

CLINICAL SIGNIFICANCE OF *TP53* ABERRATIONS AND *IGHV*  
MUTATIONAL STATUS IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIAKLINIČKI ZNAČAJ ABERACIJA *TP53* GENA I *IGHV* MUTACIONOG  
STATUSA U HRONIČNOJ LIMFOCITNOJ LEUKEMIJIKristina Tomić<sup>1,2</sup>, Teodora Karan Đurašević<sup>3</sup>, Vojin Vuković<sup>2</sup>, Biljana Mihaljević<sup>1,2</sup>, Darko Antić<sup>1,2</sup><sup>1</sup> Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Beograd, Srbija<sup>2</sup> Univerzitetski klinički centar Srbije, Klinika za hematologiju, Beograd, Srbija<sup>3</sup> Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu biologiju i genetičko inženjerstvo, Beograd, Srbija

Correspondence: kristinat992@gmail.com

## Abstract

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a very heterogeneous disease with a variable clinical course. On the one side of the spectrum, there are patients with aggressive and resistant disease, of which they die only a few months after diagnosis while, on the other side, there are patients with an indolent, slowly progressive disease that does not require treatment for decades. The reasons for this are only partially known, but they have been the subject of numerous scientific studies during the last several decades. Consequently, the concept of prognostic and predictive factors in CLL have emerged, which aims to predict the clinical course and its therapeutic outcome. With the improvement of understanding the pathophysiology of this disease, the lists of prognostic and predictive factors are getting longer every year, but they also overlap. In this review, we singled out the aberrations of the *TP53* gene and the *IGHV* (immunoglobulin heavy variable) gene mutational status as the two most important and most studied factors that have both prognostic and predictive significance.

## Keywords:

chronic lymphocytic  
leukemia,  
*TP53* aberrations,  
*IGHV* mutational status

## Sažetak

Hronična limfocitna leukemija (HLL) izuzetno je heterogena bolest varijabilnog kliničkog toka. S jedne strane imamo, pacijente sa agresivnom i rezistentnom bolešću od koje umiru svega par meseci nakon dijagnoze, dok s druge strane spektra postoje pacijenti sa indolentnom, sporo progredirajućom bolešću koja ne zahteva lečenje decenijama. Razlozi su samo delimično poznati i već su decenijama unazad tema mnogobrojnih naučnih istraživanja. Tako je razvijen koncept prognostičkih i prediktivnih faktora u HLL-u, koji imaju za cilj da predvide klinički tok, odnosno terapijski ishod HLL-a. Liste prognostičkih i prediktivnih faktora su, sa boljim poznavanjem patofiziologije ove bolesti, svakom godinom sve duže, ali se i međusobno preklapaju. U ovom revijalnom radu izabrali smo aberacije *TP53* gena i mutacioni status rearanžiranih *IGHV* (engl. *immunoglobulin heavy variable*) gena kao dva najznačajnija i najproučavanija faktora koji imaju i prognostički i prediktivni značaj.

### Ključne reči:

hronična limfocitna leukemija, aberacije *TP53* gena, *IGHV* mutacioni status

## Uvod

Hronična limfocitna leukemija (HLL) je hronična limfoproliferativna bolest zrelih CD5<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>sIgM<sup>low</sup> B-limfocita i najčešći je oblik leukemije kod odraslih, prevashodno starije populacije (1,2). Iako se ranije verovalo da je reč o sporo-napredujućoj bolesti s dobrom prognozom i višedecenijskim preživljavanjem, ispostavilo se da ova tvrdnja važi za svega trećinu bolesnika sa HLL-om. Klinički tok ove bolesti je vrlo varijabilan, i kreće se od spore, indolentne bolesti koja decenijama ne zahteva lečenje, do vrlo agresivne bolesti koja je refraktarna na lečenje (3). Upravo je ta heterogenost kliničkog toka HLL-a podstakla potragu za karakteristikama bolesti koje imaju prognostički i prediktivni značaj, te kao takve mogu biti biomarkeri, a sa ciljem stratifikacije bolesnika, tj. razlikovanja bolesnika sa agresivnom formom bolesti, kod kojih je potrebno što pre započeti sa lečenjem, od onih sa indolentnom bolešću kod kojih od ranog započinjanja lečenja nema dobrobiti.

Prognostički biomarkeri u HLL-u odražavaju biologiju i prirodu bolesti i, nezavisno od vrste terapije, predviđaju verovatnoću trajanja perioda bez lečenja (engl. *time to first treatment*, TTFT), ukupnog preživljavanja (engl. *overall survival*, OS) ili transformacije bolesti (4). Prediktivni biomarkeri mogu da predvide odgovor na specifične modalitete lečenja i predstavljaju osnovu za personalizovani terapijski pristup. Između ove dve vrste biomarkera ima međusobnih preklapanja - jedan prediktivni biomarker može istovremeno biti i prognostički i obrnuto (4). Oni pomažu kliničarima u razvijanju strategija praćenja bolesnika u "gledaj i čekaj" (engl. *watch and wait*) režimu i odabiru terapijskog modaliteta HLL-a (4). Razvojem novih saznanja o HLL-u s vremenom se razvio veliki broj prognostičkih markera - od onih bazičnih, tj. kliničko-laboratorijskih, do molekularno-genetičkih i epigenetičkih. Istovremeno, pronalaženje novih terapijskih modaliteta i razvoj novih prediktivnih markera u HLL-u su u ekspanziji, što je umnogome poboljšalo preživljavanje ovih bolesnika. U ovom revijalnom radu izabrali smo aberacije *TP53* gena i mutacioni status rearanžiranih *IGHV* (engl. *immunoglobulin heavy variable*) gena, kao dva do sada

najproučavanija i najinformativnija biomarkera u HLL-u, kako bismo objasnili značaj prognostičkih i prediktivnih biomarkera u ovoj hroničnoj bolesti.

## *IGHV* mutacioni status

Zadatak humoralnog imuniteta je odbrana organizma od širokog dijapazona potencijalnih patogena posredstvom imunoglobulina B-limfocita. U osnovi diverziteta humoralnog imuniteta je varijabilni (V) region teških i lakih lanaca imunoglobulina, tj. B-ćelijskog receptora (engl. *B-cell receptor*, BcR). Varijabilnost V regiona teškog lanca je rezultat specifičnih procesa rekombinacija između *IGHV*, *IGHD* i *IGHJ* gena, koji se odvijaju tokom B-ćelijske diferencijacije. Varijabilnosti V regiona doprinosi i proces afinitetnog sazrevanja B-limfocita koji se dešava nakon kontakta sa antigenom, tokom koga dolazi do akumulacije somatskih hipermutacija u *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžmanima (5).

Kako HLL nastaje malignom transformacijom zrelih B-limfocita, svaki HLL klon nosiće jedinstven rearanžman gena za V region teškog (i lakog) lanca imunoglobulina B-ćelijskog receptora koji je visoko specifičan i u literaturi opisan kao "otisak tumora" (6).

Krajem 20. veka proučavanjem statusa somatskih hipermutacija rearanžiranih *IGHV* gena ustanovljeno je da njihovom analizom razlikujemo dva podtipa HLL, sa mutiranim i nemutiranim *IGHV* statusom (M-HLL i N-HLL), koji se značajno razlikuju po kliničkom toku i terapijskom ishodu (7,8). Od tada je kroz rezultate mnogobrojnih studija potvrđena snažna nezavisna prognostička moć ovog biomarkera. Pacijenti sa mutiranim *IGHV* statusom imaju značajno duže vreme preživljavanja bez progresije bolesti (engl. *progression-free survival*, PFS) (9,2-18,4 godina) u poređenju sa onima koji imaju nemutirani *IGHV* status (1-5 godina) (9). Takođe, OS bolesnika sa mutiranim *IGHV* statusom značajno je duži (17,9-25,8 godina) u odnosu na one sa nemutiranim *IGHV* (3,2-10 godina) (9).

Ispitivana je i asocijacija *IGHV* mutacionog statusa sa drugim prognostičkim markerima. Tako je primećeno da su četiri najčešće hromozomske aberacije u HLL (del13q,

del11q, trizomija 12q i del17p), koje su i same snažni nezavisni prognostički markeri, različito zastupljene u M-HLL i N-HLL; povoljne citogenetičke aberacije (del13q, trizomija 12q) češće su praćene mutiranim *IGHV* statusom, a nepovoljne (del11q, del17p) nemutiranim (10-13). Pokazana je i superiornost analize *IGHV* mutacionog statusa u odnosu na analizu citogenetičkih aberacija u slučaju prognoze kod bolesnika sa delecijom 13q ili odsustvom hromozomskih aberacija (10). Pored toga, ekspresija nepovoljnih prognostičkih markera ZAP70 i CD38 na B-limfocitima mnogo je češća kod nosilaca *IGHV* nemutiranog statusa (7, 14, 15). Primećeno je i da je mutacioni status najčešćih rekurentno mutiranih gena u HLL (*NOTCH1*, *SF3B1*, *MYD88*, *BIRC3*, *NFKBIE*, *TP53*, *ATM*) različit u M-HLL i U-HLL podtipu (16).

Važno je pomenuti da, pored *IGHV* mutacionog statusa, snažan prognostički značaj ispoljava i genski repertoar *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžmana. Naime, pokazano je da HLL B-limfociti 25-30% pacijenata na svojoj površini ekspimiraju visoko homologe, skoro identične B-ćelijske receptore, nazvane "stereotipni BcR" (17). Do sada je otkriveno više stotina klasa stereotipnih BcR definisanog *IGHV-IGHD-IGHJ* repertoara i mutacionog statusa, a za najčešće od njih je pokazana i snažna asocijacija sa kliničkom slikom i prognozom. Tako je, na primer, prisustvo stereotipnih receptora klase 1 (*IGHV1/5/7/IGKV1(D)-39*), 2 (*IGHV3-21/IGLV3-21*) i 8 (*IGHV4-39/IGKV1(D)-39*) povezano sa agresivnom bolešću i nepovoljnim prognostičkim markerima, dok je klasa 4 (*IGHV4-34/IGKV2-30*) asocirana sa mlađom životnom dobi pacijenata i izrazito indolentnim kliničkim tokom (18).

Iako je prvobitna ideja bila da je *IGHV* mutacioni status snažan prognostički marker koji može predvideti OS, TTFT i PFS pacijenata sa HLL, daljim analiziranjem ovog markera spoznata je još jedna njegova značajna uloga - predikcija terapijskog odgovora (19-22). Naime, pacijenti sa mutiranim *IGHV* statusom imaju dobar terapijski odgovor na imunohemioterapiju, za razliku od pacijenata sa nemutiranim *IGHV* statusom kod kojih je novija biološka terapija niskomolekularnim agensima poput inhibitora bruton-tirozin kinaze (Ibrutinib), terapija izbora (21, 22).

Evropska inicijativa za istraživanja u HLL-u (engl. *European Research Initiative on CLL*, ERIC) dala je preporuke za analizu *IGHV* mutacionog statusa (23). Analiza *IGHV* mutacionog statusa u skladu sa vodećim internacionalnim preporukama treba da bude sprovedena što ranije, po mogućnosti neposredno po dijagnozi bolesti (24, 25). Za razliku od analize citogenetičkih aberacija fluorescentnom *in situ* hibridizacijom (engl. *fluorescent in situ hybridization*, FISH), čiji se rezultat može menjati usled klonske evolucije bolesti, *IGHV* mutacioni status je stabilni prognostički parametar i uglavnom se ne menja tokom bolesti, te nije potrebno ponavljanje analize (23, 26). Određivanje *IGHV* mutacionog statusa vrši se na mononuklearnim ćelijama periferne krvi ili koštane srži i neophodno je da u uzorku bude prisutno minimalno 5% HLL ćelija (23). Analiza se zasniva na PCR (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) amplifikaciji i sekvenciranju klonalnih *IGHV-IGHD-IGHJ*

rearanžmana. Korišćenjem imunogenetičkih baza podataka vrši se detaljna karakterizacija dobijenih sekvenci i identifikuje *IGHV/IGHD/IGHJ* genski repertoar HLL rearanžmana, kao i njegov mutacioni status. Mutacioni status *IGHV* definiše se kao stepen identičnosti (%) rearanžiranog *IGHV* gena sa "germline" sekvencom tog gena; stepen identičnosti  $\geq 98\%$  podrazumeva nemutirani *IGHV* status. U suprotnom, radi se o mutiranim *IGHV* statusu (23, 27). "Cut-off" vrednost od 98% je prvobitno izabrana pre svega kako bi se izbeglo da polimorfizmi *IGHV* gena, koji bi mogli da izazovu tih 2% diskrepance, budu pogrešno protumačeni kao somatska hipermutacija. Pored toga, empirijski je pokazano da ova vrednost najbolje razlikuje mutiran od nemutiranog *IGHV* statusa i pacijente sa dobrom i lošom prognozom, te je u kliničkoj praksi opšteprihvaćena (7, 8, 28, 29). Rezultati novijih istraživanja, međutim, menjaju aspekt posmatranja *IGHV* mutacionog statusa i sugerišu da se on ne može posmatrati kao dihotomna već kao kontinuirana varijabla, a preživljavanje pacijenata je u korelaciji sa stepenom mutiranosti *IGHV*. Što je on veći, bolje je preživljavanje pacijenata i terapijski odgovor (30).

Klinički utilitet ove analize jeste u orijentaciji kliničara prilikom planiranja praćenja pacijenata u "čekaj i gledaj" režimu i u odabiru terapijskog modaliteta HLL-a u slučaju progresije bolesti koja ispunjava kriterijume za započinjanje lečenja Međunarodne radionice za HLL (engl. *International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia*, IwCLL) iz 2008. godine (27, 31).

Iako je nedvosmisleno potvrđen prognostički i prediktivni značaj *IGHV* mutacionog statusa, razlog još uvek nije u potpunosti rasvetljen. Neke od teorija to objašnjavaju jačom signalizacijom BcR sa nemutiranim *IGHV* statusom, što vodi u veći stepen proliferacije i duže preživljavanje HLL B-limfocita, za razliku od mutiranih BcR kod kojih je signaling slabiji, te su ćelije posledično anergične (32). Jedna od skorašnjih hipoteza glasi da je *IGHV* mutacioni status određen tipom mehanizma reparacije DNK tokom procesa uvođenja somatskih hipermutacija. Ćelije koje brzo proliferišu imaju visoko aktivan mehanizam reparacije, te je stepen mutacija manji. Obrnuto je kod HLL ćelija niske proliferacije, kod kojih je mehanizam DNK reparacije slabiji, te su mutacije češće. Na osnovu toga je zaključeno da *IGHV* mutacioni status ne deluje direktno na tok bolesti i terapijski odgovor, već samo odražava stepen proliferacije HLL ćelija (33).

Analiza *IGHV* mutacionog statusa je, prema vodećim internacionalnim preporukama za praćenje i lečenje pacijenata sa HLL-om, tokom prethodne dve decenije postala jedna od najpouzdanijih biomarkera i neizostavni deo kliničkih algoritama u HLL-u (24-25, 31).

## Aberacije *TP53* gena

Aberacije *TP53* gena registrovane su kod preko 50% maligniteta kod ljudi, što rezultira poremećajem funkcije njegovog proteinskog proizvoda, p53 transkripcionog faktora (34). Od njegovog otkrića, tokom protekle četiri decenije stavovi o funkciji ovog gena menjali su se od, kako



se u početku mislilo, onkogeno do jednog od najznačajnijih tumor supresorskih gena, najispitivanijeg gena u biologiji tumora. Zbog svoje krucijalne uloge u regulaciji ćelijskog ciklusa i apoptoze, p53 se često naziva "čuvar genoma" (35). U slučaju oštećenja DNK, p53 vodi ćeliju u apoptozu ili zaustavlja ćelijski ciklus u G1 fazi dok ćelija ne kompletira proces DNK reparacije. Prilikom gubitka funkcije ovog proteina terapijski citotoksični odgovor imunohemioterapije izostaje zbog gubitka indukcije ćelijske smrti, te zaostaju ćelije sa akumuliranim štetnim, imunohemioterapijom izazvanim mutacijama, što je ogroman izazov u terapiji HLL-a (36).

U aberacije *TP53* gena spadaju delecija *TP53* gena i mutacije *TP53* gena.

Del17p, najnepovoljnija citogenetička aberacija u HLL, rezultira gubitkom *TP53* gena. Regstruje se u oko 5-8% bolesnika pri dijagnozi bolesti. Njena prevalencija, međutim, raste čak do 40% kod relapsa HLL, naročito nakon terapije purinskim analogima (12, 37, 38). Del17p je uglavnom obeležje agresivne i refraktarne bolesti sa kratkim OS i TTFT, te se ovi bolesnici nazivaju "visokorizičnim" (12).

Čak 80% bolesnika sa del17p ima mutaciju *TP53* gena u preostalom alelu, što se naziva fenomenom gubitka heterozigotnosti, a rezultira potpunim gubitkom funkcije p53 proteina (11). Mutacije *TP53* gena mogu postojati i bez del17p i takođe su jedno od obeležja "visoko rizičnih" bolesnika. Regstruju se kod 4-5% HLL bolesnika koji nisu lečeni, pa do 18% kod refraktarnih pacijenata (11, 12, 37, 39). U oko 75% slučajeva radi se o misens mutacijama u DNK vezujućem regionu, a ređe o insercijama, delecijama, nonsense ili mutacijama na splajs mestu (11, 40, 41). Prognoza bolesti je loša bez obzira da li je reč o monoalelskom ili bialelskom defektu *TP53* gena (42).

Detekcija del17p vrši se FISH metodom. Sprovođenjem samo ove analize, međutim, propustićemo oko 30-40% pacijenata sa mutacijom *TP53* gena (43). Iz tog razloga je preporučeno da se, pored FISH analize, vrši i skrining na *TP53* mutacije metodom sekvenciranja pre započinjanja lečenja HLL pacijenata i to kako pre prve, tako i pre svake sledeće terapijske linije jer se navedene aberacije mogu javiti i kasnije tokom bolesti (24, 25, 44). Jedan od uzroka ovakvog događaja je primena imunohemioterapije koja obezbeđuje selektivnu prednost u preživljavanju *TP53* aberantnih klonova i njihovu dalju klonsku evoluciju (45-47). Opisano je i prisustvo malih subklonova sa mutacijama *TP53* gena, čija je frekvencija pri dijagnozi bolesti toliko mala da se ne može detektovati klasičnim sekvenciranjem gena, već samo sekvenciranjem nove generacije (engl. *Next Generation Sequencing*, NGS). Ali, tokom bolesti, pre svega selektivnim uticajem imunohemioterapije, ova mala populacija subklonova može da postane dominantna (48).

Slično *IGHV* mutacionom statusu, i aberacije *TP53* gena nisu indikacija za započinjanje lečenja HLL bolesnika. Terapija se primenjuje samo u slučaju ispunjenja kriterijuma za započinjanje lečenja IwCCL iz 2008. godine, ali je svakako TTFT ovih bolesnika značajno kraće (27). Otkriće novih

terapijskih modaliteta u HLL-u dovelo je do revolucije u lečenju ovih visokorizičnih bolesnika, u mnogome poboljšavajući njihovo preživljavanje i terapijski odgovor. Tu spadaju inhibitori BTK (Ibrutinib), inhibitori fosfatidil-inozitol-3-kinaze (Idelalisib) i bcl-2 inhibitori (Venetoklaks) (49-51). Iz tog razloga je skrining *TP53* aberacija od krucijalnog značaja prilikom izbora terapijskog modaliteta HLL-a pre bilo koje terapijske linije bolesnika, u čemu se ogleda njegov prediktivni značaj (44). U okviru kliničkih studija se ispituje benefit ranijeg započinjanja lečenja ovih bolesnika, ali njegov značaj još uvek nije dokazan (52, 53).

## *IGHV* mutacioni status i aberacije *TP53* – prognostički indeksi

Za stratifikaciju HLL bolesnika prema grupama rizika koriste se prognostički indeksi, kao kombinacije više prognostičkih faktora koji nam omogućavaju pouzdano predviđanje ishoda bolesti. Mutacioni status *IGHV* i aberacije *TP53* gena neizostavni su deo većine ovih sistema. Izabrali smo jedan od njih kako bismo objasnili primenu ova dva biomarkera u kliničkoj praksi.

Internacionalni prognostički indeks za HLL (engl. *International Prognostic Index for Chronic Lymphocytic Leukemia*, CLL-IPI) jedan je od klinički najprihvaćenijih prognostičkih sistema u HLL-u (54). Rezultat je velike internacionalne studije sa preko 3400 bolesnika. U osnovi ovog sistema je pet prognostičkih faktora, na osnovu kojih se bolesnici stratifikuju u četiri grupe rizika, koje se razlikuju u preživljavanju i vremenu do progresije bolesti, tj. potrebe za započinjanjem lečenja. Princip bodovanja i stratifikacija na grupe rizika data je u **tabeli 1**.

Grupu vrlo visokog i visokog rizika obeležava prisustvo mutacija *TP53*, odnosno i/ili 17p, nemutiran *IGHV* i/ili visoke vrednosti beta-2-mikroglobulina. Prosečno vreme preživljavanja u visokorizičnoj grupi je 3,5 godina za 50% bolesnika, dok u niskorizičnoj grupi prosečno vreme preživljavanja nije dostignuto ni posle 13 godina praćenja. Ako, npr., bolesnik pripada niskorizičnoj grupi (5-godišnje OS 93%), najbolji pristup ovom bolesniku je „gledaj i čekaj“ (godišnje kontrole) jer oni imaju malu šansu za progresiju bolesti. U srednjoj grupi rizika (5-godišnje OS 73%) bolesnika je neophodno intenzivnije pratiti, ali ni oni ne zahtevaju terapiju sve dok ne postanu simptomatski. U grupama visokog i vrlo visokog rizika (5-godišnje OS 23-64%) neophodno je intenzivno praćenje.

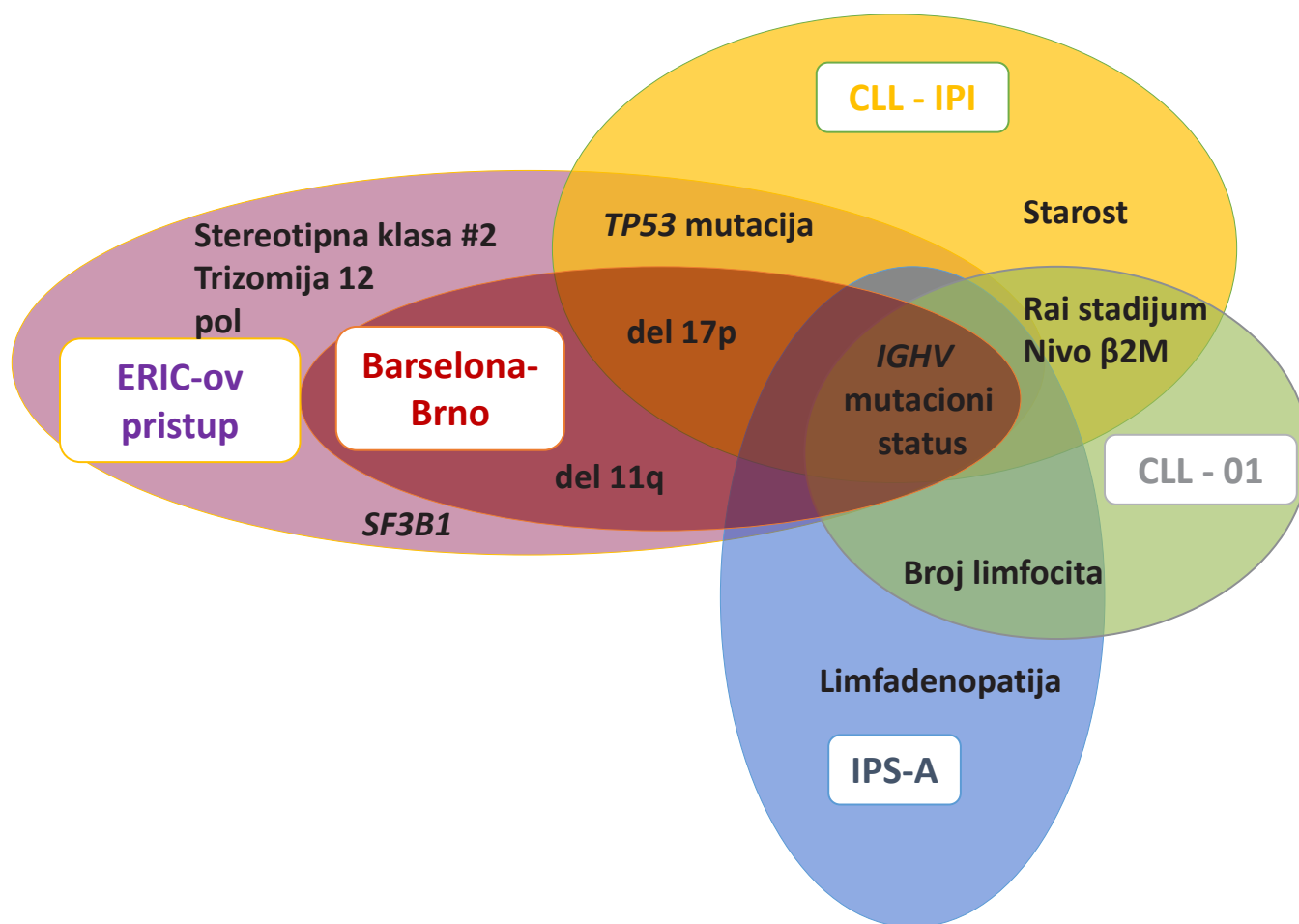
Pored CLL-IPI, *IGHV* mutacioni status i aberacije *TP53* gena su deo i drugih prognostičkih modela u HLL-u, poput Barselona-Brno prognostičkog skora samo sa biomarkerima, CLL-01, IPS-A, ERIC personalizovanog pristupa i drugih koji još uvek nisu deo rutinske kliničke prakse, ali njihovo pojašnjenje prevazilazi okvire ovog rada (55-58). Prikaz biomarkera u okviru ovih prognostičkih indeksa dat na **slICI 1** (59).

**Tabela 1.** CLL-IPI prognostički indeks

Prognostički faktor	Poeni
Del17p ili mutTP53	4
Nemutirani <i>IGHV</i> status	2
Serumski $\beta 2$ mikroglobulin >3,5mg/l	2
Rai stadijum I-IV	1
Starost >65 godina	1

Kumulativni CLL-IPI skor	Kategorija rizika	5-godišnje OS
0-1	nizak rizik	93%
2-3	srednji rizik	79%
4-6	visok rizik	64%
7-10	veoma visok rizik	23%

**Slika 1.** Noviji prognostički indeksi: CLL-IPI, Barcelona-Brno, CLL-01, IPS-A, personalizovan pristup grupe ERIC (Y Marín IG, et al. 2020.)

## Zaključak

Tokom poslednjih 55 godina, od uvođenja prvih prognostičkih sistema u HLL, postignut je značajan napredak na polju prognoze kliničkog toka i predikcije terapijskog ishoda ove bolesti. Sada smo u mogućnosti da analizom odgovarajućih biomarkera osmislimo "idealni" plan praćenja i lečenja svakog bolesnika ponaosob, što nas vodi u koncept personalizovane medicine. Iako još uvek ne postoji "savršeni" univerzalni prognostički, tj. prediktivni biomarker, neki biomarkeri su tome mnogo bliži od drugih, a to su nesumnjivo *IGHV* mutacioni status i aberacije *TP53* gena, zbog čega su neizostavni deo savremenih algoritama za praćenje i lečenje bolesnika sa HLL-om.

## Literatura

- Rozman C, Montserrat E. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 1995 Oct; 333(16):1052-7.
- Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2017 update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am J Hematol*. 2017 Sep; 92(9):946-65.
- Eichhorst B, Hallek M. Prognostication of chronic lymphocytic leukemia in the era of new agents. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2016 Dec; 2016(1):149-55.
- Cohen JA, Bomben R, Pozzo F, Tissino E, Härzschel A, Hartmann TN, et al. An Updated Perspective on Current Prognostic and Predictive Biomarkers in Chronic Lymphocytic Leukemia in the Context of Chemoimmunotherapy and Novel Targeted Therapy. *Cancers*. 2020 Apr; 12(4):894.
- Watson CT, Breden F. The immunoglobulin heavy chain locus: genetic variation, missing data, and implications for human disease. *Genes Immun*. 2012 Jul; 13(5):363-73.
- Giudice ID, Foà R. Another step forward in the 20-year history of *IGHV* mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2019 Feb; 104(2):219-21.
- Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, et al. IgV gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999 Sep; 94(6):1840-7.
- Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999 Sep; 94(6):1848-54.
- Parikh SA, Strati P, Tsang M, West CP, Shanafelt TD. Should *IGHV* status and FISH testing be performed in all CLL patients at diagnosis? A systematic review and meta-analysis. *Blood*. 2016 Apr; 127(14):1752-60.
- Sandoval-Sus JD, Chavez JC, Dalia S, Hussnain Naqvi SM, Talati C, Nodzon L et al. Association between immunoglobulin heavy-chain variable region mutational status and isolated favorable baseline genomic aberrations in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2018 Jan; 59(1):59-68.
- Zenz T, Eichhorst B, Busch R, Denzel T, Häbe S, Winkler D, et al. *TP53* Mutation and Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Clin Oncol*. 2010 Oct; 28:4473-9.
- Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000 Dec; 343: 1910-6.
- Grever MR, Lucas DM, Dewald GW, Neuberg DS, Reed JC, Kitada S, et al. Comprehensive assessment of genetic and molecular features predicting outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the US Intergroup Phase III Trial E2997. *J Clin Oncol*. 2007; 25(7):799-804;
- Rassenti LZ, Jain S, Keating MJ, Wierda WG, Grever MR, Byrd JC, et al. Relative value of ZAP-70, CD38, and immunoglobulin mutation status in predicting aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008 Sep; 112(5):1923-30
- Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2003 May; 348(18):1764-75.
- Baliakas P, Hadzidimitriou A, Sutton LA, Rossi D, Minga E, Villamor N, et al. European Research Initiative on CLL (ERIC). Recurrent mutations refine prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2015 Feb; 29(2):329-36.
- Stamatopoulos K, Agathangelidis A, Rosenquist R, Ghia P. Antigen receptor stereotypy in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2017 Feb; 31(2):282-91
- Baliakas P, Hadzidimitriou A, Sutton LA, Minga E, Agathangelidis A, Nichelatti M, et al. Clinical effect of stereotyped B-cell receptor immunoglobulins in chronic lymphocytic leukaemia: a retrospective multicentre study. *The Lancet Haematology*. 2014 Nov; 1(2):e74-84
- Lin KI, Tam CS, Keating MJ, Wierda WG, O'Brien S, Lerner S, et al. Relevance of the immunoglobulin VH somatic mutation status in patients with chronic lymphocytic leukemia treated with fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab (FCR) or related chemoimmunotherapy regimens. *Blood* 2009 Apr; 113: 3168-71.
- Thompson PA, Tam CS, O'Brien SM, Wierda WG, Stingo F, Plunkett W, et al. Fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab treatment achieves long-term disease-free survival in *IGHV*-mutated chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2016 Jan; 127(3):303-9.
- Guo A, Lu P, Galanina N, Nabhan C, Smith SM, Coleman M et al. Heightened BTK-dependent cell proliferation in unmutated chronic lymphocytic leukemia confers increased sensitivity to ibrutinib. *Oncotarget*. 2016 Jan; 7(4):4598-610.
- Brown JR, Hallek MJ, Pagel JM. Chemoimmunotherapy Versus Targeted Treatment in Chronic Lymphocytic Leukemia: When, How Long, How Much, and in Which Combination?. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2016; 35:e387-e398.
- Ghia P, Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, Stilgenbauer S, Stevenson F, et al. ERIC recommendations on *IGHV* gene mutational status analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2007 Jan; 21(1):1-3.
- Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Dohner H, et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood*. 2018 Jun; 131(25):2745-60.
- Wierda WG, Byrd JC, Abramson JS, Bilgrami F, Bociek G, Brander D, et al. Chronic Lymphocytic Leukemia/Small Lymphocytic Lymphoma, Version 4.2020, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2020 Feb; 18(2):185-217.
- Moysiadias T, Baliakas P, Rossi D, Catherwood M, Strefford JC, Delgado J, et al. Different time-dependent changes of risk for evolution in chronic lymphocytic leukemia with mutated or unmutated antigen B cell receptors. *Leukemia*. 2019 Jul; 33:1801-5.
- Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Dohner H, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 2008 Jun; 111(12):5446-56.
- Lin K, Sherrington PD, Dennis M, Matrai Z, Cawley JC, Pettitt AR. Relationship between p53 dysfunction, CD38 expression, and IgV(H) mutation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002 Aug; 100(4):1404-9.
- Kröber A, Seiler T, Benner A, Bullinger L, Brückle E, Lichter P, et al. V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002 Aug; 100(4):1410-6.



30. Jain P, Nogueras Gonzalez GM, Kanagal-Shamanna R, Rozovski U, Sarwari N, Tam C, et al. The absolute percent deviation of IGHV mutation rather than a 98% cut-off predicts survival of chronic lymphocytic leukaemia patients treated with fludarabine, cyclophosphamide and rituximab. *Br J Haematol*. 2018 Jan; 180: 33–40.
31. Chiorazzi N, Stevenson FK. Celebrating 20 Years of IGHV Mutation Analysis in CLL. *Hemasphere*. 2020 Jan;4(1):e334.
32. Burger JA, Chiorazzi N. B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Trends Immunol*. 2013 Dec;34(12):592-601.
33. Rozovski U, Keating MJ, Estrov Z. Why Is the Immunoglobulin Heavy Chain Gene Mutation Status a Prognostic Indicator in Chronic Lymphocytic Leukemia?. *Acta Haematol*. 2018;140(1):51-4.
34. Leroy B, Anderson M, Soussi T. TP53 mutations in human cancer: database reassessment and prospects for the next decade. *Hum Mutat*. 2014 Jun;35(6):672–88.
35. Biegging KT, Mello SS, Attardi LD. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat Rev Cancer*. 2014 May;14(5):359–70.
36. Aitken MJL, Lee HJ, Post SM. Emerging treatment options for patients with p53-pathway-deficient CLL. *Ther Adv Hematol*. 2019 Dec;10:2040620719891356.
37. Zenz T, Habe S, Denzel T, Mohr J, Winkler D, Buhler A, et al. Detailed analysis of p53 pathway defects in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): dissecting the contribution of 17p deletion, TP53 mutation, p53-p21 dysfunction, and miR34a in a prospective clinical trial. *Blood* 2009 Sep;114:2589–97.
38. Tam CS, O'Brien S, Lerner S, Khouri I, Ferrajoli A, Faderl S, et al. The natural history of fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia patients who fail alemtuzumab or have bulky lymphadenopathy. *Leuk Lymphoma* 2007 Oct;48:1931–9.
39. Rossi D, Cerri M, Deambrogi C, Sozzi E, Cresta S, Rasi S, et al. The prognostic value of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia is independent of del 17p13: implications for overall survival and chemorefractoriness. *Clin Cancer Res*. 2009 Feb;15(3):995–1004.
40. Zenz T, Vollmer D, Trbusek M, Smardova J, Benner A, Soussi T, et al. European Research Initiative on CLL (ERIC). TP53 mutation profile in chronic lymphocytic leukemia: evidence for a disease specific profile from a comprehensive analysis of 268 mutations. *Leukemia*. 2010 Dec;24(12):2072-9.
41. Bouaoun L, Sonkin D, Ardin M, Hollstein M, Byrnes G, Zavadil J, et al. TP53 Variations in human cancers: new lessons from the IARC TP53 database and genomics data. *Hum Mutat* 2016 Sep; 37: 865–76.
42. Zenz T, Kröber A, Scherer K, Häbe S, Bühler A, Benner A, et al. Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. *Blood*. 2008 Oct;112(8):3322–9.
43. Leroy B, Ballinger ML, Baran-Marszak F, Bond GL, Braithwaite A, Concin N, et al. Recommended guidelines for validation, quality control, and reporting of TP53 variants in clinical practice. *Cancer Res*. 2017 Mar;77(6):1250–60.
44. Pospisilova S, Gonzalez D, Malcikova J, Trbusek M, Rossi D, Kater AP, et al. ERIC recommendations on TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2012 Jul;26(7):1458–61.
45. Landau DA, Tausch E, Taylor-Weiner AN, Stewart C, Reiter JG, Bahlo J, et al. Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature*. 2015 Oct;526(7574):525–30.
46. Ghia P, Ljungström V, Tausch E, Agathangelidis A, Scheffold A, Scarfo L, et al. Whole-exome sequencing revealed no recurrent mutations within the PI3K pathway in relapsed chronic lymphocytic leukemia patients progressing under idelalisib treatment. *Blood*. 2016 Dec;128(22):1.
47. Pospisilova S, Sutton LA, Malcikova J, Tausch E, Rossi D, Montserrat E, et al. Innovation in the prognostication of chronic lymphocytic leukemia: how far beyond TP53 gene analysis can we go? *Haematologica*. 2016 Mar;101(3):263–5.
48. Rossi D, Khiabani H, Spina V, Ciardullo C, Brusca A, Famà R, et al. Clinical impact of small TP53 mutated sub-clones in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014 Apr;123(14):2139–47.
49. O'Brien S, Jones JA, Coutre SE, Mato AR, Hillmen P, Tam C, et al. Ibrutinib for patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion (RESONATE-17): a phase 2, open-label, multicentre study. *Lancet Oncol*. 2016 Oct;17(10):1409–18
50. Zelenetz AD, Barrientos JC, Brown JR, Coiffier B, Delgado J, Egyed M, et al. Idelalisib or placebo in combination with bendamustine and rituximab in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia: interim results from a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol*. 2017 Mar;18(3):297–311.
51. Stilgenbauer S, Eichhorst B, Schetelig J, Coutre S, Seymour JF, Munir T, et al. Venetoclax in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion: a multicentre, open-label, phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2016 Jun;17(6):768–78.
52. Langerbeins P, Bahlo J, Rhein C, Cramer P, Pflug N, Fischer K, et al. The CLL12 trial protocol: a placebo-controlled double-blind Phase III study of ibrutinib in the treatment of early-stage chronic lymphocytic leukemia patients with risk of early disease progression. *Future Oncol*. 2015;11(13):1895-903.
53. Langerbeins P, Bahlo J, Rhein C, Gerwin H, Cramer P, Fürstenau M, et al. Ibrutinib versus placebo in patients with asymptomatic, treatment-naïve early stage CLL: primary endpoint results of the phase 3 double-blind randomized CLL12 TRIAL. *Hematol Oncol* 2019 Jun; 37: 38–40.
54. International CLL-IPI working group. An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol*. 2016 Jun; 17(6):779-90.
55. Delgado J, Doubek M, Baumann T, Kotaskova J, Molica S, Mozas P, et al. Chronic lymphocytic leukemia: A prognostic model comprising only two biomarkers (IGHV mutational status and FISH cytogenetics) separates patients with different outcome and simplifies the CLL-IPI. *Am J Hematol*. 2017 Apr;92(4):375-80.
56. Gentile M, Shanafelt TD, Cutrona G, Molica S, Tripepi G, Alvarez I, et al. A progression-risk score to predict treatment-free survival for early stage chronic lymphocytic leukemia patients. *Leukemia*. 2016 Jun;30(6):1440-3.
57. Condoluci A, Terzi di Bergamo L, Langerbeins P, Hoehstetter MA, Herling CD, De Paoli L, et al. International prognostic score for asymptomatic early-stage chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2020 May;135(21):1859-69.
58. Baliakas P, Moysiadis T, Hadzidimitriou A, Xochelli A, Jeromin S, Agathangelidis A, et al. Tailored approaches grounded on immunogenetic features for refined prognostication in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2019 Feb;104(2):360-9.
59. Y Marín IG, Muñoz-Novas C, Figueroa I, Hernández-Sánchez M, Rodríguez-Vicente AE, Quijada-Álamo M, et al. Prognosis Assessment of Early-Stage Chronic Lymphocytic Leukemia: Are We Ready to Predict Clinical Evolution Without a Crystal Ball? *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2020 Apr; S2152-2650(20)30136-1.