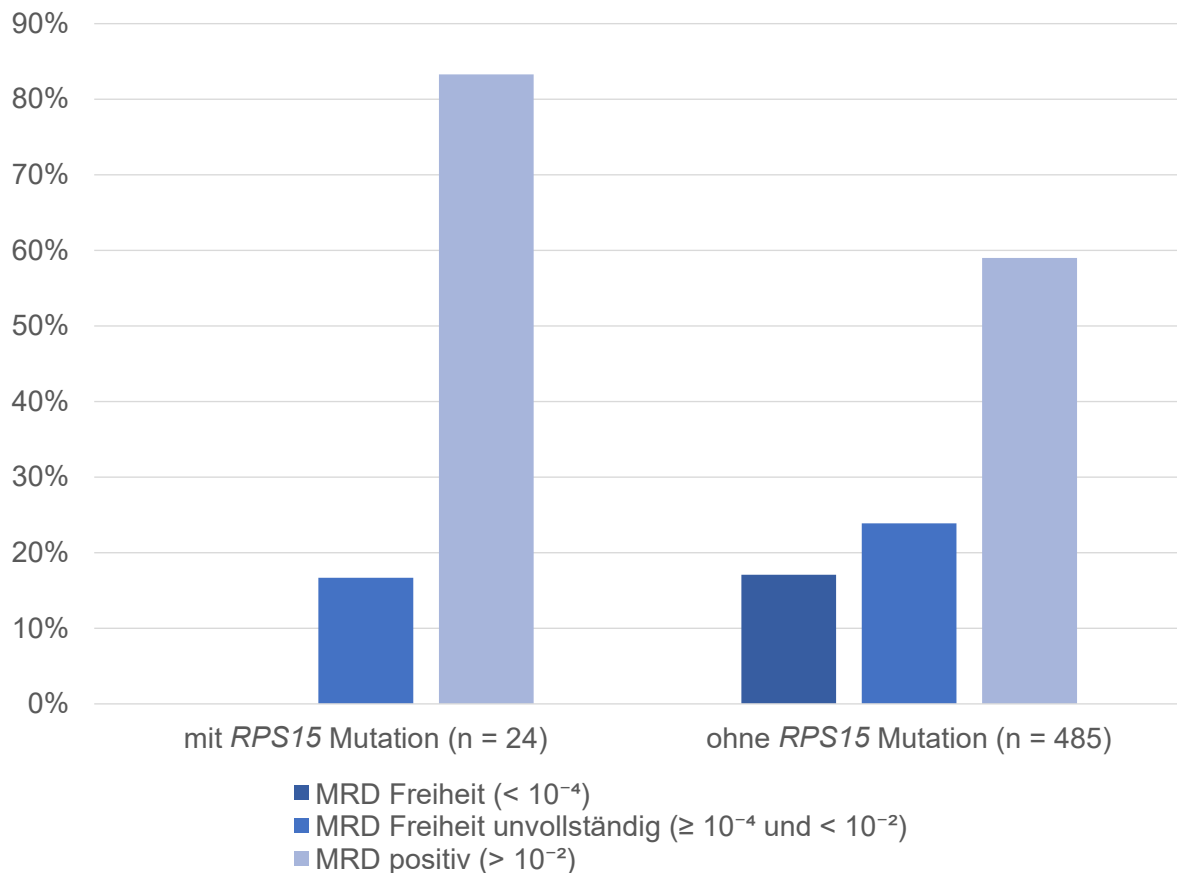
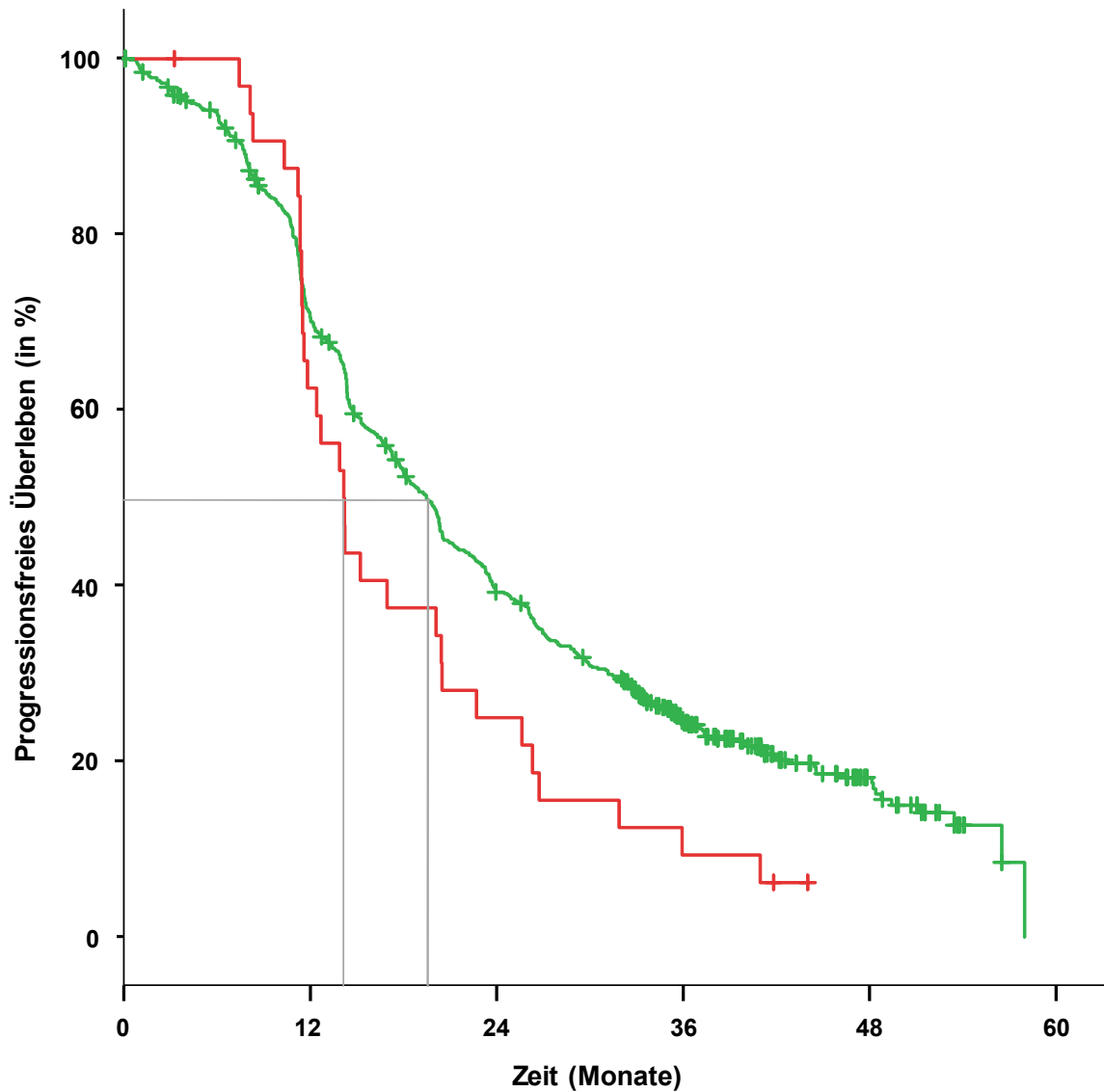


Abbildung 4: Säulendiagramm zur Darstellung der Beseitigung der Minimalen Resterkrankung (MRD) für 509 Patienten aus der CLL11 Studie

Um zu beurteilen, ob es sich bei Mutationen im *RPS15* Gen um prognostisch relevante Veränderungen handelt, wurden des Weiteren das progressionsfreie Überleben (PFS) sowie das Gesamtüberleben von Patienten mit und ohne Mutationen verglichen. Das PFS wurde dabei definiert als Zeitspanne von Therapiebeginn bis zum Auftreten einer Progression, eines Rückfalles oder des Todes.

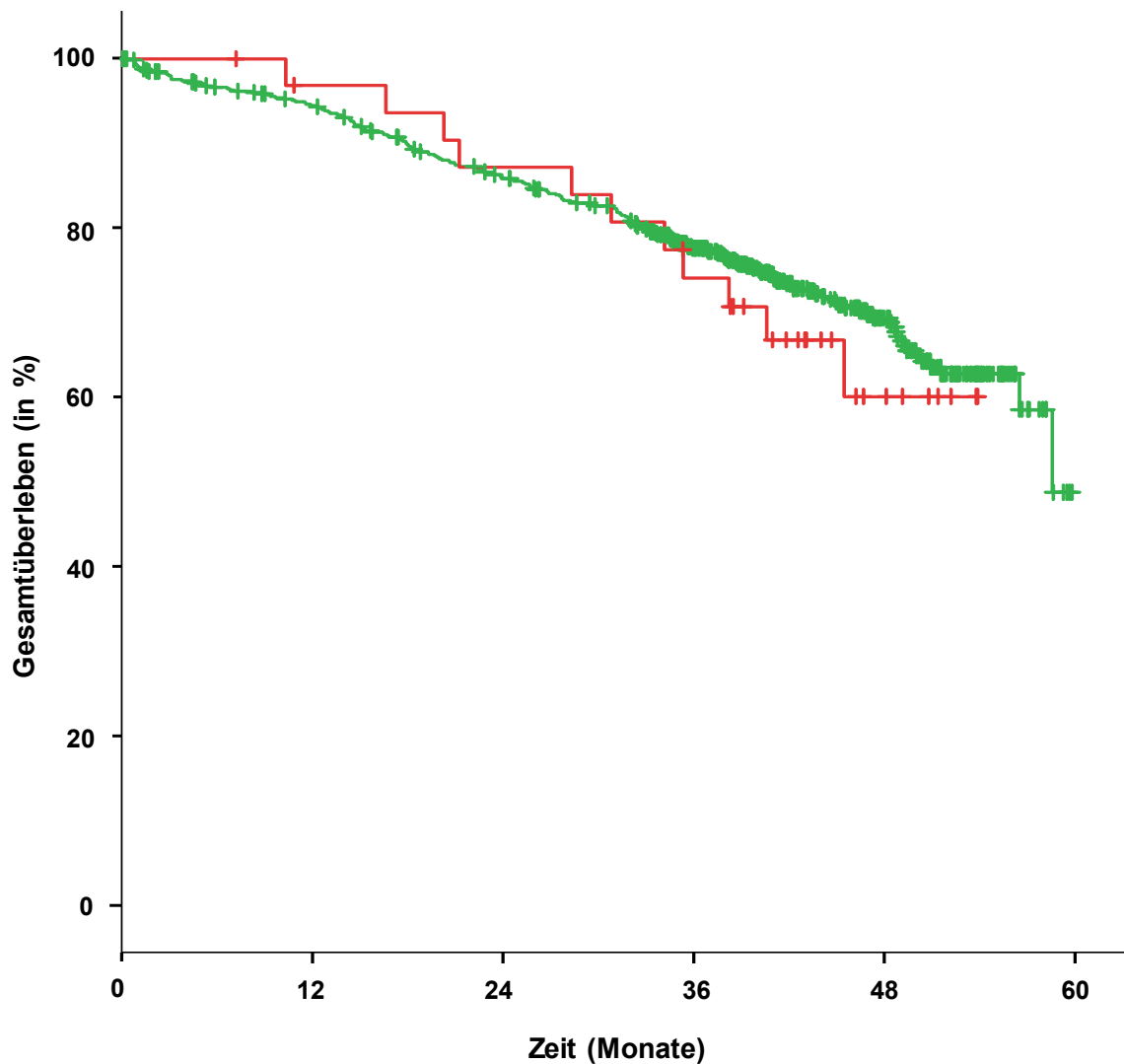
Es wurde ein kürzeres PFS bei Patienten mit Mutationen im *RPS15* Gen beobachtet. Bei Patienten ohne *RPS15* Mutation (n = 667 mit 503 Events) lag das mediane PFS bei 19,4 Monaten. Patienten mit Mutation in *RPS15* (n = 33 mit 30 Events) erreichten ein medianes PFS von 14,1 Monaten. Mit einem p-Wert von 0,03 ist somit ein mutierter *RPS15* Status mit einem signifikant kürzeren PFS assoziiert (Log-Rank-Test, Signifikanzniveau $\alpha = 5\%$). Die Hazard Ratio hierfür beträgt 1,502, wobei das 95 % Konfidenzintervall von 1,038 bis 2,173 reicht.



- mit *RPS15* Mutation (n = 33 Patienten)
- ohne *RPS15* Mutation (n = 667 Patienten)

Abbildung 5: Progressionsfreies Überleben dargestellt nach Kaplan-Meier für 700 Patienten aus der CLL11 Studie

Des Weiteren wurde das Gesamtüberleben betrachtet. Dabei wurde die Zeit zwischen Studienaufnahme und Zeitpunkt des Todes aufgrund jeglicher Ursache berücksichtigt. Bei den 667 Patienten mit *RPS15* Wildtyp kam es zu 184 Todesfällen während des Beobachtungszeitraumes. In der Vergleichsgruppe mit Mutation im entsprechenden Gen verstarben 11 von 33 Patienten. Bei der statistischen Auswertung konnte kein signifikanter Unterschied bezogen auf das Gesamtüberleben zwischen den zwei Gruppen beobachtet werden. Das festgelegte Signifikanzniveau ($\alpha = 5\%$) wurde nicht erreicht.



— mit *RPS15* Mutation (n = 33 Patienten)
 — ohne *RPS15* Mutation (n = 667 Patienten)

Abbildung 6: Gesamtüberleben dargestellt nach Kaplan-Meier für 700 Patienten aus der CLL11 Studie

3.4. Getrennte Betrachtung der drei Therapiearme

Da das Therapieansprechen und das progressionsfreie Überleben der drei Therapiearme Unterschiede aufweist und die prognostische Wertigkeit von *RPS15* möglichst unabhängig von der Therapie sein sollte, werden im Folgenden die Therapiearme im Einzelnen betrachtet.

Ein positiver *RPS15* Status fand sich mit folgender Verteilung in den drei Therapiearmen: Clb 3 von 100 (3 %) Patienten, R-Clb 16 von 297 (5,4 %) Patienten, G-Clb 14 von 303 (4,6 %) Patienten. Da im Therapiearm mit Clb nur drei Patienten

mit mutiertem *RPS15* Status vertreten sind, ist er für eine Subgruppenanalyse ungeeignet und wurde bei der weiteren Analyse nicht berücksichtigt.

Untersucht wurden Unterschiede im Ansprechen in den Therapiearmen R-Clb und G-Clb der CLL11 Studie. Dabei wurden komplette Remission, partielle Remission sowie Nicht-Ansprechen auf die Therapie analysiert. In der R-Clb sowie der G-Clb Gruppe zeigte sich ein leichter Trend zu einem geringeren Auftreten kompletter Remissionen (R-Clb: 10,9 % *RPS15*unmut vs. 6,7 % *RPS15*mut; G-Clb: 32,4 % *RPS15*unmut vs. 15,4 % *RPS15*mut), der sich allerdings statistisch als nicht signifikant erwies.

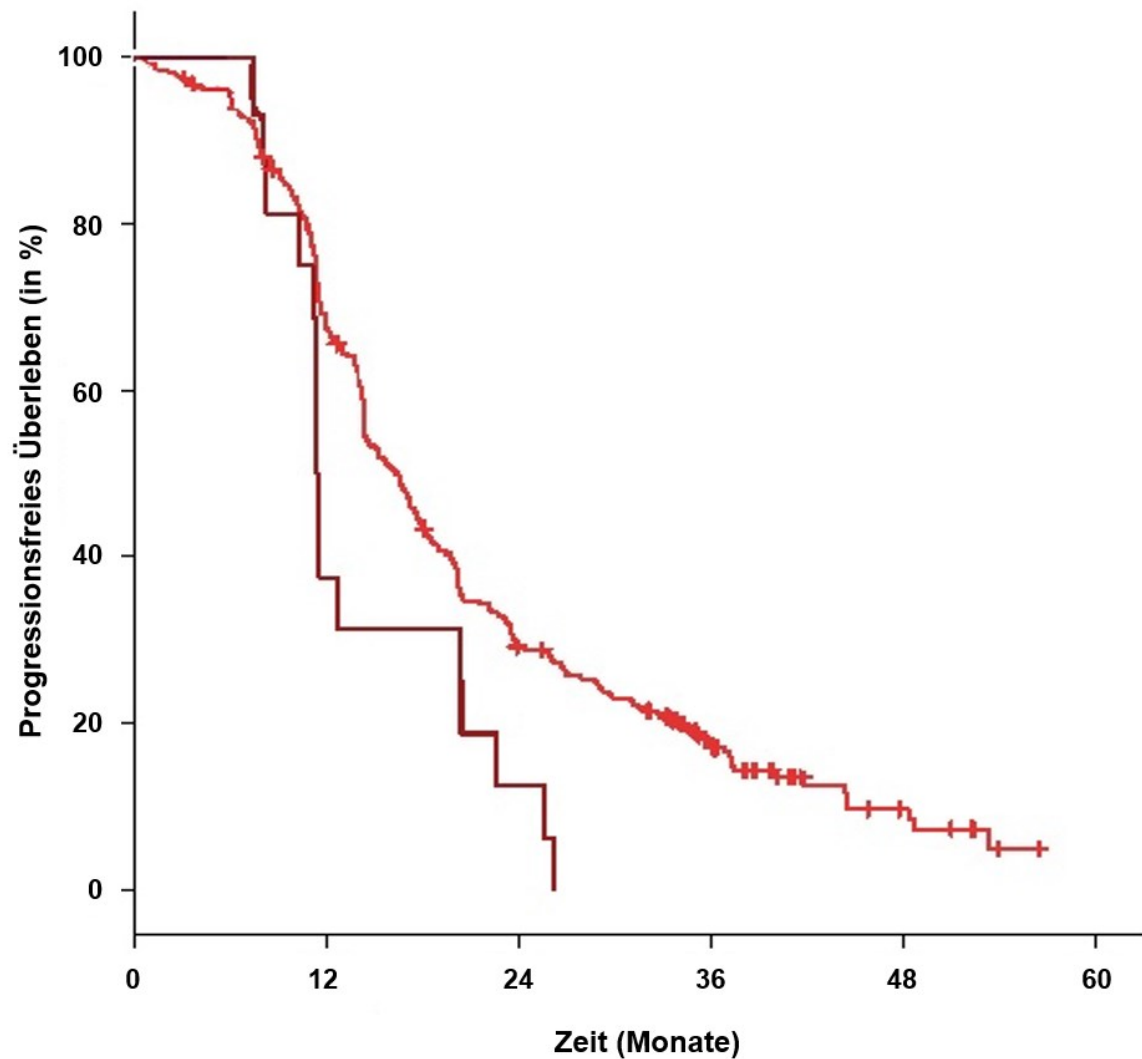
Tabelle 13: Therapieansprechen innerhalb der Therapiearme bei Patienten mit und ohne *RPS15* Mutation

Angaben in absoluten Zahlen, prozentualer Anteil in Klammern

	<i>RPS15</i> Unmutiert	<i>RPS15</i> Mutation	p-Wert
R-Clb	n = 281	n = 16	
Komplette Remission	28 (10,9)	1 (6,7)	0,545
Partielle Remission	158 (61,7)	8 (53,3)	
Nicht-ansprechen	70 (27,3)	6 (40,0)	
Fehlende Daten	25 (8,9)	1 (6,3)	
G-Clb	n = 289	n = 14	
Komplette Remission	81 (32,4)	2 (15,4)	0,381
Partielle Remission	145 (58,0)	10 (76,9)	
Nicht-Ansprechen	24 (9,6)	1 (7,7)	

Das mediane PFS aller untersuchten CLL11 Patienten lag im Mittel bei 19,2 Monaten mit einem medianen Beobachtungszeitraum von 41,6 Monaten.

Bei Patienten unter R-Clb Therapie lag das mediane PFS mit unmutiertem *RPS15* Status bei 16,5 Monaten, mit mutiertem *RPS15* Status bei 11,4 Monaten. In der Cox-Regression ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied des PFS zu Ungunsten der Patienten mit Mutation (HR 1,89 [1,13 - 3,15]; p = 0,015).

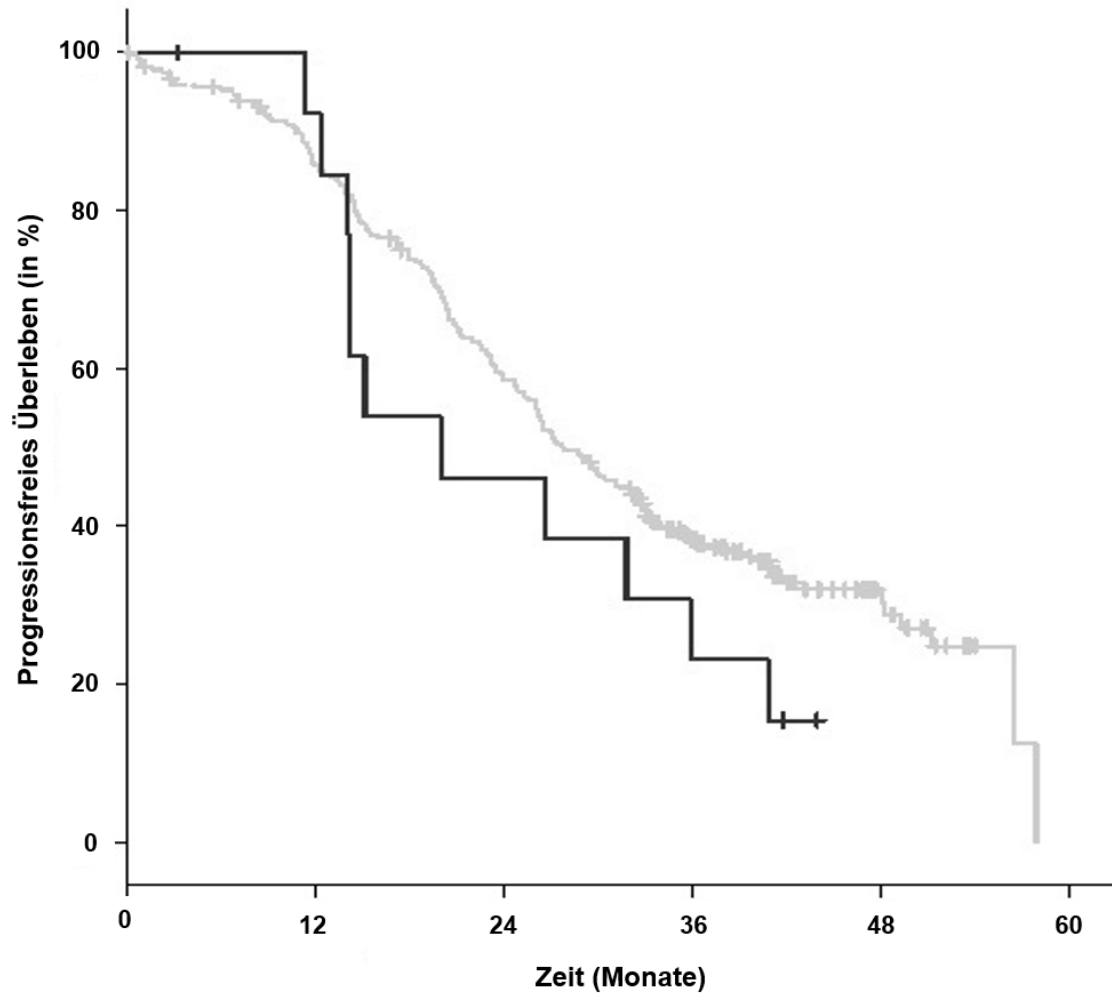


— mit *RPS15* Mutation (n = 16 Patienten)

— ohne *RPS15* Mutation (n = 281 Patienten)

Abbildung 7: Progressionsfreies Überleben dargestellt nach Kaplan-Meier für 297 Patienten aus der CLL11 Studie unter R-Clb Therapie

Unter G-Clb Therapie erreichten Patienten ohne *RPS15* Mutation ein medianes PFS von 27,7 Monaten, mit *RPS15* Mutation wurde ein medianes PFS von 20,0 Monaten erreicht. Der sichtbare Trend zu einem verminderten PFS für Patienten mit *RPS15* Mutation erwies sich in der Cox-Regression allerdings als nicht signifikant (HR 1,525 [0,83 - 2,81]; p = 0,175).



— mit *RPS15* Mutation (n = 14 Patienten)

— ohne *RPS15* Mutation (n = 289 Patienten)

Abbildung 8: Progressionsfreies Überleben dargestellt nach Kaplan-Meier für 303 Patienten aus der CLL11 Studie unter G-Clb Therapie

Die Therapie mit G-Clb bei Patienten ohne und mit *RPS15* Mutation erweist sich in unserer Studienpopulation der Therapie mit R-Clb überlegen, betrachtet man das PFS mit Hilfe der Cox-Regression.

R-Clb vs. G-Clb:

*RPS15*unmut: HR 2,01 [1,65 - 2,44]; $p < 0,001$

*RPS15*mut: HR 3,71 [1,50 - 9,18]; $p = 0,005$

Eine Untersuchung des Vorteils bezüglich des PFS durch die Hinzunahme von Obinutuzumab oder Rituximab zu Chlorambucil bei Patienten mit mutiertem *RPS15* Status konnte nicht erfolgen, da im Studienarm nur drei Patienten mit *RPS15* Mutation vertreten waren.

3.5. Multivariate Analyse

Eine multivariate Analyse wurde für das progressionsfreie Überleben durchgeführt, um festzustellen, bei welchen prognostischen Markern es sich um unabhängige Faktoren handelt. Betrachtet wurden hierfür alle Patienten, von denen Proben vorlagen ($n = 700$). Für die multivariate Analyse wurden nur Faktoren zugelassen, die in der univariaten Analyse als prognostisch relevant identifiziert wurden. Univariat untersucht wurden Therapie, Alter, Geschlecht, Binet Stadium, B-Symptome, ECOG-Performance, CIRS-Score, Serum β_2 -Mikroglobulin, Serum Thymidinkinase, Deletion 17p, Deletion 11q, Trisomie 12, Deletion 13q, IGHV Mutationsstatus, *TP53* Mutationsstatus, *TP53* Mutation und/oder Deletion 17p, *SF3B1* Mutationsstatus, *NOTCH1* Mutationsstatus, *NOTCH1* 3'UTR Mutationsstatus sowie *RPS15* Mutationsstatus. Das Signifikanzniveau wurde festgelegt mit $\alpha = 5\%$. In die multivariate Analyse wurden nur Faktoren eingeschlossen, die in der univariaten Analyse mit signifikant kürzerem PFS assoziiert waren. Hierzu gehören die Therapiearme (R-Clb vs. Clb; G-Clb vs. Clb; R-Clb vs. G-Clb), Binet Stadium (A vs. B/C), Serum β_2 -Mikroglobulin ($> 3,5$ mg/l vs. $\leq 3,5$ mg/l), Serum Thymidinkinase (> 10 U/l vs. ≤ 10 U/l), Deletion 17p, Deletion 11q, IGHV Mutationsstatus, *TP53* Mutationsstatus, *TP53* Mutation und/oder Deletion 17p, *NOTCH1* Mutationsstatus, *RPS15* Mutationsstatus.

In der folgenden Tabelle sind alle Faktoren aufgeführt, die sich in der multivariaten Analyse als unabhängige Einflussfaktoren auf das PFS zeigten. *RPS15* zeigte sich in unserer Kohorte nicht als unabhängiger prognostischer Faktor.

Tabelle 14: Einflussfaktoren auf das PFS in der multivariaten Analyse mit Cox-Regression

Einflussfaktor	Hazard Ratio	95 % Konfidenzintervall	p-Wert
R-Clb vs. Clb	0,492	0,380 - 0,636	< 0,001
G-Clb vs. Clb	0,211	0,161 - 0,277	< 0,001
Binet A	0,795	0,636 - 0,993	0,043
Serum Thymidinkinase > 10 U/l	1,209	1,006 - 1,452	0,043
del17p	1,848	1,206 - 2,832	0,005
del11q	1,366	1,083 - 1,723	0,009
IGHVunmut	1,974	1,610 - 2,422	< 0,001
<i>TP53</i> mut	1,923	1,323 - 2,796	0,001

4 Diskussion

Während einige CLL Patienten einen indolenten Krankheitsverlauf haben und ohne Therapie über Jahre hinweg symptomlos bleiben, sind auch rasch progrediente Verläufe mit früher Therapienotwendigkeit und kurzen Remissionsdauern nicht selten. In dem Bestreben, den Krankheitsverlauf schon bei Diagnosestellung besser einschätzen zu können, werden Faktoren gesucht, die einen prognostischen Aussagewert besitzen. Durch die Entdeckung biologischer Marker, wie IGHV-Status sowie die Untersuchung von zytogenetischen Veränderungen, konnten Fortschritte hinsichtlich dieses Ziels erreicht werden (Hamblin et al., 1999; Döhner et al., 2000). Heute ist auch die Testung des *TP53* Mutationsstatus fester Bestandteil bei der Therapieplanung und seit den neuen Möglichkeiten durch Whole Exome Sequencing sind viele neue Mutationsspotspots wie auch das hier betrachtete *RPS15* Gen in den Fokus der Aufmerksamkeit gerückt.

Durch die CLL11 Studie ergab sich für unsere Untersuchungen die Möglichkeit ein sehr großes Studienkollektiv auf Mutationen im *RPS15* Gen zu untersuchen, welches bereits zuvor als prognostischer Faktor identifiziert werden konnte. Dabei handelt es sich bei der Studie um das bisher größte therapienaive Patientenkollektiv, welches auf den *RPS15* Status hin untersucht wurde. Eingeschlossen in die Studie wurden ausschließlich Patienten mit Therapieindikation, um ein homogenes Patientenkollektiv zu gewinnen. Der größte Vorteil einer klinischen Studie ist die standardisierte Erfassung und Prüfung von klinischen Daten einschließlich einer unabhängigen Beurteilung von Art und Dauer des Ansprechens. Ein weiterer Vorteil der Studienkohorte ist, dass für diese Studienpopulation detaillierte Daten zu Molekulargenetik, zytogenetischen Faktoren sowie laborchemischen und immunserologischen Parametern aus akkreditierten Zentrallaboren vorliegen. Eine Nachbeobachtungszeit von fünf Jahren ermöglicht eine fundierte Aussage über die prognostische Bedeutung der *RPS15* Mutation. Durch die dreiarms angelegte Therapiestudie bestand zudem die Möglichkeit zu untersuchen, ob *RPS15* einen prädiktiven Vorhersagewert besitzt. Bisher gab es keine vergleichbar große Studienkohorte mit diesen Voraussetzungen. Ljungström

et al. untersuchten zwar ein größeres Patientenkollektiv (n = 1119), jedoch ist dies eine Ansammlung von Proben von Patienten unterschiedlicher Krankheitsstadien, unterschiedlicher Zentren und mäßiger Verfügbarkeit weiterer Parameter – zusammenfassend eine sehr heterogene Kohorte, die sogar Richter Syndrome (Transformation der CLL in ein aggressives Lymphom) beinhaltete. Eingeschlossen wurden zudem sowohl vorbehandelte als auch therapienaive Patienten (Ljungström et al., 2016). Landau et al. untersuchten ein zu unserer Studienpopulation vergleichbares Patientenkollektiv therapienaiver Patienten aus der CLL8 Studie mittels Exomanalyse von 278 Patienten (Landau et al. 2015). Trotz der deutlich kleineren Gruppe fand sich auch hier ein verkürztes progressionsfreies Überleben. Weitere Studien erfolgten in Patientenkollektiven ohne Therapieindikation mit kleinerer Studienkohorte als in unserer Studie (Puente et al., 2015; Bretones et al., 2018). Zudem wurde der *RPS15* Mutationsstatus in einer Studie mit einem Patientenkollektiv, angereichert mit Patienten mit Deletion 17p, untersucht (Yu et al., 2017).

Im Vergleich mit allen bisher untersuchten Studienkohorten eignet sich unsere Studie am besten, um eine Aussage über die prognostische Relevanz des *RPS15* Status zu treffen, da es sich um eine große homogene Studienkohorte handelt ohne Vorselektion auf weitere genetische Merkmale. Darüber hinaus ist der Untersuchungszeitpunkt zum Therapieeintritt sinnvoll gewählt, weil der genetische Status keinen Einfluss auf den Zeitpunkt des Therapiebeginns haben sollte. Bei fortschreitenden Möglichkeiten der genetischen Forschung sollten keine voreiligen Therapieentscheidungen getroffen werden, da eine Therapie einen Selektionsdruck ausüben kann, wie Landau et al. nahelegen (Landau et al., 2013). Darüber hinaus orientiert er sich am Untersuchungszeitpunkt der *TP53* Mutation, der einzigen Mutationsanalyse, welche in den aktuellen Leitlinien routinemäßig durchgeführt wird (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF).

In der Kohorte der CLL11 Studie wurde das Auftreten von Mutationen im *RPS15* Gen mit einer Häufigkeit von 4,7 % beobachtet, was sich auch mit den Ergebnissen aus der CLL8 Studienkohorte deckt, in welcher *RPS15* mit vergleichbarer Mutationsfrequenz von 4,3 % beschrieben wurde (Landau et al., 2015). Bei der Betrachtung der anderen Arbeiten, welche sich mit *RPS15* Mutationen beschäftigen, fällt auf, dass Mutationen häufiger bei Patienten mit fortgeschrittenem oder ungünstigem Krankheitsverlauf auftreten als bei Patienten in einem frühen

Krankheitsstadium. Bei Patienten ohne Therapieindikation wurde die Mutation deutlich seltener beobachtet als in unserem Studienkollektiv (1,8 % bei n = 216) (Bretones et al., 2018). Bei Patienten mit Rückfall unter FCR Therapie zeigte sich mit 19,5 % (8 von 41) ein deutlich höherer Anteil an Patienten mit *RPS15* Mutation (Ljungström et al., 2016). Diese Häufung von *RPS15* Mutationen bei Patienten mit ungünstigem beziehungsweise fortgeschrittenem Verlauf deutet bereits auf einen negativen prognostischen Effekt von *RPS15* hin.

Im Vergleich zu anderen Genen, in denen bei CLL Patienten gehäuft Mutationen auftreten, sind *RPS15* Mutationen verhältnismäßig selten. So konnten beispielsweise im selben Patientenkollektiv deutlich höhere Mutationsfrequenzen für *TP53* (9,8 %), *NOTCH1* (18,6 %) und *SF3B1* (12,9 %) beobachtet werden.

Wir beobachteten das Auftreten der Mutationen in *RPS15* in einer hoch konservierten Genregion (87,9 % der Veränderungen in einem Bereich beschränkt auf 10 Aminosäuren). Auch andere Arbeiten, welche sich mit den Mutationen in *RPS15* beschäftigten, fanden die Mutationen in *RPS15* in einem umschriebenen Bereich das C-terminale Ende des Gens betreffend (Bretones et al., 2018). Dieser Umstand spricht dafür, dass ein Selektionsvorteil für Zellen besteht, welche Mutationen in diesem Genbereich tragen.

Des Weiteren betrachteten wir die Koexistenz von mutiertem *RPS15* Status und anderen molekularen Markern. Der Einfluss genetischer Subtypen auf den Krankheitsverlauf lässt die Forderung nach neuen prognostischen Modellen aufkommen, bei denen Mutationen nicht nur singulär als Risikofaktoren betrachtet, sondern auch deren Kombination und Akkumulation berücksichtigt werden (Guièze et al., 2015). In unserer Kohorte konnte ein Zusammenhang mit ungünstigen Prognosemarkern und dem Auftreten von *RPS15* Mutationen festgestellt werden. Es zeigte sich ein sehr starker Zusammenhang zwischen dem Auftreten von *RPS15* Mutationen und einem unmutierten IGHV-Status. In der untersuchten Kohorte zeigten, mit Ausnahme eines Patienten, alle *RPS15* mutierten Patienten diese prognostisch ungünstige Variante. Ljungström et al. hatten in einer Kohorte mit 185 IGHV mutierten Proben keine einzige *RPS15* Mutation gefunden, was ebenfalls für eine Assoziation zwischen *RPS15* Mutation und unmutiertem IGHV-Status spricht (Ljungström et al., 2016). Auch ein mutierter *TP53* Status, der mit einer schlechten Prognose sowie schlechtem Therapieansprechen auf Standardtherapeutika einhergeht, wurde gehäuft bei *RPS15* mutierten Patienten gefunden. Bei Patienten

mit mutiertem *RPS15* Status fanden wir bei 22 % ebenfalls einen mutierten *TP53* Status signifikant häufiger als in der Kontrollgruppe mit *RPS15* Wildtyp. Dieser Zusammenhang zwischen *RPS15* Mutationsstatus und *TP53* Status wurde ebenso von Ljungström et al. beobachtet; *TP53* Mutationen und/oder eine Deletion 17p kamen bei Patienten mit *RPS15* Mutation signifikant häufiger vor verglichen mit Patienten mit *RPS15* Wildtyp (36 % vs. 18 %, $p < 0,01$) (Ljungström et al., 2016). Yu et al. beobachteten bei Patienten mit Deletion 17p ebenfalls eine Häufung von *RPS15* Mutationen verglichen mit Patienten ohne diese Deletion (12 % vs. 2,5 %, $p < 0,05$) (Yu et al., 2017).

Neben *TP53* Mutationen gehören *NOTCH1* und *SF3B1* Mutationen zu häufigen genetischen Läsionen bei CLL Patienten mit negativem prognostischem Effekt (Gruber & Wu, 2014). Ein Zusammenhang zwischen dem gemeinsamen Auftreten von *RPS15* Mutationen und *NOTCH1* oder *SF3B1* Läsionen konnte in unserer Studie nicht gezeigt werden.

Aus funktioneller Sicht ist das gehäufte Auftreten von *RPS15* Mutationen bei Patienten mit *TP53* Mutation interessant, wenn man die Annahme zugrunde legt, dass die Mutation Auswirkungen auf die MDM2-p53-MDMX Regulation hat. Yu et al. beobachteten einen Fall mit biallelischer *TP53* Mutation ohne erfassbare *TP53* Proteinexpression. Dieser Umstand lässt annehmen, dass es zudem auch *TP53* unabhängige funktionelle Konsequenzen von *RPS15* Mutationen gibt.

Neben seiner Funktion in der Apoptoseregulation besitzt *RPS15* zudem, als Bestandteil der Ribosomen, eine Rolle bei der Proteintranslation. Bretones et al. konnten zeigen, dass auch mutiertes *RPS15* Protein Teil der Ribosomen werden kann. Hierdurch kann ein direkter Einfluss auf die Proteinbiosynthese ausgeübt werden. So könnte ein Wandel in ein hyperproliferatives System entstehen.

Beim Betrachten des Therapieansprechens zeigte sich ein Trend für eine geringere Rate an kompletten Remissionen bei Patienten mit *RPS15* Mutation, welcher sich jedoch nicht als statistisch signifikant erwies. Bezüglich der Beseitigung der minimalen Resterkrankung zeigte sich jedoch ein signifikanter Unterschied. So kam es im Kollektiv der Patienten mit *RPS15* Mutation bei keinem Patienten zu einer Beseitigung der minimalen Resterkrankung nach dem Ende der Therapie. Im Gegensatz dazu erreichten bei den Patienten ohne mutierten *RPS15* Status 17 % eine vollständige Beseitigung der minimalen Resterkrankung. Wie andere Arbeiten

zeigten, steht die minimale Resterkrankung in einem direkten Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben (Böttcher et al., 2012; Santacruz et al., 2014).

Bei der Betrachtung des progressionsfreien Überlebens zeigte sich ein signifikant kürzeres progressionsfreies Überleben für Patienten mit *RPS15* Mutation im Vergleich zu Patienten, bei denen der *RPS15* Wildtyp vorlag. Dieser Zusammenhang wurde auch schon durch Landau et al. in der CLL8 Studie beobachtet (Landau et al., 2015). Auch Bretones et al. lieferten einen Hinweis auf ein aggressiveres Fortschreiten der Erkrankung bei *RPS15* mutierten Patienten. So stellten sie in einem Kollektiv mit unbehandelten Patienten eine verkürzte mediane Zeit bis zur ersten Behandlung fest (*RPS15* Wildtyp: 4,2 Jahre vs. *RPS15* Mutiert: 0,4 Jahre) (Bretones et al., 2018). Dieser Effekt zeigte sich bei Bretones et al. unabhängig von IGHV Mutationsstatus, wiederkehrenden genomischen Veränderungen oder dem Binet Stadium. In unserem Studienkollektiv konnte sich ein mutierter *RPS15* Status in der multivariaten Analyse jedoch nicht als unabhängiger prognostischer Faktor für das progressionsfreie Überleben zeigen. Dies ist am ehesten bedingt durch die starke Assoziation im Auftreten mit *TP53* Mutationen und unmutiertem IGHV-Status. Diese beiden molekularen Marker sind bereits in der Standarddiagnostik zu Therapiebeginn etabliert und besitzen durch zahlreiche Studien belegte prognostische Relevanz, z.B. (Hamblin et al., 1999; The International CLL-IPI working group, 2016).

Des Weiteren betrachteten wir in der untersuchten Studienpopulation den Einfluss von *RPS15* Mutationen auf das Gesamtüberleben. Hier konnte bei Patienten mit mutiertem *RPS15* Status über den Beobachtungszeitraum von fünf Jahren kein verkürztes Gesamtüberleben beobachtet werden. Eine mögliche Ursache hierfür kann ein zu kurz gewählter Beobachtungszeitraum sein. Ein Hinweis hierfür ist, dass es im Kollektiv der Patienten mit *RPS15* Mutation bei keinem Patienten zu einer Beseitigung der minimalen Resterkrankung nach dem Ende der Therapie kam und auch das PFS signifikant verkürzt ist. Über einen längeren Beobachtungszeitraum könnten sich Unterschiede im Gesamtüberleben zwischen Patienten mit und ohne *RPS15* Mutation zeigen. Dafür spricht auch, dass Ljungström et al. ein verkürztes Gesamtüberleben für Patienten mit *RPS15* Mutation über einen Beobachtungszeitraum von zehn Jahren beschrieben haben (Ljungström et al., 2016). Dabei zeigte sich bei koexistierender *TP53* Mutation kein statistischer Unterschied zu Patienten mit alleiniger *TP53* Mutation. Bei Patienten mit *RPS15*

Mutation und *TP53* Wildtyp zeigte sich das Überleben vergleichbar mit dem von anderen aggressiven Subgruppen der CLL wie *NOTCH1* und *SF3B1* Mutationen oder del11q (Ljungström et al., 2016).

Mutationen im *RPS15* Gen konnten zwar nicht als unabhängiger Risikofaktor für eine schlechte Prognose identifiziert werden, jedoch kommen *RPS15* Mutationen gehäuft bei Hochrisikopatienten vor. So konnte ein Zusammenhang zwischen der Zuordnung zu den Risikoklassen „hoch“ und „sehr hoch“ nach CLL-IPI Kriterien und dem Auftreten von *RPS15* Mutationen aufgezeigt werden. Dieser Zusammenhang kann dadurch erklärt werden, dass beim Auftreten von *RPS15* Mutationen gehäuft ein mutierter *TP53* Status sowie ein unmutierter IGHV-Status vorliegt, was zu der Einteilung in eine hohe Risikoklasse führt. Die Zuordnung zu den Risikogruppen „hoch“ und „sehr hoch“ geht im Allgemeinen mit einem verkürzten Gesamtüberleben einher. Ein Großteil des prognostischen Effektes von *RPS15* ist auf die Koexistenz von unmutiertem IGHV-Status und mutiertem *TP53* Status zurückzuführen. Diese Prognosemarker sind bereits in der Diagnostik zur Prognoseeinschätzung etabliert. Eine Mutation in *RPS15* konnte sich zudem in unserer Studie nicht als unabhängiger prognostischer Faktor zeigen. Eine zusätzliche Bestimmung des *RPS15* Status hat somit für die Prognoseeinschätzung einen eher geringen Wert.

Bis heute gibt es nur wenige Marker mit prädiktiver Aussagekraft. Eine Ausnahme hierzu stellen die *NOTCH1* Mutationen dar, für welche Evidenz besteht, dass die Hinzunahme von Rituximab zur Fludarabin und Cyclophosphamid Therapie in einem verminderten Nutzwert resultiert (Stilgenbauer et al., 2014).

In unserem Patientenkollektiv konnten wir zeigen, dass unabhängig vom *RPS15* Status eine Therapie mit Obinutuzumab und Chlorambucil einer Therapie mit Rituximab und Chlorambucil hinsichtlich des progressionsfreien Überlebens überlegen ist. Einen prädiktiven Vorhersagewert konnten wir durch die Bestimmung des *RPS15* Mutationsstatus in unserer Kohorte nicht feststellen, was nicht zuletzt jedoch auf die niedrige Mutationsrate und dementsprechend geringe Fallzahl in den einzelnen Therapiearmen zurückzuführen ist.

Von weiterem Interesse ist der Einfluss des *RPS15* Status auf das Ansprechen auf neue Substanzen wie beispielsweise Ibrutinib oder Venetoclax. Hierfür sind Untersuchungen in Studienkohorten mit diesen Substanzen erforderlich. In Zellversuchen mit *RPS15* mutierten Zelllinien wiesen langsam proliferierende Klone eine etwas erhöhte Toleranz gegenüber B-Zellrezeptor Inhibitoren wie Ibrutinib

sowie eine signifikant erhöhte Resistenz gegenüber Fludarabin auf (Bretones et al., 2018). Die iLLUMINATE Studie zeigte einen Vorteil im progressionsfreien Überleben bei einer Therapie mit Ibrutinib und Obinutuzumab im Vergleich zu Chlorambucil und Obinutuzumab. Da Ibrutinib unabhängig vom IGHV-Status wirksam ist, stellt diese Therapie insbesondere bei Patienten mit dem prognostisch ungünstigen unmutierten IGHV-Status die Erstlinientherapie dar (Moreno et al., 2019). Ein ähnliches Ergebnis ist für Venetoclax mit Obinutuzumab gezeigt worden (Fischer et al., 2019). Da in unserer Kohorte fast alle Patienten mit mutiertem *RPS15* Status ebenfalls einen unmutierten IGHV-Status aufwiesen (30 von 31), wäre besonders für das Patientenkollektiv mit unmutiertem IGHV und mutiertem *RPS15* Status von Interesse, ob eine Mutation im *RPS15* Gen eine Auswirkung auf das Therapieansprechen besitzt.

Zusammenfassend konnte mit dieser Arbeit eine prognostische Aussagekraft im Studienkollektiv einer großen Phase-III-Studie nachgewiesen werden, welche nicht die Einschränkungen vorheriger Untersuchungen besaß. *RPS15* mutierte Patienten haben ein kürzeres progressionsfreies Überleben und bleiben nach G-Clb und R-Clb meist MRD positiv. In Zusammenschau aller Ergebnisse würde eine Aufnahme des *RPS15* Mutationsstatus in die Routinediagnostik jedoch kaum eine Veränderung bewirken können, da ein Großteil des prognostischen Effektes durch die Koexistenz mit *TP53* Mutationen beziehungsweise unmutiertem IGHV-Status bedingt ist und sich der *RPS15* Mutationsstatus in der multivariaten Analyse nicht als unabhängiger prognostischer Faktor für das progressionsfreie Überleben beweisen konnte. Zudem ergibt sich bei aktuell fehlender Evidenz für eine prädiktive Vorhersagekraft kein Einfluss auf die Wahl der Therapie. Weitere Untersuchungen im Rahmen von Studien, insbesondere mit neuen Substanzen, sind aber erforderlich, um den prognostischen Wert noch besser beurteilen zu können.

5 Zusammenfassung

Mit Entwicklung des Whole Exome Sequencing konnte nachgewiesen werden, dass Mutationen im ribosomalen Protein *RPS15* gehäuft bei Patienten mit Chronisch lymphatischer Leukämie auftreten. In dieser Arbeit wurde die prognostische Bedeutung dieser Mutation untersucht.

Hierfür wurden mittels Sanger Sequenzierung Proben von 700 Patienten aus der CLL11 Studie auf Mutationen im Exon 4 des Gens analysiert. Dieses Exon war bereits als Mutationshotspot für Mutationen in *RPS15* bekannt. Für die Studienkohorte standen Daten zu Therapieansprechen, progressionsfreiem Überleben sowie Gesamtüberleben zur Verfügung. Zudem wurde eine Korrelation von *RPS15* Mutationen mit der Inzidenz weiterer Faktoren wie chromosomaler Aberrationen, rekurrenter Genmutationen und dem Status somatischer Mutationen in der variablen Region der schweren Kette der Immunglobuline (IGHV-Status) durchgeführt.

In der statistischen Analyse zeigte die Mutation in *RPS15* eine Korrelation mit Persistenz der minimalen Resterkrankung nach Therapieende sowie einem kürzeren progressionsfreien Überleben. Keiner der Patienten mit *RPS15* Mutation erreichte eine Freiheit von der minimalen Resterkrankung, wohingegen dieser Fall bei 17,1 % der Patienten ohne *RPS15* Mutation auftrat ($p = 0,021$). Das mediane progressionsfreie Überleben lag bei Patienten mit *RPS15* Mutation bei 14,1 Monaten im Vergleich zu Patienten ohne *RPS15* Mutation bei 19,4 Monaten ($p = 0,03$). In der multivariaten Analyse konnte sich der *RPS15* Status jedoch nicht als unabhängiger prognostischer Marker zeigen. Bei einem Beobachtungszeitraum von fünf Jahren konnte kein statistisch relevanter Einfluss auf das Gesamtüberleben festgestellt werden. In der dreiarms angelegten Studienkohorte zeigte sich zudem kein prädiktiver Vorhersagewert bezüglich der unterschiedlichen Therapien mit Obinutuzumab und Chlorambucil sowie Rituximab und Chlorambucil.

In Zusammenschau der Ergebnisse ist eine Untersuchung des *RPS15* Mutationsstatus im Rahmen der Routinediagnostik nicht empfehlenswert bei einem geringen zusätzlichen Nutzen für die Beurteilung der Prognose eines Patienten.

6 Literaturverzeichnis

1. Binet, J. L., Auquier, A., Dighiero, G., Chastang, C., Piguët, 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., Belabbès, S. & Gremy, F. (1981). A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*, 48, 198–206.
2. Böttcher, S., Ritgen, M., Fischer, K., Stilgenbauer, S., Busch, R. M., Fingerle-Rowson, G., Fink, A. M., Bühler, A., Zenz, T., Wenger, M. K., Mendila, M., Wendtner, C.-M., Eichhorst, B. F., Döhner, H., Hallek, M. J. & Kneba, M. (2012). Minimal residual disease quantification is an independent predictor of progression-free and overall survival in chronic lymphocytic leukemia: A multivariate analysis from the randomized GCLLSG CLL8 trial. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 30, 980–988.
3. Bretones, G., Álvarez, M. G., Arango, J. R., Rodríguez, D., Nadeu, F., Prado, M. A., Valdés-Mas, R., Puente, D. A., Paulo, J. A., Delgado, J., Villamor, N., López-Guillermo, A., Finley, D. J., Gygi, S. P., Campo, E., Quesada, V. & López-Otín, C. (2018). Altered patterns of global protein synthesis and translational fidelity in RPS15-mutated chronic lymphocytic leukemia. *Blood*.
4. Butler, T. & Gribben, J. G. (2010). Biologic and clinical significance of molecular profiling in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood reviews*, 24, 135–141.
5. Cheson, B. D., Bennet, J. M., Grever, M., Kay, N., Keating, M. J., O'Brien, S. & Rai, K. R. (1996). National Cancer Institute-Sponsored Working Group Guidelines for Chronic Lymphocytic Leukemia: Revised Guidelines for Diagnosis and Treatment. *Blood*, 1996, 4990–4997.
6. Cox, D. (1972). Regression models and life tables. *Journal of the Royal Statistical Society*, 187–220.

7. Daftuar, L., Zhu, Y., Jacq, X. & Prives, C. (2013). Ribosomal proteins RPL37, RPS15 and RPS20 regulate the Mdm2-p53-MdmX network, *8*, e68667.
8. Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge für Patienten mit einer chronischen lymphatischen Leukämie (CLL). Langversion 1.0, 2018, AWMF Registernummer: 018-032OL. Zugriff am 09.01.2020. Verfügbar unter <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/chronische-lymphatische-leukaemie-cll/>.
9. Döhner, H., Stilgenbauer, S., Benner, A., Leupolt, E., Kröber, A., Bullinger, L., Döhner, K., Bentz, M. & Lichter, P. (2000). Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine*, *343*, 1910–1916.
10. Dreger, P., Schetelig, J., Andersen, N., Corradini, P., van Gelder, M., Gribben, J., Kimby, E., Michallet, M., Moreno, C., Stilgenbauer, S. & Montserrat, E. (2014). Managing high-risk CLL during transition to a new treatment era: Stem cell transplantation or novel agents? *Blood*, *124*, 3841–3849.
11. Eichhorst, B., Robak, T., Montserrat, E., Ghia, P., Hillmen, P., Hallek, M. & Buske, C. (2015). Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*, *26 Suppl 5*, v78-84.
12. Estenfelder, S., Holland-Letz, A., Tausch, E., Robrecht, S., Bahlo, J., Goede, V., Opatrna, V., Ritgen, M., van Dongen, J., Langerak, A., Fingerle-Rowson, G., Kneba, M., Fischer, K., Hallek, M., Döhner, H. & Stilgenbauer, S. (2017) RPS15 mutations and Treatment Outcome in Chronic Lymphocytic Leukemia - Results from the CLL11 Phase III Trial (Chlorambucil (Clb) with or without the Addition of Rituximab (R) or Obinutuzumab (GA101, G)) of the German CLL Study Group. *Blood*, *130 (Supplement 1)*: 1738.
13. Fischer, K., Al-Sawaf, O., Bahlo, J., Fink, A.-M., Tandon, M., Dixon, M., Robrecht, S., Warburton, S., Humphrey, K., Samoylova, O., Liberati, A. M., Pinilla-Ibarz, J., Opat, S., Sivcheva, L., Le Dû, K., Fogliatto, L. M., Niemann, C. U., Weinkove, R., Robinson, S., Kipps, T. J., Boettcher, S., Tausch, E., Humerickhouse, R., Eichhorst, B., Wendtner, C.-M., Langerak, A. W., Kreuzer,

- K.-A., Ritgen, M., Goede, V., Stilgenbauer, S., Mobasher, M. & Hallek, M. (2019). Venetoclax and Obinutuzumab in Patients with CLL and Coexisting Conditions. *The New England journal of medicine*, 380, 2225–2236.
14. Gazda, H. T., Sheen, M. R., Vlachos, A., Choesmel, V., O'Donohue, M.-F., Schneider, H., Darras, N., Hasman, C., Sieff, C. A., Newburger, P. E., Ball, S. E., Niewiadomska, E., Matysiak, M., Zaucha, J. M., Glader, B., Niemeyer, C., Meerpohl, J. J., Atsidaftos, E., Lipton, J. M., Gleizes, P.-E. & Beggs, A. H. (2008). Ribosomal protein L5 and L11 mutations are associated with cleft palate and abnormal thumbs in Diamond-Blackfan anemia patients. *American journal of human genetics*, 83, 769–780.
15. Goede, V., Fischer, K., Busch, R., Engelke, A., Eichhorst, B., Wendtner, C. M., Chagorova, T., La Serna, J. de, Dilhuydy, M.-S., Illmer, T., Opat, S., Owen, C. J., Samoylova, O., Kreuzer, K.-A., Stilgenbauer, S., Döhner, H., Langerak, A. W., Ritgen, M., Kneba, M., Asikanius, E., Humphrey, K., Wenger, M. & Hallek, M. (2014). Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. *The New England journal of medicine*, 370, 1101–1110.
16. Goede, V., Fischer, K., Dyer, M. J. S., Müller, L., Smolej, L., Di Bernado, M. C., Knapp, A., Nielsen, T. & Hallek, M. (2018). Overall survival benefit of Obinutuzumab over Rituximab when combined with Chlorambucil in patients with chronic lymphocytic leukemia and comorbidities: final survival analysis of the CLL11 study. Zugriff am 22.03.2020. Verfügbar unter <https://library.ehaweb.org/eha/2018/stockholm/215923/valentin.goede.overall.survival.benefit.of.obinutuzumab.over.rituximab.when.html>.
17. Goede, V., Fischer, K., Engelke, A., Schlag, R., Lepretre, S., Montero, L. F. C., Montillo, M., Fegan, C., Asikanius, E., Humphrey, K., Fingerle-Rowson, G. & Hallek, M. (2015). Obinutuzumab as frontline treatment of chronic lymphocytic leukemia: Updated results of the CLL11 study. *Leukemia*, 29, 1602–1604.
18. Grever, M. R., Lucas, D. M., Dewald, G. W., Neuberg, D. S., Reed, J. C., Kitada, S., Flinn, I. W., Tallman, M. S., Appelbaum, F. R., Larson, R. A., Paietta, E., Jelinek, D. F., Gribben, J. G. & Byrd, J. C. (2007). Comprehensive assessment of genetic and molecular features predicting outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia: Results from the US Intergroup Phase III Trial E2997.

Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology, 25, 799–804.

19. Gruber, M. & Wu, C. J. (2014). Evolving understanding of the CLL genome. *Seminars in hematology*, 51, 177–187.
20. Guìèze, R., Robbe, P., Clifford, R., Guibert, S. de, Pereira, B., Timbs, A., Dilhuydy, M.-S., Cabes, M., Ysebaert, L., Burns, A., Nguyen-Khac, F., Davi, F., Véronèse, L., Combes, P., Le Garff-Tavernier, M., Leblond, V., Merle-Béral, H., Alsolami, R., Hamblin, A., Mason, J., Pettitt, A., Hillmen, P., Taylor, J., Knight, S. J. L., Tournilhac, O. & Schuh, A. (2015). Presence of multiple recurrent mutations confers poor trial outcome of relapsed/refractory CLL. *Blood*, 126, 2110–2117.
21. Hallek, M., Cheson, B. D., Catovsky, D., Caligaris-Cappio, F., Dighiero, G., Döhner, H., Hillmen, P., Keating, M., Montserrat, E., Chiorazzi, N., Stilgenbauer, S., Rai, K. R., Byrd, J. C., Eichhorst, B., O'Brien, S., Robak, T., Seymour, J. F. & Kipps, T. J. (2018). iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood*, 131, 2745–2760.
22. Hallek, M., Fischer, K., Fingerle-Rowson, G., Am Fink, Busch, R., Mayer, J., Hensel, M., Hopfinger, G., Hess, G., Grünhagen, U. von, Bergmann, M., Catalano, J., Zinzani, P. L., Caligaris-Cappio, F., Seymour, J. F., Berrebi, A., Jäger, U., Cazin, B., Trneny, M., Westermann, A., Wendtner, C. M., Eichhorst, B. F., Staib, P., Bühler, A., Winkler, D., Zenz, T., Böttcher, S., Ritgen, M., Mendila, M., Kneba, M., Döhner, H. & Stilgenbauer, S. (2010). Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia. A randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet*, 376, 1164–1174.
23. Hamblin, T. J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D. G. & Stevenson, F. K. (1999). Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 94, 1848–1854.
24. Hoehstetter, M. A., Busch, R., Eichhorst, B., Bühler, A., Winkler, D., Eckart, M. J., Vehling-Kaiser, U., Schimke, H., Jäger, U., Hurtz, H. J., Hopfinger, G., Hartmann, F., Fuss, H., Abenhardt, W., Blau, I., Freier, W., Müller, L., Goebeler, M., Wendtner, C. M., Bahlo, J., Fischer, K., Bentz, M., Emmerich, B., Döhner, H.

- H., Hallek, M. & Stilgenbauer, S. (2017). Early, risk-adapted treatment with fludarabine in Binet stage A chronic lymphocytic leukemia patients: Results of the CLL1 trial of the German CLL study group. *Leukemia*, 31, 2833–2837.
25. Hoefele, J., Bertrand, A.-M., Stehr, M., Leblanc, T., Tchernia, G., Simansour, M., Mignot, B., Alberer, M., Schwarz, H.-P. & Da Costa, L. (2010). Disorders of sex development and Diamond-Blackfan anemia. Is there an association? *Pediatric Nephrology*, 25, 1255–1261. Verfügbar unter <https://doi.org/10.1007/s00467-010-1497-y>.
26. Kaplan, E. L. & Meier, P. (1958). Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *Journal of the American Statistical Association*, 457–481.
27. Landau, D. A., Carter, S. L., Stojanov, P., McKenna, A., Stevenson, K., Lawrence, M. S., Sougnez, C., Stewart, C., Sivachenko, A., Wang, L., Wan, Y., Zhang, W., Shukla, S. A., Vartanov, A., Fernandes, S. M., Saksena, G., Cibulskis, K., Tesar, B., Gabriel, S., Hacohen, N., Meyerson, M., Lander, E. S., Neuberg, D., Brown, J. R., Getz, G. & Wu, C. J. (2013). Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell*, 152, 714–726.
28. Landau, D. A., Tausch, E., Taylor-Weiner, A. N., Stewart, C., Reiter, J. G., Bahlo, J., Kluth, S., Bozic, I., Lawrence, M., Böttcher, S., Carter, S. L., Cibulskis, K., Mertens, D., Sougnez, C. L., Rosenberg, M., Hess, J. M., Edelman, J., Kless, S., Kneba, M., Ritgen, M., Fink, A., Fischer, K., Gabriel, S., Lander, E. S., Nowak, M. A., Döhner, H., Hallek, M., Neuberg, D., Getz, G., Stilgenbauer, S. & Wu, C. J. (2015). Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature*, 526, 525–530.
29. Léger-Silvestre, I., Milkereit, P., Ferreira-Cerca, S., Saveanu, C., Rousselle, J.-C., Choesmel, V., Guinefoleau, C., Gas, N. & Gleizes, P.-E. (2004). The ribosomal protein Rps15p is required for nuclear exit of the 40S subunit precursors in yeast. *The EMBO journal*, 23, 2336–2347.
30. Levine, A. J. & Oren, M. (2009). The first 30 years of p53: Growing ever more complex. *Nature reviews. Cancer*, 9, 749–758.
31. Ljungström, V., Cortese, D., Young, E., Pandzic, T., Mansouri, L., Plevova, K., Ntoufa, S., Baliakas, P., Clifford, R., Sutton, L.-A., Blakemore, S. J., Stavroyianni, N., Agathangelidis, A., Rossi, D., Höglund, M., Kotaskova, J.,

- Juliusson, G., Belessi, C., Chiorazzi, N., Panagiotidis, P., Langerak, A. W., Smedby, K. E., Oscier, D., Gaidano, G., Schuh, A., Davi, F., Pott, C., Strefford, J. C., Trentin, L., Pospisilova, S., Ghia, P., Stamatopoulos, K., Sjöblom, T. & Rosenquist, R. (2016). Whole-exome sequencing in relapsing chronic lymphocytic leukemia: Clinical impact of recurrent RPS15 mutations. *Blood*, 127, 1007–1016.
32. Mantel, N. (1966). Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer chemotherapy reports*, 50, 163–170.
33. Mehta, C. R. & Patel, N. R. (1986). FEXACT: A Fortran subroutine for Fisher's exact test on unordered $r \times c$ contingency tables.
34. Moreno, C., Greil, R., Demirkan, F., Tedeschi, A., Anz, B., Larratt, L., Simkovic, M., Samoilova, O., Novak, J., Ben-Yehuda, D., Strugov, V., Gill, D., Gribben, J. G., Hsu, E., Lih, C.-J., Zhou, C., Clow, F., James, D. F., Styles, L. & Flinn, I. W. (2019). Ibrutinib plus obinutuzumab versus chlorambucil plus obinutuzumab in first-line treatment of chronic lymphocytic leukaemia (iLLUMINATE). A multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 20, 43–56.
35. O'Leary, N. A., Wright, M. W., Brister, J. R., Ciufo, S., Haddad, D., McVeigh, R., Rajput, B., Robbertse, B., Smith-White, B., Ako-Adjei, D., Astashyn, A., Badretdin, A., Bao, Y., Blinkova, O., Brover, V., Chetvernin, V., Choi, J., Cox, E., Ermolaeva, O., Farrell, C. M., Goldfarb, T., Gupta, T., Haft, D., Hatcher, E., Hlavina, W., Joardar, V. S., Kodali, V. K., Li, W., Maglott, D., Masterson, P., McGarvey, K. M., Murphy, M. R., O'Neill, K., Pujar, S., Rangwala, S. H., Rausch, D., Riddick, L. D., Schoch, C., Shkeda, A., Storz, S. S., Sun, H., Thibaud-Nissen, F., Tolstoy, I., Tully, R. E., Vatsan, A. R., Wallin, C., Webb, D., Wu, W., Landrum, M. J., Kimchi, A., Tatusova, T., DiCuccio, M., Kitts, P., Murphy, T. D. & Pruitt, K. D. (2016). Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: Current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic acids research*, 44, D733-45.
36. Puente, X. S., Beà, S., Valdés-Mas, R., Villamor, N., Gutiérrez-Abril, J., Martín-Subero, J. I., Munar, M., Rubio-Pérez, 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.,

- Gelpí, J. L., González, B., González, S., González, M., Gut, M., Hernández-Rivas, J. M., López-Guerra, M., Martín-García, D., Navarro, A., Nicolás, P., Orozco, M., Payer, Á. R., Pinyol, M., Pisano, D. G., Puente, D. A., Queirós, A. C., Quesada, V., Romeo-Casabona, C. M., Royo, C., Royo, R., Rozman, M., Russiñol, N., Salaverría, I., Stamatopoulos, K., Stunnenberg, H. G., Tamborero, D., Terol, M. J., Valencia, A., López-Bigas, N., Torrents, D., Gut, I., López-Guillermo, A., López-Otín, C. & Campo, E. (2015). Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*, 526, 519–524.
37. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74, 5463–5467.
38. Santacruz, R., Villamor, N., Aymerich, M., Martínez-Trillos, A., López, C., Navarro, A., Rozman, M., Beà, S., Royo, C., Cazorla, M., Colomer, D., Giné, E., Pinyol, M., Puente, X. S., López-Otín, C., Campo, E., López-Guillermo, A. & Delgado, J. (2014). The prognostic impact of minimal residual disease in patients with chronic lymphocytic leukemia requiring first-line therapy. *Haematologica*, 99, 873–880.
39. Shanafelt, T. D., Wang, X. V., Kay, N. E., Hanson, C. A., O'Brien, S., Barrientos, J., Jelinek, D. F., Braggio, E., Leis, J. F., Zhang, C. C., Coutre, S. E., Barr, P. M., Cashen, A. F., Mato, A. R., Singh, A. K., Mullane, M. P., Little, R. F., Erba, H., Stone, R. M., Litzow, M. & Tallman, M. (2019). Ibrutinib-Rituximab or Chemoimmunotherapy for Chronic Lymphocytic Leukemia. *The New England journal of medicine*, 381, 432–443.
40. Siegel, R., DeSantis, C., Virgo, K., Stein, K., Mariotto, A., Smith, T., Cooper, D., Gansler, T., Lerro, C., Fedewa, S., Lin, C., Leach, C., Cannady, R. S., Cho, H., Scoppa, S., Hachey, M., Kirch, R., Jemal, A. & Ward, E. (2012). Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*, 62, 220–241.
41. Stilgenbauer, S., Schnaiter, A., Paschka, P., Zenz, T., Rossi, M., Döhner, K., Bühler, A., Böttcher, S., Ritgen, M., Kneba, M., Winkler, D., Tausch, E., Hoth, P., Edelmann, J., Mertens, D., Bullinger, L., Bergmann, M., Kless, S., Mack, S., Jäger, U., Patten, N., Wu, L., Wenger, M. K., Fingerle-Rowson, G., Lichter, P., Cazzola, M., Wendtner, C. M., Fink, A. M., Fischer, K., Busch, R., Hallek, M. &

- Döhner, H. (2014). Gene mutations and treatment outcome in chronic lymphocytic leukemia: Results from the CLL8 trial. *Blood*, 123, 3247–3254.
42. Strati, P., Keating, M. J., O'Brien, S. M., Ferrajoli, A., Burger, J., Faderl, S., Tambaro, F. P., Jain, N. & Wierda, W. G. (2014). Outcomes of first-line treatment for chronic lymphocytic leukemia with 17p deletion. *Haematologica*, 99, 1350–1355.
43. Tausch, E., Beck, P., Schlenk, R. F., Jebaraj, B. J., Dolnik, A., Yosifov, D. Y., Hillmen, P., Offner, F., Janssens, A., Babu, K. G., Grosicki, S., Mayer, J., Panagiotidis, P., McKeown, A., Gupta, I. V., Skorupa, A., Pallaud, C., Bullinger, L., Mertens, D., Döhner, H. & Stilgenbauer, S. (2020). Prognostic and predictive role of gene mutations in chronic lymphocytic leukemia: results from the pivotal phase III study COMPLEMENT1. *Haematologica*.
44. The International CLL-IPI working group (2016). An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI). A meta-analysis of individual patient data. *The Lancet Oncology*, 17, 779–790.
45. UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009. Zugriff am 17.03.2020. Verfügbar unter https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr19%3A1440330%2D1440467&hgid=811790241_Bf2rEdgYk0AwzBcQTEZTw1eZTMaR.
46. Wilcoxon, F. (1945). Individual Comparisons by Ranking Methods. *Biometrics Bulletin*, 80–83.
47. Yu, L., Kim, H. T., Kasar, S., Benien, P., Du, W., Hoang, K., Aw, A., Tesar, B., Improgo, R., Fernandes, S., Radhakrishnan, S., Klitgaard, J., Lee, C., Getz, G., Setlur, S. R. & Brown, J. R. (2017). Survival of Del17p CLL Depends on Genomic Complexity and Somatic Mutation. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 23, 735–745.
48. Zenz, T., Mertens, D., Küppers, R., Döhner, H. & Stilgenbauer, S. (2010). From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nature reviews. Cancer*, 10, 37–50.

Anhang

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadieneinteilung der CLL nach Binet.....	2
Tabelle 2: CLL International Prognostic Index (CLL-IPI) Einteilung zu Risikogruppen.....	6
Tabelle 3: Verteilung der Patienten der CLL11 Studie auf die drei Therapiearme	10
Tabelle 4: Verwendete Geräte	11
Tabelle 5: Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	12
Tabelle 6: Verwendete Reagenzien	13
Tabelle 7: Verwendete Primer.....	14
Tabelle 8: PCR-Ansatz für <i>RPS15</i>	15
Tabelle 9: Thermocyclerprogramm für die PCR von <i>RPS15</i>	16
Tabelle 10: Ansatz für die Sequenzreaktion.....	18
Tabelle 11: Thermocyclerprogramm für die Sequenzreaktion	18
Tabelle 12: Auflistung aller Mutationen	23
Tabelle 13: Therapieansprechen innerhalb der Therapiearme bei Patienten mit und ohne <i>RPS15</i> Mutation	31
Tabelle 14: Einflussfaktoren auf das PFS in der multivariaten Analyse mit Cox-Regression	35

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Agarose-Gel nach der Elektrophorese	17
Abbildung 2: Vorwärtssequenz <i>RPS15</i> Exon 4	20
Abbildung 3: Säulendiagramm zur Darstellung des Therapieansprechens für 619 Patienten aus der CLL11 Studie.....	27
Abbildung 4: Säulendiagramm zur Darstellung der Beseitigung der Minimalen Resterkrankung für 509 Patienten aus der CLL11 Studie	28
Abbildung 5: Progressionsfreies Überleben dargestellt nach Kaplan-Meier für 700 Patienten aus der CLL11 Studie.....	29
Abbildung 6: Gesamtüberleben dargestellt nach Kaplan-Meier für 700 Patienten aus der CLL11 Studie	30
Abbildung 7: Progressionsfreies Überleben dargestellt nach Kaplan-Meier für 297 Patienten aus der CLL11 Studie unter R-Clb Therapie.....	32
Abbildung 8: Progressionsfreies Überleben dargestellt nach Kaplan-Meier für 303 Patienten aus der CLL11 Studie unter G-Clb Therapie.....	33

Danksagung

Die Danksagung wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.