

## Summary

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common leukemia among adults in Germany, characterized by the accumulation of monoclonal, mature B-cells with specific genetic alterations. Despite therapeutic advances, CLL remains incurable. This thesis explores the molecular landscape of CLL, with a special focus on how gene expression profiles correlate with treatment response and the depth of minimal residual disease (MRD). The work primarily aims to identify key genetic and transcriptomic markers associated with MRD, thereby laying groundwork for future precision treatment strategies.

CLL is pathophysiologically defined by clonal expansions of B-cells carrying a distinctive set of genetic markers, such as deletions in 13q14, 17p, and 11q, mutations in *TP53*, *ATM*, and *NOTCH1*, and the presence or absence of somatic hypermutation in the immunoglobulin heavy chain variable region (IGHV). These features influence disease progression, with unmutated IGHV often indicating an aggressive course. Various dysregulated signalling pathways are implicated in CLL, notably the B-cell receptor pathway, governed by BTK and PI3K kinases, and apoptotic pathways involving the anti-apoptotic regulator BCL2. Modern targeted therapies leverage these pathways, providing options like the BCL2 inhibitor venetoclax and the BTK inhibitors ibrutinib, acalabrutinib, and zanubrutinib.

The thesis addresses three primary objectives: (1) identifying patients achieving MRD-negativity after fixed-duration first-line treatment, (2) profiling gene expression landscapes across treatment-naïve and treated patients, and (3) comparing expression profiles in patients who relapse versus those in sustained remission. To this end, a cohort of 432 patients enrolled in the CLL14 clinical trial was analysed, receiving venetoclax-obinutuzumab (Ven-Obi) or chlorambucil-obinutuzumab (Cib-Obi). Gene expression was quantified using RNA sequencing, and MRD was assessed with a sensitive immunosequencing assay, detecting CLL cells down to one in a million.

Gene expression analyses revealed significant differences between patients achieving MRD-negativity (MRD<math>10^{-4}</math>) and those with detectable MRD. Several genes, including

the apoptotic regulator *BCL2L11* (*BIM*) and the multidrug resistance gene *ABCB1*, were identified as having an association with MRD response or non-response. Specifically, high *BCL2L11* expression was associated with deep MRD responses, suggesting that intrinsic apoptotic potential may predict venetoclax efficacy. In contrast, MRD-positive patients showed higher *ABCB1* expression, a potential marker of drug resistance. Additionally, gene set enrichment analysis (GSEA) showed that MRD responders exhibited upregulation in apoptotic pathways, including p53 signalling, while non-responders had increased expression in inflammatory pathways, such as TNF $\alpha$  and NF $\kappa$ B.

During relapse, further transcriptomic shifts were observed, as seen by an upregulation of oncogenic pathways such as MYC and G2M checkpoint regulation. Inflammatory gene sets were particularly enriched, showing elevated *CXCR5*, *IRF1*, and *EZH2* expressions, which may drive relapse by promoting cell survival and immune evasion. These findings were consistent in both Ven-Obi and Clb-Obi groups, highlighting that inflammatory signalling and proliferation pathways play critical roles in disease progression. Gene set variation analysis (GSVA) further corroborated these observations, with inflammatory pathways, including IL2/STAT5 and IFN $\gamma$  response, strongly enriched at relapse.

The thesis offers new insights into the transcriptomic drivers of CLL treatment response, highlighting *BCL2L11* and inflammatory gene sets as key markers. By elucidating the gene expression profiles linked to MRD status, this work potentially allows for optimized CLL treatments to prolong MRD-negative remissions and prevent disease progressions.

## Zusammenfassung

Die chronische lymphatische Leukämie (CLL) ist die häufigste Leukämie bei Erwachsenen in Deutschland und zeichnet sich durch die Anhäufung monoklonaler, reifer B-Zellen mit spezifischen genetischen Veränderungen aus. Trotz wesentlicher Therapiefortschritte bleibt die CLL unheilbar. Diese Dissertation untersucht das molekulare Profil der CLL, insbesondere wie Genexpressionsprofile mit dem Therapieansprechen und dem Grad der minimalen Resterkrankung (MRD) korrelieren. Ziel ist es, wesentliche genetische und transkriptomische Marker im Zusammenhang mit MRD zu identifizieren und so die Grundlage für präzisionsmedizinische Behandlungsstrategien zu legen. Die CLL ist pathophysiologisch definiert durch die klonale Expansion von B-Zellen mit einer charakteristischen Reihe genetischer Marker, wie Deletionen in 13q14, 17p und 11q, Mutationen in *TP53*, *ATM* und *NOTCH1* sowie somatischer Hypermutationen in der variablen Region der schweren Kette des Immunglobulins (IGHV). Diese Merkmale beeinflussen den Krankheitsverlauf, wobei der unmutierte IGHV-Status oft einen aggressiveren Verlauf anzeigt. Verschiedene dysregulierte Signalwege spielen bei der CLL eine Rolle, insbesondere der B-Zell-Rezeptorweg, reguliert durch die Kinasen BTK und PI3K, sowie apoptotische Signalwege, die den anti-apoptischen Regulator BCL2 einschließen. Zielgerichtete Therapien nutzen diese Signalwege um die Erkrankung günstig zu beeinflussen, wie beispielweise der BCL2-Inhibitor Venetoclax oder die BTK-Inhibitoren Ibrutinib, Acalabrutinib und Zanubrutinib. Diese Dissertation verfolgt drei Hauptziele: (1) Die Identifizierung von Patienten, die nach einer zeitlich begrenzten Erstlinientherapie MRD-Negativität erreichen, (2) die Analyse der Genexpressionsprofile der CLL bei therapienaiven sowie behandelten Patienten und (3) der Vergleich der Expressionsprofile bei Patienten mit Rezidiv gegenüber Patienten in anhaltender Remission. Analysiert wurde eine Kohorte von 432 Patienten, die im Rahmen der CLL14-Studie Venetoclax-Obinutuzumab (Ven-Obi) oder Chlorambucil-Obinutuzumab (Clb-Obi) erhielten. Die Genexpression wurde mittels RNA-Sequenzierung analysiert, während MRD mit einem sensitiven Immunosequencing-Assay erfasst wurde, welcher

CLL-Zellen bis zu einer Häufigkeit von einer Zelle pro Million erkennt. Die Genexpressionsanalysen zeigten signifikante Unterschiede zwischen Patienten mit MRD-Negativität ( $\text{MRD} < 10^{-4}$ ) und solchen mit nachweisbarer MRD. Verschiedene Gene, darunter der apoptotische Regulator *BCL2L11* (*BIM*) und das Multidrug-Resistenz-Gen *ABCB1*, waren signifikant mit dem MRD-Outcome assoziiert. Insbesondere war eine hohe *BCL2L11*-Expression mit tiefem MRD-Ansprechen verbunden, was darauf hindeutet, dass eine hohe Expression pro-apoptotischer Regulatoren die Erkrankung besonders empfindlich für Venetoclax macht. Im Gegensatz dazu wiesen MRD-positive Patienten eine höhere *ABCB1*-Expression auf, was ein potenzieller Marker für Arzneimittelresistenz sein könnte. Zudem zeigte die Gen-Set-Anreicherungsanalyse (GSEA), dass Patienten mit MRD-Ansprechen eine Hochregulation von apoptotischen Signalwegen, insbesondere der p53-Signalwege, aufwiesen, während Patienten mit geringem MRD-Ansprechen eine erhöhte Expression in inflammatorischen Signalwegen, einschließlich  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{NF}\kappa\text{B}$ , zeigten. Beim Rezidiv wurden weitere transkriptomische Verschiebungen festgestellt, gekennzeichnet durch eine Hochregulation onkogener Signalwege wie *MYC* und G2M-Checkpoint-Regulation. Auch hier waren inflammatorische Signalwege besonders hochreguliert und eine erhöhte Expression von *CXCR5*, *IRF1* und *EZH2* wurde beobachtet, die die Krankheitsprogression durch Förderung des Zellüberlebens und der „immune evasion“ vorantreiben könnten. Diese Befunde waren in beiden Behandlungsgruppen zu finden und unterstreichen, dass entzündliche Signale und Proliferationswege eine zentrale Rolle bei Krankheitsprogressen spielen. Eine Genset-Variationsanalyse (GSVA) bestätigte diese Beobachtungen, wobei entzündliche Signalwege wie *IL2/STAT5* und  $\text{IFN}\gamma$ -Reaktion beim Rezidiv besonders angereichert waren. Die Dissertation liefert neue Erkenntnisse über die transkriptomischen Treiber des Therapieansprechens bei CLL und hebt die mögliche Rolle von *BCL2L11* sowie entzündliche Gensets hervor. Durch die Auswertung von Genexpressionsprofilen, die mit dem MRD-Status korrelieren, ebnet diese Arbeit den Weg für mögliche zielgerichtete Therapien der CLL, die MRD-negative Remissionen verlängern und Rezidive verhindern könnten.