Universitätsklinikum Ulm
Zentrum für Innere Medizin
Klinik für Innere Medizin III
Ärztlicher Direktor: Herr Prof Dr. med. H. Döhner

Nachweis von p53-Aberrationen mittels direkter Sequenzanalyse bei der chronisch lymphatischen Leukämie vom B-Zell-Typ: Inzidenz und prognostische Bedeutung im Vergleich mit 17p-Aberrationen und mit dem VH-Mutationsstatus

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

Katrin Kraus, geb. Scherer
geboren in Krumbach
2008

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Stephan Stilgenbauer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Barth

Tag der Promotion: 24.04.2009

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis III

1. Einleitung 1

1.1 Das klinische Bild der Chronischen Lymphatischen Leukämie vom B – Zell Typ (B-CLL) 1
1.2 Die Therapie der B-CLL 2
1.3 Prognostische Faktoren 3
1.4 Das Tumorsuppressorgen p53 6
1.5 Fragestellungen der Arbeit 11

2. Material und Methodik 12

2.1 Patienten 12
2.2 Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut und Knochenmark 12
2.3 DNA – Präparation 13
2.4 DNA – Amplifikation 15
2.5 DNA – Sequenzierung 19
2.6 Auswertung der Daten und statistische Analysen 23
2.7 Häufig verwendete Puffer und Lösungen 23
2.8 Reagenzien, Chemikalien und sonstige Materialien 24

3. Ergebnisse 26

3.1 Etablierung der p53 PCR 26

3.2 Ergebnisse der Sequenzanalysen des p53 – Gens 29
3.3 Vergleich der Ergebnisse der FISH- und Sequenzanalysen 34
3.4 Korrelation der Ergebnisse mit dem Überleben 36
3.5 Verlaufsanalysen unter Therapie 41

4. Diskussion 43

4.1 Diskussion der Methodik 43
4.2 p53 – Mutationen in der B – CLL 48
4.3 Vergleich zwischen mono – und biallelischen Aberrationen 52
4.4 p53 – Mutationen im Therapieverlauf 54
4.5 p53 als relevantes Gen in der Bande 17p13.1 ? 55
4.6 Schlussfolgerungen 56
4.7 Ausblick 56

5. Zusammenfassung 58

6. Literaturverzeichnis 60

7. Danksagung 75

Abkürzungsverzeichnis

AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATM	Ataxia teleangiectasia mutated
B-CLL	Chronisch lymphatische Leukämie vom B-Zell-Typ
bp	Basenpaar
CD	Cluster of differentiation
CHOP	Cyclophosphamid, Doxorubicin (Hydroxydaunorubicin), Vincristin (Oncovin), Prednison
CLL	Chronisch Lymphatische Leukämie
CLL/PL	Chronisch Lymphatische Leukämie mit 10-55% Prolymphozten im peripheren Blut
COP	Cyclophosphamid, Vincristin (Oncovin), Prednison
CpG	Cytidin - Phosphat - Guanosin
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	Doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FISH	Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung
HPLC	High performance liquid chromatography
Ig	Immunglobulin
kb	Kilobase
LDH	Lactatdehydrogenase
MALT	Mucosa-associated lymphoid tissue
µM	Mikromolar
NHL	Non-Hodgkin Lymphom

p53	Protein 53
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI-Medium	Roswell Park Memorial Institute Medium
SCT	Stammzelltransplantation
SSCP	Single-strand conformation polymorphism
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	Thermus aquaticus
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TEMED	Tetraethylendiamid
TRIS	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
ZAP-70	Zeta-chain-associated protein kinase 70

1. Einleitung

1.1 Das klinische Bild der Chronischen Lymphatischen Leukämie vom B – Zell Typ (B-CLL)

Das klinische Bild der Chronischen Lymphatischen Leukämie vom B-Zelltyp (B-CLL) wurde erstmals 1924 von Minot und Isaacs beschrieben (MINOT et al., 1924). Charakteristisch für die B-CLL ist eine klonale Proliferation und Akkumulation kleiner, morphologisch reifer B-Lymphozyten im peripheren Blut, Knochenmark und in anderen lymphatischen Organen (BENNETT et al., 1989). Der Anteil der mitotisch aktiven Lymphozyten ist gering. Mehr als 95 % der neoplastischen CLL-Zellen befinden sich im ruhenden Zustand in der G_0-Phase des Zellzyklus (REED, 1998). Der Immunphänotyp der Lymphozyten wird charakterisiert durch Expression von B-Zell-assoziierten Membran-Antigenen, wie CD19, CD20 und CD23 (ROZMAN et al., 1995).

Mit einem Anteil von etwa 30% stellt sie heute die häufigste Leukämieform im Erwachsenenalter in Westeuropa und Nordamerika dar (GALE et al., 1987). Die CLL kommt bei Personen unter 40 Jahren selten vor (SPIER et al., 1985) und lässt aber vom 50. bis 80. Lebensjahr eine steigende Inzidenz von 5,2 bis 30,4 Fälle pro 100.000 Personen erkennen (FAGUET, 1994). Das Verhältnis von männlichen und weiblichen Betroffenen beträgt etwa 2:1 (GALE et al., 1987).

Die CLL ist bei 40 bis 60% der Patienten ein Zufallsbefund im asymptomatischen Zustand. Leitsymptom ist eine generalisierte Lymphadenopathie. Neben Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust, Müdigkeit und Abgeschlagenheit kann das klinische Bild ferner durch Leukozytose, Hepatomegalie, Splenomegalie, Hypogammaglobulinämie und Hautveränderungen (Pruritus, Ekzeme, Hautblutungen) charakterisiert sein. Im weiteren Krankheitsverlauf kann es zu folgenden Komplikationen kommen: Anämie und Thrombozytopenie als Folge einer progressiven Knochenmarkinfiltration, Hypersplenismus, Autoimmunphänomene, Infektionen und einer sekundären hochmalignen Transformation (Richter-Syndrom) (Übersicht bei ROZMAN et al., 1995).

1.2 Die Therapie der B-CLL

Der klinische Verlauf der CLL ist äußerst variabel (BYRD et al., 1998; MONTSERRAT, 2006). Einige Patienten sterben innerhalb von wenigen Monaten trotz intensiver Behandlung, während andere 20 Jahre und länger leben und keiner Therapie bedürfen (ROZMAN et al., 1995; ZWIEBEL et al., 1998).

Die Standardtherapie der CLL ist die Chemotherapie mit dem Alkylans Chlorambucil oder dem Purinanalogon Fludarabin. Allerdings hat diese Behandlung nur palliativen Charakter. Da mehrere Studien zeigten, dass ein Behandlungsbeginn in frühen Stadien der Krankheit keine Vorteile hinsichtlich des Überlebens und der Lebensqualität bringt, werden nur symptomatische Patienten chemotherapeutisch behandelt (CHESON et al., 1996; DIGHIERO et al., 1998, 2000; CLL TRIALIST'S COOPERATIVE GROUP, 1999; HALLEK et al., 2008).

Eine Ausnahme dieser Empfehlung stellt die Behandlung im Rahmen von klinischen Studien dar. Hier werden derzeit verschiedene Therapieprinzipien geprüft.

Die allogene Blutstammzelltransplantation (SCT) wird mit potentiell kurativer Intention durchgeführt. Mit dem gleichen Ansatz wird auch die autologe SCT angewandt. Allerdings gibt es nach derzeitigen Erkenntnissen wenig Hoffnung, dass sie die Erkrankung heilen kann (KHOURI et al., 1998; ESTEVE et al., 2001; DREGER et al., 2002; BYRD et al., 2004), jedoch ist bei Patienten mit schlechten prognostischen Faktoren ein Überlebensvorteil zu beobachten (DREGER at al., 2004). Desweiteren werden monoklonale Antikörper gegen Oberflächenantigene der malignen B-Zellen, z.B. Rituximab (anti-CD20) und Campath-1H (anti-CD52) verabreicht. Diese können als alleinige Therapie, in Kombination mit Fludarabin oder bei Blutstammzelltransplantation gegeben werden (HUHN et al., 2001; BYRD et al., 2000; KEATING et al., 2002; LUNDIN et al., 2002; KENNEDY et al., 2002). Zur endgültigen Bewertung dieser Therapieoptionen müssen weitere klinische Studien und längere Nachbeobachtungszeiten abgewartet werden (RAI et al., 2001).

Bei der Wahl einer Therapie aus diesem weiten Spektrum wird das Ziel verfolgt, eine an das individuelle Risiko des Patienten adaptierte Therapie durchzuführen. Zu dessen Abschätzung sind verschiedene prognostische Faktoren wichtig.

1.3 Prognostische Faktoren

Die klinische Stadieneinteilung nach den Klassifikationen von Binet (BINET et al., 1981) und Rai (RAI et al., 1975) ist sehr nützlich zur Abschätzung der Prognose der CLL. In frühen Stadien der Erkrankung (50 bis 60 % der Patienten) erlaubt sie aber keine Unterscheidung zwischen der stabilen oder progressiven Form der Erkrankung. Die Diagnose CLL wird jedoch zunehmend in frühen Krankheitsstadien gestellt. Aus diesen Gründen werden weitere prognostische Faktoren immer wichtiger. Patienten mit schlechter Prognose sowie erhöhtem Risiko für einen schnellen Krankheitsprozess könnten dann sofort nach Diagnosestellung therapiert werden und davon profitieren.

Mit ungünstiger Prognose korreliert eine große Tumormasse, ein diffuses Knochenmarksinfiltrationsmuster, eine Lymphozytenzahl $>50x10^9/l$ mit einem Prolymphozytenanteil >10 % im peripheren Blut und eine Lymphozytenverdopplungszeit ≤ 12 Monate sowie weitere Parameter im Serum (z.B. Erhöhung von LDH, $ß_2$-Mikroglobulin, Thymidinkinase, CD23, CD44) (Übersicht bei MONTSERRAT, 2002).

Des Weiteren wurden durch die Detektion chromosomaler Aberrationen wichtige prognostische Faktoren gefunden (JULIUSSON et al., 1998). Die konventionelle zytogenetische Analyse der B-CLL durch Bänderungsanalysen gefärbter Metaphase-Chromosomen ist wegen der niedrigen Mitoserate der neoplastischen B-Zellen schlecht geeignet. Verschiedene Stimulationsversuche während der 60iger und 70iger Jahre hatten nur unbefriedigende Ergebnisse zur Folge. Mit Hilfe von Chromosomenbänderungsanalysen können derzeit in 40 bis 50 % der Fälle spezifische genomische Aberrationen gefunden werden. Am häufigsten wurden bei Analysen mit dieser Methode Trisomie 12 und Abnormalitäten der Bande 13q14 gefunden (JULIUSSON et al., 1998).
Durch Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH), mit der sich auch Interphasekerne analysieren lassen, werden bei 80 % der Patienten genomische Aberrationen detektiert. Es konnten so prognostisch bedeutsame Subgruppen identifiziert werden, die signifikant unterschiedliche Krankheitsverläufe aufwiesen (DÖHNER et al., 2000). Die längsten Überlebenszeiten und den besten klinischen Verlauf haben Patienten mit einer

13q-Deletion als Einzelaberration, welche in der B-CLL auch am häufigsten vorkommt (DÖHNER et al., 2000). Demgegenüber zeigen Patienten mit Trisomie 12 eine schnellere Progression der Erkrankung mit kürzeren Überlebenszeiten (ESCUDIER et al., 1993; NEILSON et al., 1997; JULIUSSON et al., 1998; DÖHNER et al., 2000). 11q-Deletionen, in der FISH-Analyse die zweithäufigste genomische Aberration, gehen mit einer ausgeprägten Lymphadenopathie sowie einem schnellen Voranschreiten der Erkrankung einher und kommen vor allem bei jüngeren Patienten vor (DÖHNER et al., 1997). Das behandlungsfreie Intervall ist kurz (DÖHNER et al., 1997; NEILSON et al., 1997). Die schlechteste Prognose unter allen genomischen Veränderungen haben Patienten mit Aberrationen auf dem kurzen Arm von Chromosom 17.
Über den molekularen Hintergrund dieser chromosomalen Aberrationen ist nur wenig bekannt. Auf Chromosom 13 enthält die Bande 13q14 ein Tumorsuppressorgen, das in der B-CLL eine Rolle spielt (LIU et al., 1997; KALACHIKOV et al., 1997; STILGENBAUER et al., 1998). Veränderungen im *ATM* (ataxia-telangiectasia mutated) Gen werden mit Verlusten von 11q in Verbindung gebracht (BULLRICH et al., 1999; SCHAFFNER et al,. 1999). Bei 17p-Deletionen ist das Tumorsuppressorgen p53 betroffen (ISOBE et al., 1986). Für die anderen Aberrationen sind derzeit noch keine pathogenetisch relevanten Gene bekannt (DÖHNER et al., 2000).

In den vergangenen Jahren wurde ein weiterer genetischer Marker untersucht, orientierend am Stadium der B-Zell-Differenzierung. Es wurde festgestellt, dass neoplastische B-Lymphozyten bei der B-CLL unmutierte oder mutierte variable Schwerkettenregionen der Immunglobulingene besitzen, wobei erstere von naiven B-Zellen vor Durchlaufen des Keimzentrums herrühren und Mutierte von Post-Keimzentrumszellen, z.B. Memory-Zellen abstammen. 1999 zeigten Damle und Hamblin unabhängig voneinander, dass in etwa der Hälfte aller Fälle diese Gene in den neoplastischen Lymphozyten somatisch mutiert sind und dass mutierte V_H-Gene mit günstigerer, unmutierte V_H-Gene mit ungünstigerer Prognose einhergehen. Somit kann der IgV-Mutationsstatus schon in frühen Stadien der Erkrankung zwischen zwei Risikogruppen unterscheiden. Des Weiteren wird jedoch der Gebrauch spezifischer V_H-Gene, wie z.B. V_H3-21, unabhängig vom oben beschriebenen Mutationsstatus mit schlechterem Krankheitsverlauf in Verbindung gebracht (TOBIN et al., 2002).

Um die Prognoseabschätzung des V_H-Mutationsstatus in der Routinediagnostik einfach nutzen zu können, wurden weitere Parameter identifiziert. Die Expression des Oberflächenantigens CD38 geht mit kürzeren Überlebenszeiten einher. Es wurde allerdings nur eine geringe Korrelation zwischen CD38-Expression und unmutierten V_H-Genen nachgewiesen (DAMLE et al., 1999, KRÖBER et al., 2002). Außerdem kann sich die CD38-Expression auch im Verlauf der Erkrankung ändern (CHEVALLIER et al., 2002). Deshalb kann sie die Analyse der V_H-Gene nicht ersetzen (ORCHARD et al., 2004).
Die Expression des intrazellulären ZAP-70 Proteins stellt einen weiteren prognostischen Faktor dar. Normalerweise kommt ZAP-70 in T- und NK-Zellen vor, nicht dagegen in gesunden B-Zellen (CRESPO et al., 2003). Eine hohe ZAP-70 Expression in CLL-Zellen geht mit schlechtem klinischem Verlauf, schneller Krankheitsprogression und kurzen Überlebenszeiten einher. Im Gegensatz zur CD38-Expression scheint die ZAP-70 Expression im Verlauf der Erkrankung stabil zu sein (CRESPO et al., 2003; WIESTNER et al., 2003; ORCHARD et al., 2004). Es besteht zwar eine hohe Korrelation mit dem V_H-Mutationsstatus, die T-Zellen müssen jedoch sorgfältig getrennt werden. Des Weiteren sind die Ergebnisse verschiedener Labore nicht vergleichbar, die Cut-off-Werte verschieden. In allen bisher veröffentlichten Studien stimmen 10 bis 30 % der Fälle nicht mit dem Mutationsstatus überein. Somit kann auch die ZAP-70 Expressionsanalyse, anders als anfangs angenommen, nicht als Ersatz für die Untersuchung von V_H-Genen angewendet werden (BYRD et al., 2004; MONTSERRAT, 2006).

In einer großen Patientenserie (KRÖBER et al., 2002) wurden in einer multivariaten Analyse unter den aufgeführten prognostischen Parametern V_H-Mutationsstatus, 17p-Deletionen, 11q-Deletionen, Alter, Leukozytenzahl und Serum-LDH als signifikante prognostische Faktoren identifiziert. Bei der Abschätzung der Prognose scheinen sich V_H-Mutationsstatus und genomische Aberrationen zu ergänzen. Bereits in frühen Stadien der Erkrankung kann so der individuelle klinische Verlauf vorhergesagt werden.

Den stärksten unabhängigen Faktor mit schlechter Prognose stellen genomische Aberrationen auf 17p dar (EL ROUBY et al., 1993; GEISLER et al., 1997; DÖHNER et al., 1995; 2000; OSCIER et al., 2002). Bei den 17p-Deletionen ist der kurze Arm von Chromosom 17 betroffen, auf dem verschiedene Tumorsuppressorgene lokalisiert sind. Ein potentieller Kandidat ist das Tumorsuppressorgen p53.

Bei der B-CLL wurden Mutationsraten des p53 Tumorsuppressorgens in der Bande 17p13 zwischen 10 und 16% beschrieben. (GAIDANO et al.,1991; FENAUX et al., 1992; EL ROUBY et al., 1993; WATTEL et al., 1994; DÖHNER et al., 1995; LENS et al., 1997).
Die Krankheit schreitet bei Patienten mit 17p-Deletion oder p53-Mutation sehr schnell voran. Meist haben sie klinisch ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium. Auch Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust (B-Symptomatik), Spleno- und Lymphadenopathie treten in dieser Patientengruppe häufiger auf. Im Blutbild finden sich niedrigere Hämoglobin- und Thrombozytenwerte, im Serum eine erhöhte LDH und AP sowie ein erniedrigtes Albumin (DÖHNER et al., 2000).
p53-Mutationen oder 17p-Deletionen werden mit Therapieresistenz gegen Chlorambucil und andere Alkylantien (EL ROUBY et al., 1993), gegen Purinanaloga, wie z.B. Fludarabin (DÖHNER et al., 1995), sowie gegen den monoklonalen anti-CD20 Antikörper Rituximab in Verbindung gebracht (BYRD et al., 2003).
Patienten, die eine 17p-Deletion oder eine p53-Mutation haben, finden sich meist in der V_H-unmutierten Subgruppe. Allerdings haben sie unabhängig vom V_H-Mutationsstatus in multivariaten Analysen die kürzesten Gesamtüberlebenszeiten unter allen CLL-Patienten (KRÖBER et al., 2002; OSCIER et al., 2002).

1.4 Das Tumorsuppressorgen p53

Das p53-Gen ist ein sehr gut charakterisiertes Tumorsuppressorgen in menschlichen Tumoren, das eine zentrale Rolle in der Tumorentstehung spielt. Es ist in ungefähr der Hälfte aller humanen Tumoren, insbesondere Mamma-, Kolon-, Lungen- und Leberkarzinomen, mutiert oder deletiert. Weniger häufig treten p53-Mutationen jedoch bei hämatologischen Erkrankungen auf. Sie werden mit fortgeschrittenem Krankheitsstadium, schlechtem Ansprechen auf Chemo- und Radiotherapie und kurzen Überlebenszeiten in Verbindung gebracht (SOUSSI et al., 1994).

1.4.1 Funktionen des Tumorsuppressorgens p53

Die Hauptfunktion des Tumorsuppressorgens p53 besteht im Schutz der Zelle vor Tumorentstehung. Im aktivierten Zustand reguliert p53 hauptsächlich den Zellzyklus und ist für die DNA-Reparatur oder Apoptose nach exogenen Schädigungen der DNA zuständig (WEBER et al., 2002).

Im nicht induzierten Zustand liegt das p53-Protein wegen seiner kurzen Halbwertszeit von 20 Minuten, in sehr niedrigen Konzentrationen in der Zelle vor. Auch hier spielt es eine Rolle bei der Reparatur endogener DNA (ALBRECHTSEN et al., 1999). Genotoxischer Stress, z.B. Behandlung der Zellen mit DNA-schädigenden Medikamenten, Chemikalien oder Strahlung, Hypoxie oder Verarmung an bestimmten Nährstoffen, wie z.B. Ribonukleosidtriphosphate, wird von verschiedenen Kinasen oder von p53 selbst erkannt. Über direkte Phosphorylierung der Phosphorylierungsstellen in der N- und C-terminalen p53-Domäne oder über Signalkaskaden wird die Information an p53 weitergeleitet (MEEK, 1997; GATZ et al., 2006). Die Konzentration von p53 nimmt in den betroffenen Zellen zu. In Abhängigkeit von den Kinasen kann die sequenzspezifische Bindungsaktivität modifiziert und entsprechende p53-Zielgene aktiviert werden. So kommt es zu einem Wachstumsarrest, zur DNA-Reparatur oder Apoptoseinduktion (LEVINE, 1997; LEVIN et al., 2006):

- Über verschiedene Kontrollmechanismen im Zellzyklus kann aktiviertes p53 regulierend eingreifen und die Zellen arretieren (LEVINE, 1997; JANUS et al., 1999). Damit schützt p53 vor der Proliferation von genomisch geschädigten Zellen und gewährt Zeit zur DNA-Reparatur (LANE, 1992), an der es durch Aktivierung einiger Gene auch selbst mitwirkt (LEVINE, 1997). Anschließend kann die Zelle wieder in den Zellzyklus eingeschleust werden.

- Sind die Schäden an der DNA allerdings sehr ausgeprägt oder sind in den Zellen schon Onkogene aktiviert, leitet die Zelle die Apoptose ein (BATES, 1999). Hier sind die Mechanismen nur teilweise geklärt (LEVINE, 1997).

1.4.2 Aufbau des Tumorsuppressorgens p53

Das p53-Protein ist ein nukleäres, aus 393 AS bestehendes Phosphoprotein, das auf dem Chromosom 17p13.1 lokalisiert ist und durch die Exons 2 bis 11 codiert wird (PROKOCIMER et al., 1994). Sowohl strukturell als auch funktionell teilt sich das Protein in vier Domänen auf (LEVINE, 1997).

- N-terminal enthält p53 eine saure Transaktivatordomäne, die 42 AS umfasst (LEVINE, 1997). Dort liegen einige Phosphorylierungsstellen für verschiedene Kinasen (JAYARAMAN et al., 1999). Im Anschluss folgt eine hydrophobe prolinreiche Domäne (AS 61-94) (MILNER, 1997), die wohl über Wechselwirkungen mit SH_3-reichen Proteinen an der Auslösung der Apoptose beteiligt ist.
- Die zentrale Domäne (AS 102-292) vermittelt die spezifische DNA-Bindung von p53 und weist zusätzlich eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität auf (LEVINE, 1997; JANUS et al., 1999).
- AS 324 bis 355 stellen eine Oligomerisierungsdomäne dar, die hauptsächlich dafür verantwortlich ist, dass das p53-Molekül in der Form eines Tetramers vorliegt. Diese Konfiguration erleichtert die Bindung an DNA. Mit der zentralen Domäne ist sie über eine flexible Verbindung von 37 AS-Resten (AS 287-323) verbunden, welche Informationen über den Transport von p53 in den Zellkern trägt (LEVINE, 1997).
- Das basische C-terminale Ende reguliert die 3'-5'-Exonuklease-Aktivität und die Fähigkeit des Moleküls, mit dem zentralen Abschnitt spezifische DNA-Sequenzen zu binden. Außerdem wird geschädigte DNA erkannt. RNA, Einzelstrang- und Doppelstrang-DNA kann nicht sequenzspezifisch gebunden und mit komplementären Nukleinsäuren rehybridisiert werden (MILNER, 1997).

Zudem enthält das Molekül fünf hochkonservierte Bereiche, die sich innerhalb aller Vertebraten kaum unterscheiden. Dies zeigt, dass ihnen wohl entscheidende regulatorische Funktionen zukommen (LEVINE, 1997). Vier der fünf Domänen befinden sich im zentralen Bereich des Gens zwischen Exon 5 und 8 (HOLLSTEIN et al., 1991).

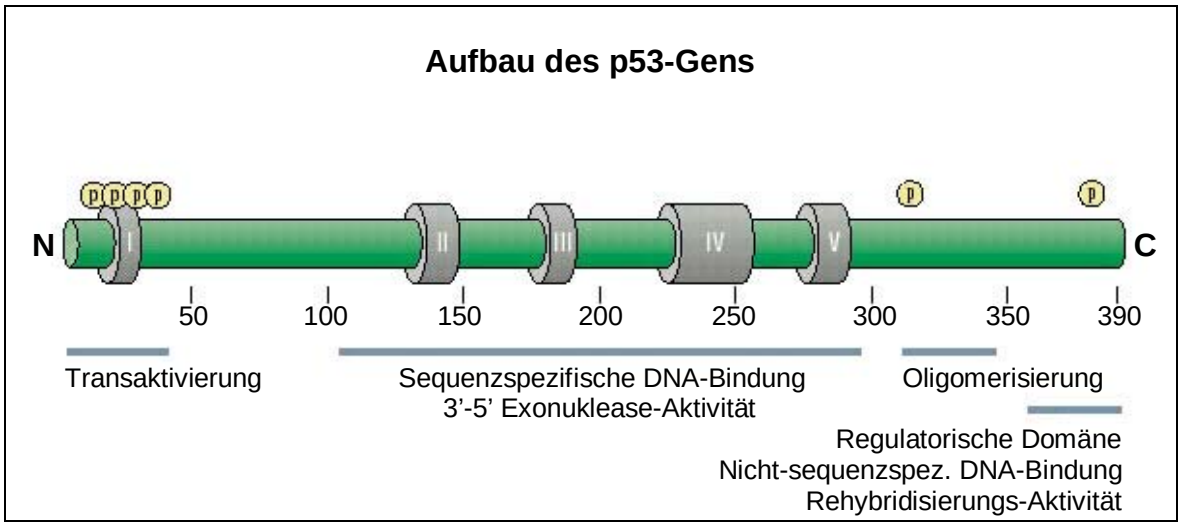

Abbildung 1: Schematische Darstellung des p53-Moleküls in linearisierter Form. (nach: ALBRECHTSEN, 1999). Eingezeichnet sind die vier Domänen von p53 (blaue Balken), die Phosphorylierungsstellen in der N- und C-terminalen Domäne (gelbe Kreise) und die fünf konservierten Bereiche (graue Ringe mit römischen Ziffern), die im zentralen Abschnitt folgende Codons umfassen: II = Codon 130-142, III = Codon 171-181, IV = Codon 234-258, V = Codon 270-286 (HOLLSTEIN et al,. 1991). DNA = Desoxyribonukleinsäure.

1.4.3 Mutationen des p53-Gens

Mutationen von Tumorsuppressorgenen verhalten sich im Allgemeinen rezessiv gegenüber dem Wildtyp-Allel. Zur Tumorentstehung kommt es typischerweise nur dann, wenn zusätzlich das zweite Allel des Tumorsuppressorgens durch Mutation oder Deletion inaktiviert wird (KNUDSON, 1971; 1993; LEVINE et al., 1991). Durch den Austausch einer einzigen Base und damit auch einer Aminosäure kann es so zur Produktion fehlerhafter Proteine kommen. Diese reichern sich aufgrund ihrer Konformationsänderung in den betroffenen Zellen an. Jedoch können sie in den meisten Fällen DNA nicht mehr binden und die Transkription nicht mehr aktivieren (SOUSSI et al,. 1996). Es kommt zum vollständigen Funktionsverlust des p53-Gens (MICHALOVITZ et al., 1991). Die Zelle erlangt einen selektiven Wachstumsvorteil, ist durch genetische Instabilität gekennzeichnet und hat ein extrem erhöhtes Risiko der malignen Entartung (LANE, 1992).

Allerdings kann im Falle von p53 das mutierte Allel auch einen dominant negativen Effekt gegenüber dem anderen intakten Allel ausüben. Die Konformation des verbliebenen Wildtyp-Proteins wird durch Komplexbildung so verändert, dass es zur Blockierung der

normalen p53-Tumorsuppressorfunktion kommt (MILNER et al., 1991; DITTMER et al., 1993).
p53 kann durch die Mutation zusätzliche Funktionen erlangen und das maligne Zellwachstum direkt stimulieren. Abhängig ist diese Aktivierung zum Onkogen von der Position der Punktmutation, die die Konformation des mutierten Proteins bestimmt. Ein solcher Zugewinn an Funktion durch die Mutation geht mit schlechterer Prognose einher als Mutationen mit alleinigem Funktionsverlust des p53-Gens (DITTMER et al., 1993; HARVEY et al., 1995; SIGAL et al., 2000; GATZ et al., 2006).

Genetische Aberrationen treten im p53-Gen in mehr als 90% der Fälle als Punktmutationen auf (VOUSDEN et al., 2002). Jedoch können auch Deletionen des kurzen Arms von Chromosom 17 zur Inaktivierung der Tumorsuppressorfunktion führen (PROKOCIMER et al., 1994). Bei hämatologischen Erkrankungen findet man häufig einen Verlust des einen Allels und gleichzeitig eine p53-Mutation auf dem anderen verbliebenen Allel (LEVINE et al., 1991; IMAMURA et al., 1994). Einen Großteil dieser Punktmutationen findet man innerhalb der zentralen Domäne und dort vor allem in den konservierten Bereichen (LEVINE et al., 1991). Da die Mutationen und Deletionen hauptsächlich zwischen Exon 5 und 9 gefunden werden, ist p53 wahrscheinlich das relevante Gen bei 17p-Deletionen.

Weiterhin ungeklärt ist allerdings, ob möglicherweise bei der CLL auch Mutationen außerhalb von Exon 5 bis 9 vorhanden sind. Es gibt bisher bei der CLL keine Studien, die die Inzidenz von 17p-Deletionen mittels FISH und p53-Mutationen in der direkten Sequenzanalyse verglichen haben. Außerdem wurde bisher die prognostische Bedeutung von monoallelischen Veränderungen im Vergleich zu Biallelischen nicht beschrieben.

1.5 Fragestellungen der Arbeit

1.5.1 Inhaltlicher Teil

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte die Rolle von genomischen Veränderungen des p53 Gens bei der B-CLL untersucht werden. Es wurde mit der FISH-Analyse nach 17p-Aberrationen gesucht. Schwerpunktmäßig wurde die Inzidenz von p53-Veränderungen in der direkten Sequenzanalyse untersucht. Prognostische Untersuchungen bezüglich des Überlebens wurden zusätzlich im Vergleich mit dem V_H-Mutationsstatus durchgeführt. Es stellte sich die Frage, ob die Sequenzanalyse bei der Detektion von 17p-Aberrationen zusätzliche Informationen bringt. Außerdem war die Inzidenz mono- und biallelischer 17p-Veränderungen und deren prognostische Bedeutung für CLL-Patienten von besonderem Interesse.

1.5.2 Methodischer Teil

Zur Beantwortung der oben gestellten Fragen wurden Experimente mit genomischer DNA durchgeführt. Dazu mussten folgende Methoden etabliert werden:

1. Konstruktion der Oligonukleotid-Primer
2. Amplifikation der verschiedenen Abschnitte des p53 Gens aus genomischer DNA mittels PCR
3. Direktes Sequenzieren der amplifizierten PCR-Produkte

2. Material und Methodik

2.1 Patienten

Insgesamt wurde Material von 119 Patienten mit B-CLL untersucht, die zwischen Oktober 1990 und August 1998 in der Medizinischen Klinik und Poliklinik V der Universität Heidelberg in die Studie aufgenommen wurden. Die B-CLL wurde nach standardisierten Kriterien diagnostiziert. Erforderlich war eine persistierende Lymphozytose $>5{,}0x10^9$/l. Bei der Immunphänotypisierung waren alle 119 Fälle $CD19^+$, $CD5^+$ und $CD23^+$. Die klinische Stadieneinteilung erfolgte bei 118 Patienten nach Binet bei Aufnahme in die Studie. Das Alter der Patienten konnte bei 116 ermittelt werden und lag im Median bei 63 Jahre (30 bis 86). Die Mutationsanalysen wurden in 82% der Fälle innerhalb von 12 Monaten nach Diagnosestellung durchgeführt (Median 0,5 Monate, Spanne 0 bis 44).
Bei allen 119 Patienten wurde Exon 5 bis 9 amplifiziert, Exon 2 bis 4 bei 107, Exon 10 und 11 bei 104 Patienten, eine FISH-Analyse wurde für alle Patienten durchgeführt, bei 109 der 119 Patienten lag der V_H-Mutationsstatus. Der weitere klinische Verlauf der Erkrankung wurde dokumentiert und ausgewertet.
Bei sechs dieser Patienten wurde im Verlauf der Erkrankung zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach Therapie FISH- und Mutationsanalysen durchgeführt. Davon erhielten vier Patienten innerhalb des Beobachtungszeitraumes mehrere intensive Chemotherapien.

2.2 Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut und Knochenmark

Die Isolierung der mononukleären Zellen von den restlichen korpuskulären Anteilen des Blutes erfolgte durch Dichte-Gradienten-Zentrifugation nach der modifizierten Methode von Böyum (BÖYUM, 1976).
In einem 50 ml Falcon-Röhrchen (Fa. Becton-Dickinson, Le Pont De Claix, Frankreich) wurde Ficoll Separating Solution mit 20 ml heparinisiertem Blut im Verhältnis 1:1 überschichtet. Es wurde bei Raumtemperatur für 20 min bei 2800 U/min (ohne Bremse) zentrifugiert (Fa. Beckmann Instruments GmbH, München, Deutschland). Danach konnten

die sich in der sogenannten Interphase (=Grenzschicht zwischen Ficoll Separating Solution und darüberliegendem Plasma) befindenden mononukleären Zellen mit einer sterilen Kunststoffpipette vorsichtig abgenommen werden. Sie wurden dann in ein neues 50 ml Plastikröhrchen überführt, zweimal mit 1x PBS gewaschen und pelletiert (Zentrifugation für jeweils 10 min bei 1200 U/min). Nach dem Dekantieren wurde das Pellet (in Abhängigkeit von seiner Größe) in 1 bis 10 ml RPMI 1640 Waschmedium resuspendiert. Die Zellzahlbestimmung fand nun mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer statt. Anschließend wurden Pellets zwischen $1x10^7$ und $5x10^7$ Zellen hergestellt und bei –80°C archiviert.

2.3 DNA – Präparation

2.3.1 DNA – Isolierung aus Zellpellets

Zur DNA-Extraktion wurde das TRIZOL®-Reagenz benutzt, eine einphasige Lösung aus Phenol und Guanidinisothiocyanat, mit der gleichzeitig auch RNA aus den Pellets gewonnen werden konnte. Die Methode basiert auf einer Einschritt-Flüssigphasen-Separation.

In einem 2 ml Eppendorfgefäß wurde zunächst einem Zellpellet mit $1x10^7$ Zellen mit 1 ml TRIZOL® vollständig homogenisiert. Um die Dissoziation der Nukleotide zu gewährleisten, wurden die Proben 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden jeweils 0,2 ml Chloroform zugegeben und die Proben für 15 s auf den Vortexer (REAX 2000, Fa. Heidolph, Schwabach, Deutschland) gestellt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei Raumtemperatur folgte eine 15minütige Zentrifugation bei 13.000 U/min (Biofuge fresco, Fa. Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland), die zur Trennung der Probe in drei Phasen führte: eine untere organische Chloroform-Phenol-Phase, die Proteine und DNA beinhaltet; eine obere wässrige Phase, in der ausschließlich die RNA angereichert ist, und eine dazwischenliegende Interphase, in der sich DNA befindet.

Nach dem vollständigen Entfernen der wässrigen Phase erfolgte die Präzipitation der DNA durch Zugabe von 0,3 ml Ethanol 100% und fünfminütiger Zentrifugation bei 13.000 U/min und 4°C. Danach wird das DNA-Pellet zweimal mit jeweils 1 ml Ethanol 75% gewaschen und wieder für 5 min bei 13.000 U/min und 4°C zentrifugiert. Anschließend

ließ man den restlichen Alkohol bei einer Temperatur von 37°C abdampfen. In Abhängigkeit von der Größe wurde die DNA in 100 bis 400 ml Aqua Spüllösung gelöst und ungefähr eine Stunde bei 37°C geschüttelt (Thermomixer 5436, Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Die Endkonzentration der Stocklösung sollte zwischen 400 und 800 ng/µl betragen. Aufbewahrt wird die gelöste DNA bei –20°C.

2.3.2 DNA – Konzentrationsbestimmung

Zur genauen Bestimmung der DNA-Menge benutzen wir die photometrische Messung. Um die optische Dichte bei 260 nm, dem mittleren Absorptionsmaximum der Nukleotidbasen, genau messen zu können, wurde ein Aliquot aus der DNA-Lösung entnommen und mit Wasser verdünnt (Verdünnungsfaktor 50). Zur Extinktionsmessung diente das Photometer Ultrospec III®, Fa. Pharmacia, Freiburg, Deutschland. Die Konzentration errechnete das Gerät nach folgender Formel: [DNA (µg/ml)] = Extinktion x Verdünnungsfaktor x Faktor 50 (für dsDNA). Der Proteinanteil und damit die Reinheit der Präparation ließ sich durch den Quotienten der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm (mittleres Absorptionsspektrum der Proteine und auch des Extraktionsmittels Phenol) abschätzen.
Zusätzlich wurden 1-2 µl der DNA-Stocklösung, je nach Konzentration, auch noch auf ein Agarosegel geladen. Damit konnte die Länge und Qualität der extrahierten DNA ermittelt werden.

2.4 DNA – Amplifikation

2.4.1 Polymerase – Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine schnelle und robuste Methode zur selektiven, exponentiellen Vervielfältigung eines spezifischen DNA-Abschnittes (SAIKI et al., 1985). Das Prinzip beruht auf einem dreiteiligen Reaktionszyklus, bei dem sich im Idealfall jeweils die vorhandene Menge einer DNA-Matrize verdoppelt. Zunächst wird die DNA bei 94°C denaturiert. In einem zweiten Schritt („annealing“) hybridisieren die Oligonukleotidprimer bei niedrigerer Temperatur (ca. 50-60°C) am 5’- bzw. 3’-Ende an ihren komplementären DNA-Strang (sense und antisense) und definieren so den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt. Mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase, z.B. aus Thermus aquaticus (Taq) (SAIKI et al., 1988), werden bei 72°C und in Anwesenheit von Nukleotiden (dNTP) die beiden Einzelstränge zum jeweiligen DNA-Doppelstrang neu komplementiert.

2.4.1.1 DNA – Polymerase: Taq

Wir verwendeten die HotStarTaq DNA-Polymerase (Fa. QIAGEN, Hilden, Deutschland), eine modifizierte Form der Taq DNA-Polymerase. Sie befindet sich bei Raumtemperatur im inaktiven Zustand. Aktiviert wird die Taq-Polymerase erst durch einen 15minütigen Denaturierungsschritt bei 95°C zu Beginn der Reaktionszyklen. Dadurch wird eine höhere Spezifität der PCR erreicht und unspezifische Amplifikationsprodukte, Primerdimere und Hintergrund werden minimiert.

2.4.1.2 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Biospring (Frankfurt/Main, Deutschland) bezogen. Sowohl in lyophilisierter als auch in gelöster Form wurden sie bei -20° aufbewahrt. Nach Auflösung in Aqua dest. wurden Arbeitslösungen in einer Konzentration von 25 µM in 100 µl Aliquots hergestellt.

Zur Amplifikation von Exon 2 bis 11 des p53-Gens wurden die in Tabelle 1 aufgeführten intronspezifischen Primer eingesetzt.

Tabelle 1: Intronspezifische Primer

Exon 2:	2f (sense)	5’ GTGCTTGGGTTGTGGTGAA 3’
	2r (antisense)	5’ CGCTTCCCACAGGTCTCTGC 3’
Exon 3:	3f (sense)	5’ GCAGAGACCTGTGGGAAGCG 3’
Exon 4:	4f1 (sense)	5’ CAATGGATGATTTGATGCTGT 3’
	4r (antisense)	5’ GGAAGCCTAAGGGTGAAGAG 3’
Exon 5/6:	5f2 (sense)	5’ TGAGGTGTAGACGCCAACT 3’
	1f (sense)	5’ TCTAGCTCGCTAGTGGGTTG 3’
	6r (antisense)	5’ CACTGACAACCACCCTTA 3’
Exon 7:	7f2 (sense)	5’ TGCTTGCCACAGGTCTC 3’
	7r1 (antisense)	5’ TGTGATGAGAGGTGGATG 3’
Exon 8/9:	8f1 (sense)	5’ ACCTGATTTCCTTACTGCC 3’
	9r2 (antisense)	5’ ACGGCATTTTGAGTGTTAGA 3’
Exon 5-9:	5f2 (sense)	5’ TGAGGTGTAGACGCCAACT 3’
	3r (antisense)	5’ ATTGTCTTTGAGGCATCACTG 3’
Exon 10:	F1 (sense)	5’ TGTTGCTGCAGATCCGTGGG 3’
	F2 (antisense)	5’ GAGGTCACTCACCTGGAGTG 3’
Exon 11:	G1 (sense)	5’ TCTCCTACAGCCACCTGAAG 3’
	G2 (antisense)	5’ CTGACGCACACCTATTGCAA 3’

In der Regel wurden in der PCR Exon 2 bis 4 mit den Oligonukleotiden 2f2 und 4r, Exon 5 bis 9 mit 5f2 und 3r und Exon 10/11 mit F1 und G2 jeweils in einem Reaktionsansatz amplifiziert.

2.4.1.3 p53 – PCR

Für jede Patientenprobe wurde ein 50 µl Ansatz pro Primerpaar unter sterilen Bedingungen auf Eis in ein 0,2 ml Plastikröhrchen (8 Tubes/Strip oder 96-Well) pipettiert.

Tabelle 2: PCR-Reaktionsansatz

10x PCR Puffer [Tris-Cl, KCl, $(NH_4)_2SO_4$, 15 mM $MgCl_2$; pH 8,7 (20°C)]	5 µl
dNTP-Mix (je Nukleotid 10 mM)	0,5 µl
Primer (sense) (25 µM)	1 µl
Primer (antisense) (25 µM)	1 µl
Taq-Polymerase (5 units/µl)	0,25 µl
Aqua dest.	ad 50 µl
Template (200 ng/µl)	2 µl

Anschließend wurden die Reaktionsansätze in einem Thermocycler (GeneAmp® PCR System 2700, Fa. Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) in 37 Zyklen nach dem Protokoll in Tabelle 3 amplifiziert.

Tabelle 3: PCR-Protokoll

95°C	15 min	
94°C 56°C 72°C	45 s 40 s 1 min 30 s	37 Zyklen
72°C	10 min	
4°C	∞	

Die PCR-Produkte wurden danach bis zur Weiterbearbeitung bei 4°C gelagert.

2.4.1.4 Negativkontrollen

Zur Kontrolle akzidentieller Kontaminationen wurden bei allen PCR-Experimenten Negativkontrollen mitgeführt. Dazu wurden alle Komponenten des Ansatzes, mit Ausnahme der DNA, zusammenpipettiert und identischen Reaktionsbedingungen ausgesetzt.

2.4.2 Agarose – Gel – Elektrophorese

Mit dieser Methode können DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Da Nukleinsäuren in neutralem Milieu negative Ladungen tragen, wandern sie im elektrischen Feld vom Minus- zum Pluspol. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Fragmente ist abhängig von ihrer Größe, der angelegten Spannung und der Dichte des Mediums. Dabei verhalten sich Größe der DNA-Fragmente und Wanderungsgeschwindigkeit umgekehrt proportional. Sichtbar gemacht werden die Nukleinsäuren durch den intercalierenden Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid. Die DNA-Ethidiumbromid-Komplexe fluoreszieren im UV-Licht.

Zur Herstellung eines 1,5%-igen Agarosegels wurden 1,5 g Agarose in 100 ml 1xTAE aufgekocht. Nach Abkühlen auf ca. 60°C wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zugesetzt. Das Gel wurde in einen dafür vorgesehenen Gelträger überführt. Zur Aussparung der Ladetaschen wurden spezielle Kämme eingesetzt. Nach der vollständigen Polymerisation wurden die Gelkämme wieder entfernt und der Gelträger in eine Gelkammer (Fa. LMS Labortechnik, Rosenheim, Deutschland) gestellt. In die Ladetaschen wurden 10 µl PCR-Produkt und 2 µl Blue Juice™ Loading Buffer gefüllt. Mit Hilfe eines Längenmarkers, der parallel zu den PCR-Produkten aufgetragen wurde, erfolgte die Größenzuordnung und Konzentrationsabschätzung der DNA-Banden. Für die Elektrophorese wurde eine Spannung von 140 V angelegt. Sie lief über 30 min. Die Gelkammer war mit 1xTAE gefüllt. Abschließend wurde das Gel mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm angeregt (Transilluminator 8000, Fa. Stratagene, Amsterdam, Niederlande) und mit einer Polaroidkamera photographiert (MP-4 Land Camera, Fa. Polaroid, Offenbach, Deutschland).

2.4.3 Reinigung der PCR – Produkte

Wenn im Agarosegel DNA-Banden sichtbar waren, wurde die DNA zunächst aufgereinigt. Hierfür wurde das QIAquick™ Multiwell PCR Purificaton Kit 8 bzw. 96 (Fa. QIAGEN, Hilden, Deutschland) verwendet. Mit Hilfe einer Silikagel-Membran können doppelsträngige DNA-Fragmente zwischen 100 bp und 10 kb von den übrigen Komponenten der PCR mittels Vakuumpumpe (LABOPORT® Vacuum Pump, Fa. KNF Neuberger GmbH, Freiburg, Deutschland; QIAvac 6S Vakuumkammern, Fa. QIAGEN, Hilden, Deutschland) getrennt werden.
In einem ersten DNA-Absorptions-Schritt werden Primer, nichteingebaute Nukleotide, Enzyme, Puffer und sonstige Verunreinigungen ausgewaschen, während die DNA an der Membran bindet. Die dafür benötigten Salze werden in einem zweiten Schritt mit einem ethanolhaltigen Puffer ausgewaschen. Nachdem sich der gesamte Alkohol durch Anlegen eines Vakuums verflüchtigt hat, wird die DNA je nach Stärke der Bande im Agarosegel mit 50 bis 80 ml Elution Buffer in 8er Strips bzw. 96-Well-Platten eluiert und kann direkt weiterbearbeitet werden.

2.5 DNA – Sequenzierung

Die Nukleotidabfolge von DNA-Fragmenten wird mit der Kettenabbruchmethode (SANGER et al., 1977) analysiert. Dazu lässt man eine DNA-Polymerase einen komplementären Strang zu einem einzelsträngigen Template mit einem Nukleotidgemisch synthetisieren, welches neben den vier Desoxynukleotiden 2',3'-Didesoxynucleotide (ddNTP) enthält. Wird bei der Synthese ein ddNTP eingebaut, kommt es zum Kettenabbruch, weil an der 3'-Hydroxylgruppe keine Phosphodiesterbrücke mehr gebildet werden kann. Werden die Konzentrationen der einzelnen Komponenten so gewählt, dass es pro Reaktion an jeder dNTP-Position durch zufälligen Einbau eines ddNTP zu einem Abbruch kommt, wird folglich am Ende des Vorganges jede dNTP-Position durch eine bestimmte Fragmentlänge repräsentiert. Durch elektrophoretische Auftrennung der Fragmente im denaturierenden Polyacrylamidgel kann die Nukleotidsequenz ausgewertet werden.

2.5.1 Cycle Sequencing

Auf dem Prinzip einer linearen PCR wird die Synthese der komplementären DNA-Stränge erreicht. Hierzu wurde das DNA Sequencing Kit BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Fa. Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) benutzt. Bereits im Kit enthalten waren die mit vier verschiedenen Farbstoffen markierten ddNTPs, dNTPs, eine spezielle Taq-Polymerase, $MgCl_2$ und Puffer. Diese Komponenten, besonders dNTPs und ddNTPs sind in optimalen Konzentrationen und Verhältnissen zugegeben, so dass ideale Bedingungen für den Einbau der Stopnukleotide vorherrschen. Wenn möglich wurden interne Primer, ansonsten diejenigen der vorausgegangenen PCR in einer Konzentration von 1µM verwendet. Bei PCR-Produkten mit einer Länge von mehr als 600 bp wurden Oligonukleotide eingesetzt, die einen kleineren DNA-Abschnitt überspannen. Pro Patient und Primer wurde ein Ansatz nach dem in Tabelle 4 dargestellten Protokoll pipettiert und nach dem Protokoll in Tabelle 5 sequenziert.

Tabelle 4: PCR-Reaktionsansatz für das Cycle Sequencing

BigDye™ Ready Reaction Mix	3 µl
Primer (sense oder antisense)	2 µl
Aqua dest.	2 µl
Template (gereinigtes PCR-Produkt)	4 µl
	12 µl

Tabelle 5: PCR-Protokoll für die lineare PCR im Thermocycler

96°C	45 s	
96°C 52°C 60°C	15 s 10 s 4 min	25 Zyklen
4°C	∞	

2.5.2 Reinigung der Sequenzreaktion

Zur Entfernung der in der PCR nicht eingebauten ddNTPs wurde das DyeEx™ 96 Kit (Fa. QIAGEN, Hilden, Deutschland) benutzt. Auf dem Prinzip der Gelfiltationschromatographie werden Moleküle nach ihrem molekularen Gewicht getrennt. Die Sequenzreaktion wurde mit Aqua dest. auf 20µl aufgefüllt, auf die vorbereiteten DyeEx™-Säulen gegeben und anschließend bei 2.350 U/min für 3 min zentrifugiert (SEPATECH Minifuge T, Fa. Heraeus, Hanau, Deutschland). Dabei diffundierten die farbstoffmarkierten Stopnukleotide in die Poren der Säule und wurden darin festgehalten. Die DNA-Fragmente hingegen wurden in einem Auffanggefäß gesammelt (Thermowell 96well PCR Plate 200µl, Fa. Corning/Costar, Wiesbaden, Deutschland). Im Anschluss wurden die Proben ca. 30 bis 40 min bei 70°C in einem Thermocycler getrocknet und in 3µl Blue Dextran-Puffer, der im Verhältnis 1:4 mit deionisiertem Formamid gemischt wurde, aufgenommen. Um die DNA darin zu lösen, wurde die 96well-Platte noch 20 min bei 37°C geschüttelt.

2.5.3 Analyse der Sequenzreaktion

Die Elektrophorese im denaturierenden Polyacrylamid-Gel ist eine Methode, die für Sequenzanalysen besonders gut geeignet ist, da Größenunterschiede bis zu einem Basenpaar aufgetrennt werden können. Analysiert wurde auf dem DNA Sequencer ABI PRISM 377 (Fa. PE Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland). Ein Argon-Laser im unteren Abschnitt des Gels regt die vier Farbstoffe schon während der Elektrophorese an. Jeder Farbstoff emittiert Licht einer bestimmten Wellenlänge, das von einer CCD (Charge Coupled Device) Kamera detektiert und auf einem Macintosh Computer (Fa. Apple-Macintosh GmbH, Ismaning, Deutschland) gespeichert wird. So können alle vier Farbstoffe und die mit ihnen gekoppelten vier Basen unterschieden und mit geeigneten Software-Programmen ausgewertet werden.

Zunächst wurde das Glasplattenpaar der Länge 36 cm mit einer fluoreszenzfreien Seife (Alconox®, Fa. Alconox, New York, USA) und Aqua dest. gereinigt. Danach musste es

mindestens eine Stunde trocknen. Nun wurden die Glasplatten, zwischen die ein 0,2 mm dicker Abstandshalter positioniert wurde, in den Gelrahmen eingespannt und nach unten abgedichtet. Anschließend wurden 35 µl der steril filtrierten, 4,5%igen Polyacrylamidstocklösung mit 25 µl TEMED und 350 µl APS 10% versetzt. Mit Hilfe einer Vorrichtung wurde diese Gelflüssigkeit zwischen die Platten gegossen. Zur Herstellung der Ladetaschen wurde nach dem Gießen ein 0,2 mm dicker Kamm mit der glatten Seite nach unten in den Oberrand eingesetzt und fixiert. Nach 2 bis 4 Sunden Polymerisationszeit wurden der Kamm und die Dichtungsvorrichtung entfernt. Der Gelrahmen wurde nun in den DNA-Sequencer eingespannt. Um störende Fluoreszenzen und eventuelle Verunreinigungen schon am Anfang festzustellen, wurde ein Plate Check (Modul: PlateCheck E) durchgeführt. Nachdem dann die Pufferkammern mit Laufpuffer (1 x TBE) angefüllt und die Kammaussparung freigespült waren, folgte der Pre-Run (Modul: PR36E-1200) zur Erwärmung des Gels auf die optimale Temperatur. Danach wurde die Kammaussparung erneut von Harnstoff, der sich aus dem Gel gelöst hatte, freigespült und der Kamm mit 64 Slots mit den Spitzen nach unten eingesetzt. Die in Blue Dextran-Puffer aufgenommenen Proben wurden 3 min bei 95°C denaturiert und jeweils 1 µl mit einer 8-Kanal-Pipette (Fa. Kloehn, Las Vegas, USA) aufgetragen. Im Anschluss wurden am Gerät alle Einstellungen auf Gelzusammensetzung, verwendete Farbstoffe, etc. abgestimmt und der Run mit dem Run-Modul SeqRun36E-1200(29/1) gestartet. Nach Beendigung des Runs wurden die Glasplatten und das Zubehör mit fluoreszenzfreier Seife gereinigt.

Die Rohdaten, die während des Runs gespeichert wurden, wurden durch das Software-Programm Sequencing Analysis, Version 3.4 (Fa. PE Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) analysiert. Schließlich werden die Elektropherogramme mit der genauen Basenabfolge ausgedruckt (hp color inkjet printer cp 1700, Fa. Hewlett-Packard, Deutschland). Mit Hilfe des Software-Programms Align (Fa. Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) wurde zunächst die Basenabfolge der Sequenzen mit einer Wildtyp-Sequenz verglichen. Mutationen mit einem Restsignal unter 50% konnten bereits so detektiert werden. Im Anschluß wurde das Elektropherogramm noch mit einer p53-Wildtyp-Sequenz verglichen. Hierbei sollte nochmals die genaue Basenabfolge überprüft werden. Um Punktmutationen zu erkennen, musste besonders auf Signalverluste der Peaks und Ersatz des Verlustes durch ein zweites, darüberliegendes Signal einer anderen Base geachtet werden.

2.6 Auswertung der Daten und statistische Analysen

Der primäre Endpunkt war das Überleben ab dem Zeitpunkt der Diagnosestellung bzw. in Abbildung 9 und 13 das Überleben ab dem Zeitpunkt des Aberrationsnachweises. Überlebenskurven wurden nach der Methode nach Kaplan-Meier berechnet, das mediane Überleben mit Log-rank-Test. Die mediane Follow-up-Zeit wurde nach der Methode von Korn (KORN, 1986) kalkuliert. Das proprotional hazard regression Modell nach Cox wurde angewandt, um die Überlebenszeiten bei verschiedenen prognostischen Faktoren zu identifizieren. Kategorische Werte (Vier-Felder-Tafel) wurden mittels Fischer Exact Test untersucht. Alle Tests wurden zweiseitig durchgeführt. P-Werte $\leq$ 0,05 wurden als signifikant gewertet. Die statistischen Analysen wurden mit GraphPad Prism Version 3.00 (GraphPad Software, San Diego, CA) durchgeführt.

2.7 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

APS 10 %:	1,5 g	Ammoniumpersulfat
	ad 15 ml	HPLC-Wasser
PAGE 4,5 %, 6 M Urea:	144 g	Harnstoff
	45 ml	40 % Acrylamide/Bis Solution 29:1
	40 ml	10 x TBE
	ad 400ml	HPLC-Wasser
TAE 50x Stammlösung:	242 g	Trisbase
	57 ml	Essigsäure
	100 ml	EDTA 0,5 M, pH 8,0
	ad 1000 ml	H_2Od

2.8 Reagenzien, Chemikalien und sonstige Materialien

Die in dieser Arbeit verwendeten und hier aufgeführten Reagenzien und Chemikalien wurden über folgende Firmen bezogen:

40% Acrylamide/Bis Solution 29:1	Fa. Biorad, München, Deutschland
Agarose	Fa. Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Dtl.
Ammoniumpersulfat (APS)	Fa. Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Dtl.
Aqua Spüllösung	Fa. Boehringer, Mannheim, Deutschland
Blue Dextran/EDTA	Fa. PE Applied Biosystems, Weiterstadt, Dtl.
Blue Juice™ Loading Buffer, 10x	Fa. Invitrogen™, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Deoxynucleoside Triphosphate Set	Fa. Roche, Mannheim, Deutschland
DEPC-Wasser	Fa. Gibco-BRL, New York, USA
DNA-Ladder, 1 kb, (0,1µg/µl)	Fa. Invitrogen™, Karlsruhe, Deutschland
EDTA	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol absolut für Analyse	Fa. Riedel-de Haën®, Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Ethidiumbromid	Fa. Eurobio, Les Ulis, Frankreich
Ficoll Separating Solution	Fa. Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Formamid, deionisiert	Fa. Amresco, Solon, USA
Harnstoff	Fa. Biorad, München, Deutschland
HPLC-Wasser	Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol für Analyse	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
MicroAmp® Reaction Tubes (8er Strip)	Fa. Applied Biosystems, Weiterstadt, Dtl.
MicroAmp® Caps (8er Strip)	Fa. Applied Biosystems, Weiterstadt, Dtl.
MicroAmp® 96-Well Reaction Plate, 0,2 ml	Fa. Applied Biosystems, Weiterstadt, Dtl.
PBS (10x)	Fa. Gibco-BRL, New York, USA
Polaroidfilm, Type 804	Fa. Polaroid, Offenbach, Deutschland
RPMI 1640 Waschmedium	Fa. Biochrom KG, Berlin, Deutschland
10x TBE Extended Range Buffer	Fa. Biorad, München, Deutschland

TEMED (N,N,N,N'-Tetramethylethylendiamin)	Fa. Biorad, München, Deutschland
Trisbase	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
TRIZOL® Reagent	Fa. Invitrogen™, Karlsruhe, Deutschland

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung der p53 PCR

3.1.1 Konstruktion der Oligonukleotid-Primer

Zur Amplifikation des p53-Gens mittels PCR wurden neue Primerpaare entwickelt, die im Gegensatz zu bereits veröffentlichten Oligonukleotiden (GAIDANO et al., 1991; FENAUX et al., 1992; FRANKEL et al., 1992; LEPELLEY et al., 1994) in ihrer gesamten Länge im Intron liegen. So können auch die Grenzen zwischen Intron und Exon beurteilt und in der CLL seltene Mutationen im Intron, die die „splice-sites“ betreffen, detektiert werden (BROMIDGE et al., 2000). Die codierenden Exons wurden in drei PCR-Fragmenten amplifiziert. Eine Ausnahme hinsichtlich der Lage stellt 11r dar. Der Primer liegt in Exon 11, jedoch in einem Bereich, der für die Proteinbildung nicht mehr relevant ist, da er einem Stopcodon in Richtung 3’-Ende folgt.
Für die Sequenzreaktion wurden noch weitere intronspezifische Primer entwickelt, da beim Cycle Sequencing nur Abschnitte bis zu einer Länge von 500 bis 600 Basen gut zu lesen und sicher auszuwerten sind.
In der Länge sollten die Oligonukleotide zwischen 17 und 25 bp variieren und über eine möglichst gleichmäßige Verteilung der verschiedenen Nukleotide verfügen. Die Ausbildung von Dimeren innerhalb eines Oligonukleotids bzw. die Hybridisierung zwischen sense- und antisense-Primer sollte gering gehalten werden. Außerdem sollte darauf geachtet werden, dass sense- und antisense-Primer eines Paares etwa dieselbe Schmelztemperatur T_m haben. Um die Schmelztemperatur T_m eines Primers abschätzen zu können, wurde folgende Formel angewendet:

$$T_m = 2°C \times (A+T) + 4°C \times (G+C)$$

Die optimale „annealing“-Temperatur in der PCR sollte dann ungefähr dem T_m-Wert entsprechen.
Zur Etablierung der Oligonukleotide wurde bei drei Patienten, die keine mittels FISH detektierbare 17p-Aberration hatten, genomische DNA isoliert. Für jedes Primerpaar

wurden mehrere PCR-Ansätze pipettiert, die dann verschiedenen „annealing“-Temperaturen ausgesetzt wurden.

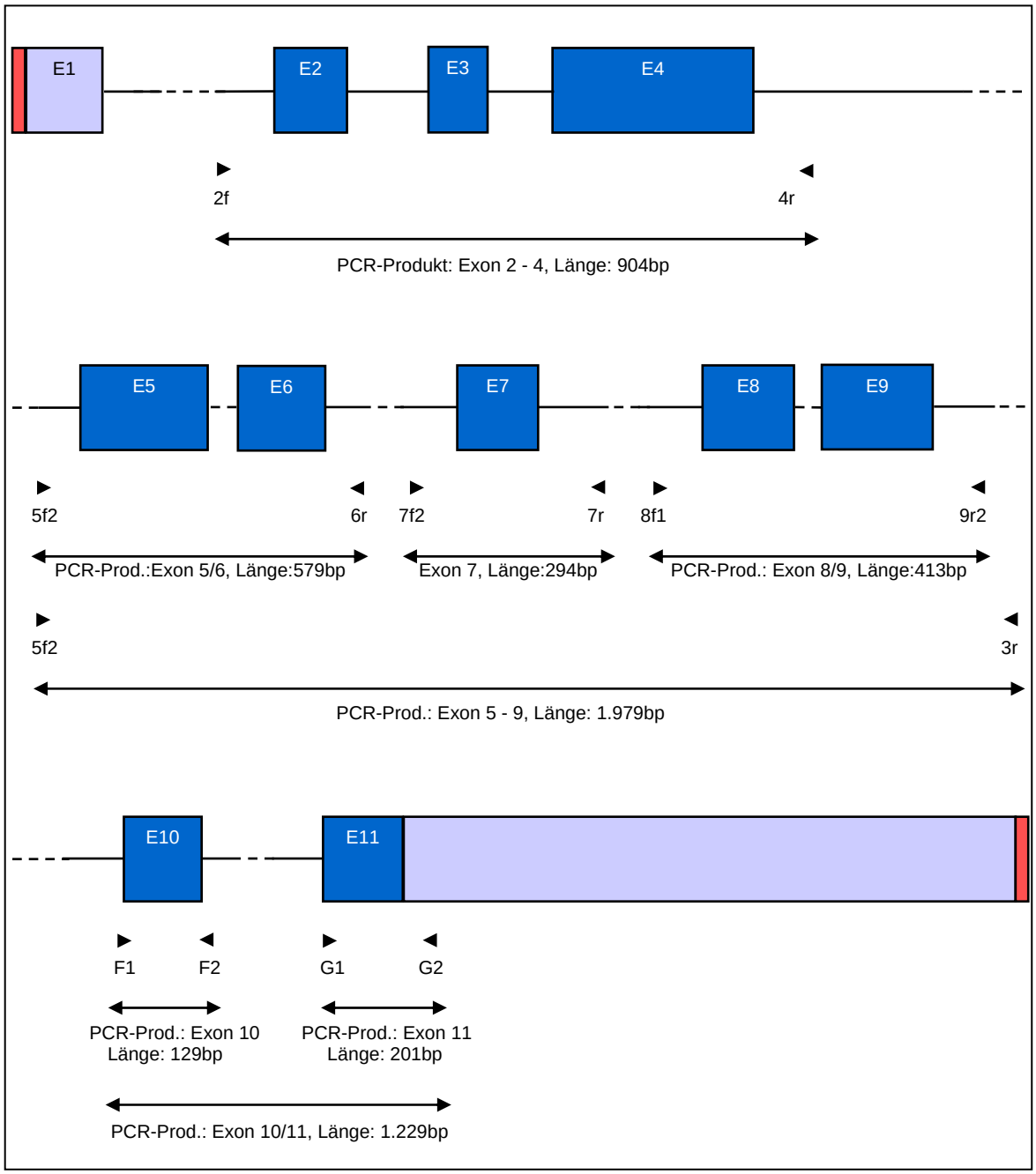

Abbildung 2: Schematische Darstellung der Lage der intronspezifischen Primer im p53-Gen mit Angabe der Produktlängen. Die nicht codierenden Anteile der Exons sind in hellblauer Farbe dargestellt, die codierenden Exons sind dunkelblau hervorgehoben, die Introns als schwarze, durchgezogene Linie markiert. PCR=Polymerasekettenreaktion, bp=Basenpaar.

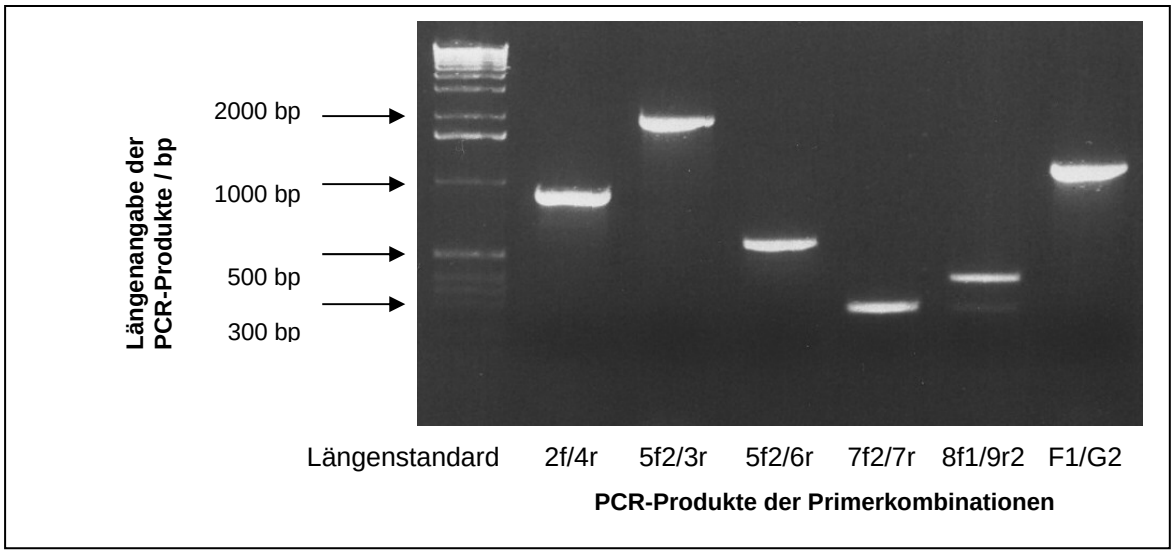

Abbildung 3: **Darstellung der PCR-Produkte mit den verschiedenen Primer-Kombinationen auf einem Agarosegel (1,5%).** Mit Hilfe des seitlich aufgetragenen Längenstandards kann die Produktlänge abgelesen werden. bp=Basenpaar.

3.1.2 Etablierung des Cycle – Sequencing

Mit den gereinigten PCR-Produkten und den neu konstruierten Primern wurden Testversuche durchgeführt, in denen das Programm für die lineare PCR, die eingesetzte DNA-Menge und das Verhältnis der verschiedenen Komponenten optimiert wurde (siehe 2.5.1).

3.2 Ergebnisse der Sequenzanalysen des p53 – Gens

3.2.1 Ergebnisse der Mutationsanalysen

Die p53 Mutationsanalysen wurden in 82% der Fälle innerhalb von 12 Monaten nach Diagnosestellung durchgeführt (Median 0,5 Monate, Spanne 0 bis 44 Monate). Exon 5 bis 9 wurde bei allen 119 Patienten analysiert, Exon 2 bis 4 bei 107, Exon 10 und 11 bei 104 Patienten, jedoch in allen Fällen mit nachgewiesener p53 Aberration. Das mediane Alter des Patientenkollektivs betrug 63 Jahre.

Aberrationen im p53-Gen wurden bei 14 der 119 (12%) untersuchten Patienten mit B-CLL gefunden. Zehn Patienten wiesen eine sequenzierbare Mutation auf, davon 8 mit gleichzeitiger Deletion in der FISH-Analyse. In 4 Fällen konnte eine Deletion in der FISH-Analyse ohne Mutation nachgewiesen werden. Bei den Fällen mit sequenzierbarer Mutation wurde diese durch eine zweite unabhängige PCR-Reaktion und Sequenzierung verifiziert.

Bei sechs Patienten des Gesamtkollektivs wurden im Verlauf der Erkrankung zu verschiedenen Zeitpunkten FISH- und Mutationsanalysen durchgeführt. Hier konnten im Verlauf vier weitere Fälle mit p53 Aberration detektiert werden. Ein Patient hatte zwei Mutationen in Exon 5. Allerdings wurden diese Aberrationen erst später als 48 Monate nach Diagnosestellung nachgewiesen.

Unter den insgesamt 15 detektierten p53-Mutationen zeigten sich 11 „missense“-Mutationen, bei denen der Austausch einer einzigen Base zum AS-Austausch führte.

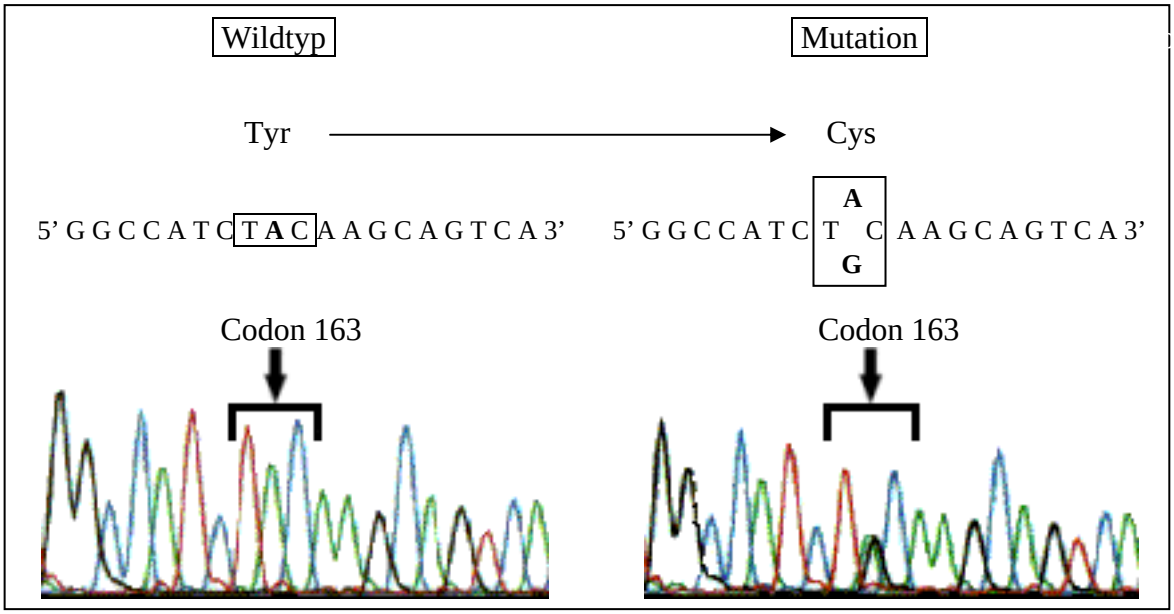

Abbildung 4: Vergleich: Wildtyp-Sequenz - heterozygote „missense"-Mutation des p53-Gens ohne monoallelische Deletion in der FISH-Analyse. Das mutierte Signal ersetzt ungefähr 50% des Wildtyp-Signals. Tyr= Tyrosin, Cys=Cystein.

Bei zwei Patienten war eine „nonsense"-Mutation zu erkennen, die einen mutmaßlichen Kettenabbruch zur Folge hatte. In den anderen beiden Fällen waren Deletionen von zwei bzw. vier Basen mit Verschiebung des Leserasters nachweisbar.

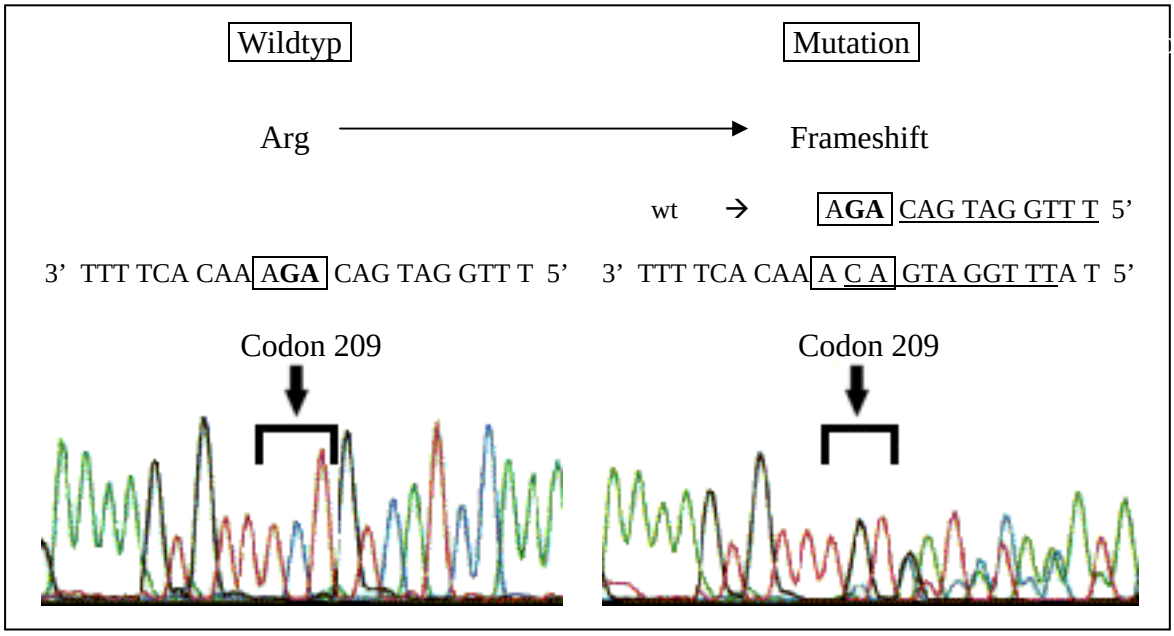

Abbildung 5: Vergleich: Wildtyp-Sequenz – Deletion von 2 Basenpaaren des p53-Gens bei zusätzlicher monoallelischer p53 Deletion in der FISH-Analyse. Eine Deletion von 2 Basenpaaren in Codon 209 und eine zusätzliche monoallelische p53 Deletion in der FISH-Analyse (87% der Zellen) führt zu einer Verschiebung des Leserasters. Das verbliebene Wildtyp-Signal entspricht der Population von Zellen ohne Deletion. wt=Wildtyp, Arg=Arginin

Weiterhin konnte bei drei der mutierten Fälle im Elektropherogramm der Sequenzanalyse kein Restsignal des Wildtyps erkannt werden. Zwei davon hatten in der FISH-Analyse eine 17p-Deletion mit einem Verlust von jeweils 87 und 97 % der Zellen.

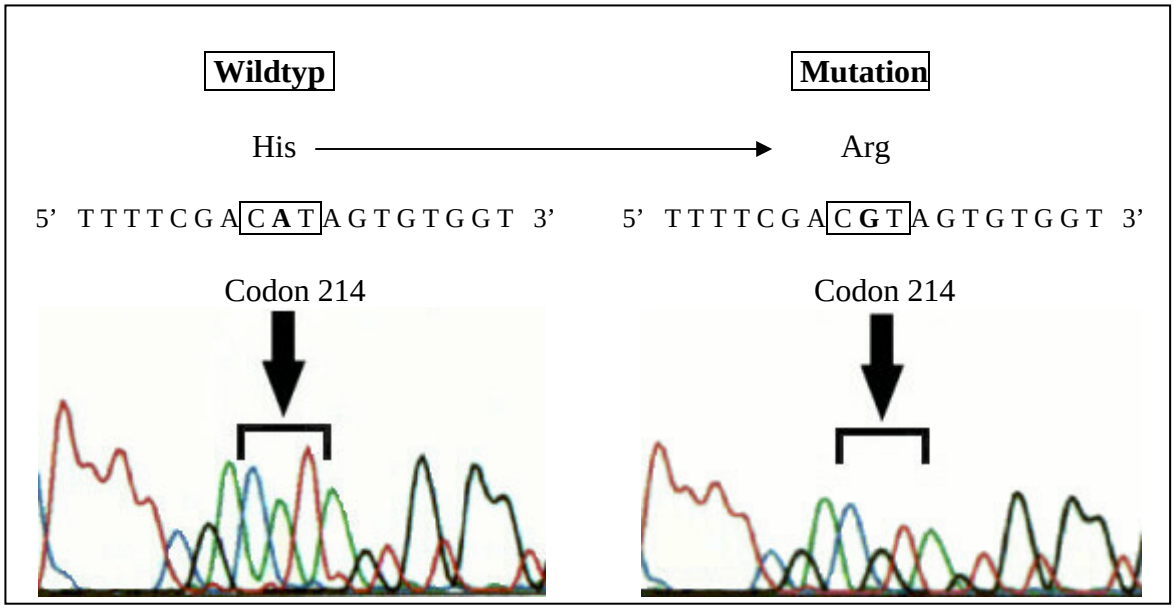

Abbildung 6: Homozygote „missense“-Mutation des p53-Gens ohne monoallelische Deletion in der FISH-Analyse. Ein Signal des Wildtyps kann nicht mehr detektiert werden. His=Histidin, Arg=Arginin.

Elf der 13 Fälle mit einer Punktmutation hatten eine Transition. Dabei war fünfmal A gegen G, viermal C gegen T und zweimal G gegen A ausgetauscht. Bei den beiden Transversionen war jeweils einmal A und G durch T ersetzt. Nur eine Mutation davon betraf ein CpG-Dinukleotid. Diese wies eine Transversion am Codon 273 auf.

Zusammenfassend sind die Ergebnisse der Mutationsanalysen in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Daten der Sequenzanalyse der insgesamt 14 p53-mutierten Fälle

Code	17p-[%]	rWT	MT	Exon	Codon	Basen-austausch	AS-Austausch	Ts-Tv	US
9	97	nein	PM	5	167	**c**ag -**t**ag	Stopcodon	Ts	P
17	79	ja	PM	8	273	c**g**t - c**a**t	Arg - His	Ts	P
31	89	ja	PM	5	179	c**a**t - c**g**t	His - Arg	Ts	P
36	55	ja	PM	5	179	**c**at - **t**at	His - Tyr	Ts	P
61	87	ja	DEL	6	209	**ag**a - ******a	Frameshift	-	P
62	75	ja	PM	5	179	**c**at - **t**at	His - Tyr	Ts	P
116	80	ja	PM	5	141	t**g**c - t**a**c	Cys - Tyr	Ts	P
12	87	nein	DEL	4	98	cc**ttcc** - cc********	Frameshift	-	P
22	-	nein	PM	6	214	c**a**t - c**g**t	His - Arg	Ts	P
54	-	ja	PM	5	163	t**a**c - t**g**c	Tyr - Cys	Ts	P
122	65	ja	PM	7	246	**a**tg - **g**tg	Met -Val	Ts	F
156	37	ja	PM	6	193	c**a**t - c**g**t	His - Arg	Ts	F
150	94	ja	PM	9	317	**c**ag - **t**ag	Stopcodon	Ts	F
149	-	ja	PM	5	139	aa**g** - aa**t**	Lys - Asp	Tv	F
	-	ja	PM	5	176	t**g**c - t**t**c	Cys - Phe	Tv	F

Zusätzlich ist in der Spalte 17p-[%] der prozentuale Anteil der Zellen angegeben, die in der FISH (=Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung) – Analyse eine monoallelische 17p-Deletion tragen. rWT: Restsignal des Wildtyps; MT: Mutationstyp; PM: Punktmutation; DEL: Deletion; AS: Aminosäure; Arg: Arginin; His: Histidin; Tyr: Tyrosin; Cys: Cystein; Met: Methionin; Val: Valin; Lys: Lysin; Asp: Asparaginsäure; Phe: Phenylalanin; Ts-Tv: Transition - Transversion. In einer weiteren Spalte ist der Untersuchungszeitpunkt (US) angegeben. P: Primäruntersuchung max. 48 Monate nach Diagnosestellung; F: Follow-up-Untersuchung.

3.2.2 Verteilung der p53 – Mutationen

Bei Betrachtung der Mutationsverteilung innerhalb des p53 Gens fiel auf, dass in Exon 2,3, 10 und 11 keine Mutationen gefunden wurden. Exon 5 war mit acht Fällen am häufigsten betroffen. Hierbei fiel auf, dass Codon 179 dreimal mutiert war. Drei Mutationen lagen in Exon 6. Je eine Mutation lag in Exon 4, 7, 8 und 9. Somit befinden sich 13 der 15 Mutationen im Bereich von Exon 5 bis 8.
Die „Frameshift"-Mutationen fanden sich in Exon 4 und Codon 209 im Exon 6.
Mit Ausnahme der beiden Mutationen in Exon 4 und 9 waren alle Mutationen innerhalb der DNA-bindenden Domäne (AS 102 – 292) zu finden. Acht der Mutationen lagen innerhalb der hochkonservierten Regionen des p53-Gens (HOLLSTEIN et al., 1991): Codon 139 und 141 in Region II (Codon 130-142), Codon 179, das bei 3 Patienten mutiert war, und Codon 176 in Region III (Codon 171-181), Codon 246 in Region IV (Codon 234-258) und Codon 273 in Region V (Codon 270-286). In den weiteren Regionen, in denen häufig p53-Mutationen vorkommen (GREENBLATT et al., 1994), liegen auch drei der Mutationen: Codon 163 (151-164), Codon 193 (193-200) und Codon 214 (213-223). Codon 209 wird als „hot-spot" für p53-Mutationen bei B-CLL vorbeschrieben (NEWCOMB et al., 1995).

Graphisch stellt sich die Verteilung folgendermaßen dar:

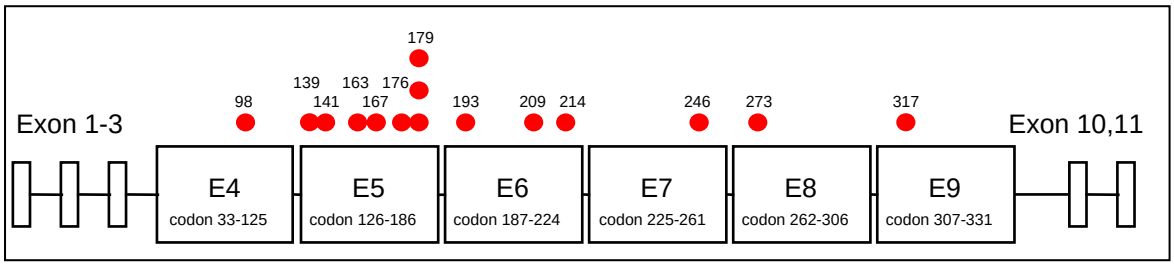

Abbildung 7: Graphische Darstellung der Verteilung der Mutationen auf dem p53 Gen. Hier fällt auf, dass die Mutationen auf die Exone 4 bis 9 verteilt sind, wobei Codon 179 in Exon 5 dreimal betroffen ist. Außerdem sind in Exon 5 acht Mutationen detektiert worden, während in Exon 6 drei, in Exon 4, 7, 8 und 9 jeweils eine Mutationen gefunden wurden.

3.3 Vergleich der Ergebnisse der FISH- und Sequenzanalysen

Neben den Sequenzanalysen wurde auch bei allen 119 untersuchten Patienten der 17p13 Deletionsstatus durch FISH-Analysen erhoben. Hier wiesen 12 der 119 Fälle eine Deletion auf. Davon zeigten acht zusätzlich in der Sequenzanalyse eine Mutation auf dem anderen Allel. Bei den anderen vier deletierten Fällen war auf dem verbliebenen Allel kein Defekt detektierbar. Eine Mutation in der Sequenzanalyse ohne 17p-Verlust in der FISH konnte in zwei Fällen nachgewiesen werden.

Werden beide erwähnten Patientenkollektive zusammengefasst, das aus den Follow-up-Analysen und das, das durch ein kurzes Intervall zwischen Diagnose- und Analysezeitpunkt gekennzeichnet ist, so können bei insgesamt 18 Patienten (15%) Aberrationen auf 17p nachgewiesen werden. 15 Fälle hatten eine 17p-Deletion in der FISH-Analyse, wovon bei 11 gleichzeitig eine p53-Mutation in der Sequenzanalyse nachweisbar war.
Zusammenfassend sind die Zahlen des Gesamtkollektivs in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Übersicht über die Inzidenz von p53-Mutationen bei der B-CLL mit und ohne monoallelische Deletion in der FISH-Analyse.

	17p-Deletion	keine 17p-Deletion	Gesamtanzahl
Anzahl der Fälle	15	104	119
Anzahl der Mutationen	11	3	14
	73 %	3 %	12 %

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Sequenz- und FISH-Analysen konnten bezogen auf das Ausgangspatientenkollektiv mit Analysezeitpunkt innerhalb von 48 Monaten nach Diagnosestellung bei 14 der 119 untersuchten Patienten (12%) Aberrationen des p53-Gens bzw. des kurzen Arms von Chromosom 17 gefunden werden. Außerdem ging aus dem Vergleich dieser beiden Verfahren hervor, dass 6 der 14 Patienten, also 5% des Gesamtkollektivs, eine monoallelische Aberration trugen, also ein defektes Allel hatten mit 17p-Deletion oder p53-Mutation und eine zweites Allel ohne detektierbare Veränderungen.

In 2 Fällen wurde der Defekt in der Sequenzanalyse und in den anderen 4 Fällen in der FISH-Analyse aufgedeckt. Biallelische Aberrationen mit genetischen Veränderungen (Deletion oder p53-Mutation) auf beiden Allelen des kurzen Arms von Chromosom 17 hatten 8 der 14 Patienten (7% des Gesamtkollektivs).

Tabelle 8: Übersicht über die Inzidenz von mono- und biallelischen Aberrationen bei der B-CLL (n=119)

	Monoallelische Aberration	Biallelische Aberration	Gesamt-anzahl
Anzahl der Fälle	6	8	14
Prozent des Gesamtkollektivs	5 %	7 %	12 %

3.4 Korrelation der Ergebnisse mit dem Überleben

3.4.1 Vergleich 17p– Aberration versus keine 17p– Aberration

Bei 118 der 119 Patienten konnte bei Studieneinschluss das klinische Stadium nach Binet festgestellt werden. In einem Fall mit 17p-Deletion in der FISH-Analyse ist das klinische Stadium nicht bekannt. Es fiel auf, dass Patienten mit p53-Aberrationen vermehrt ein klinisch fortgeschritteneres Krankheitsbild zeigten. In Tabelle 9 sind die Zahlen dargestellt.

Tabelle 9: Klinisches Stadium nach Binet bei Studieneinschluss

			Binet-Stadium		
	n		A	B	C
Gesamtkollektiv	118	%	50,00%	30,51%	19,49%
p53 Aberration	13		23,08%	46,15%	30,77%
Keine p53 Aberration	105		53,33%	26,67%	20,00%

Die mediane Überlebenszeit und das mediane Alter wurde von allen 119 Patienten, 14 mit und 105 Patienten ohne p53-Aberration, verglichen.

Hinsichtlich des Alters fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen. Allerdings war die mediane Überlebenszeit nach Diagnosestellung der CLL bei Vorliegen einer 17p-Deletion oder einer p53-Mutation signifikant kürzer ($p< 0,001$). In Tabelle 10 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

Tabelle 10: Vergleich von medianem Alter und medianer Überlebenszeit von 119 B-CLL Patienten mit und ohne p53-Aberrationen.

	Aberration	keine Aberration	p-Wert
Medianes Alter (Jahre)	64	63	
Mediane Überlebenszeit (Monate)	29	67	< 0,001

Patienten mit p53-Aberrationen lebten ab dem Zeitpunkt der Diagnosestellung im Median nur 29 Monate, während Patienten mit unauffälligem p53-Befund 67 Monate überlebten.

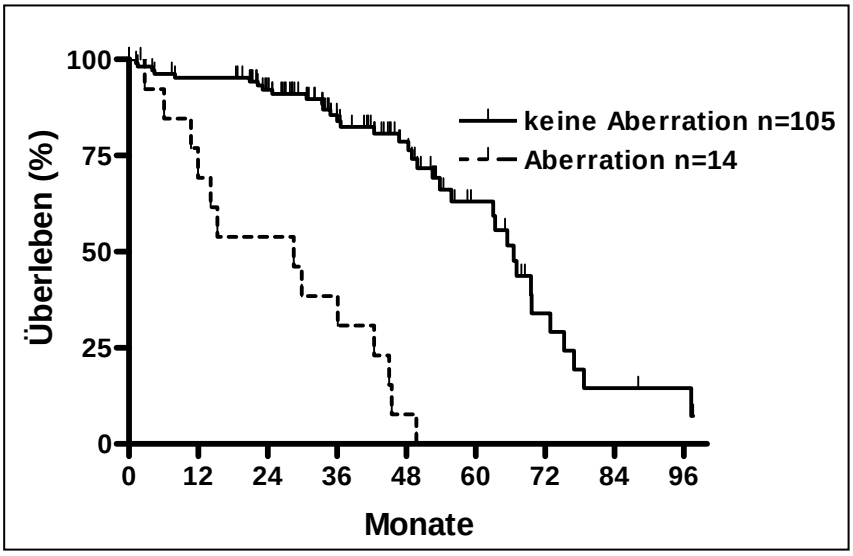

Abbildung 8: Kurve des Gesamtüberlebens nach Diagnosestellung: Vergleich – p53-Aberration versus keine p53-Aberration. p<0,001.

Ab dem Zeitpunkt der Detektion der 17p-Aberration war das Gesamtüberleben der betroffenen Patienten (medianes Überleben 6 Monate) gegenüber Patienten ohne Defekt auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 (medianes Überleben 67 Monate) noch kürzer. Hier gingen auch die Patienten aus den Verlaufsanalysen mit in die Berechnungen ein.

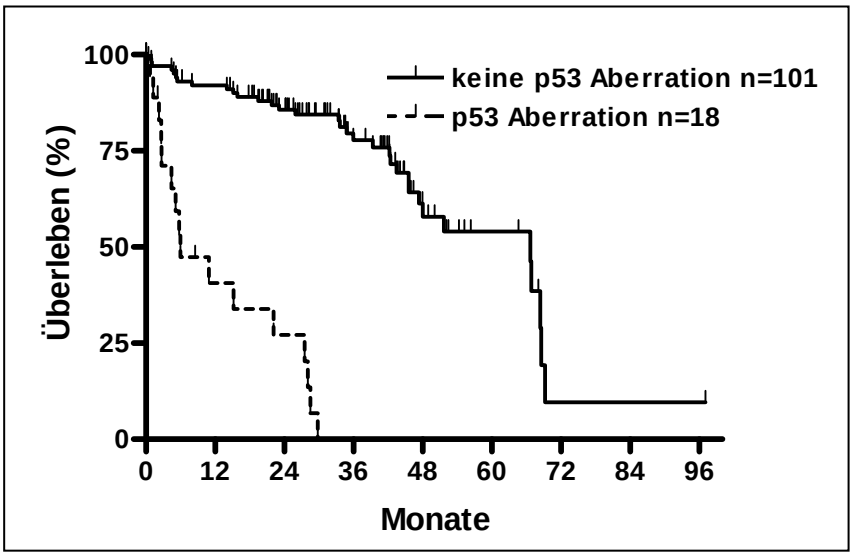

Abbildung 9: Kurve des Gesamtüberlebens nach Detektion der p53-Aberration: Vergleich – p53-Aberration versus keine p53-Aberration. p<0,001.

3.4.2 Vergleich 17p – Aberrationen und V_H – Mutationsstatus

Der V_H-Mutationsstatus wurde bei 109 der 119 Patienten bestimmt. In einem Fall mit 17p-Deletion lag der V_H-Mutationsstatus nicht vor. Das mediane Überleben wurde in der V_H-mutierten (67 Monate) und in der V_H-unmutierten Gruppe (63 Monate) sowie bei den Patienten mit p53-Aberration (29 Monate) bestimmt. Hier zeigten sich deutlich kürzere Gesamtüberlebenszeiten unabhängig vom V_H-Mutationsstatus.

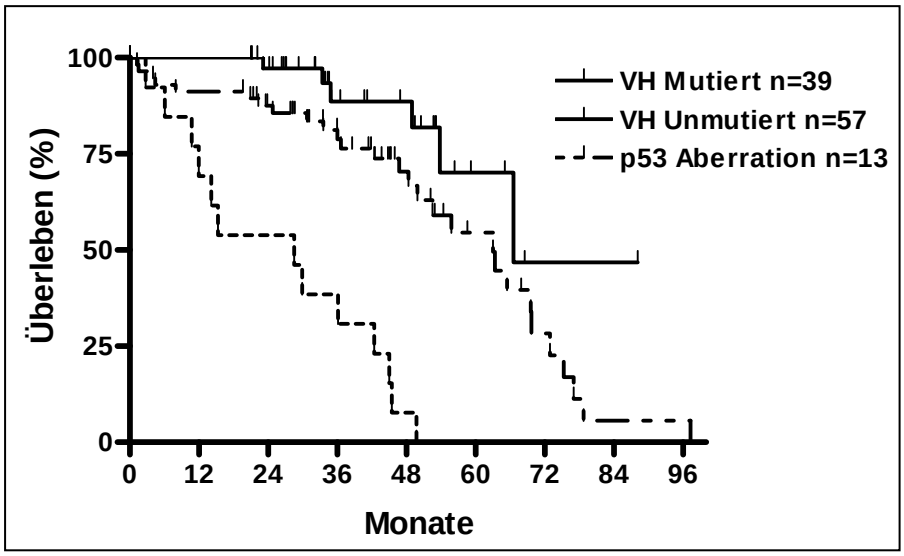

Abbildung 10: Kurve des Gesamtüberlebens: Vergleich – p53-Aberration versus V_H-Mutiert und V_H-Unmutiert. p<0,001.

Bei zusätzlicher Berücksichtigung der Patienten mit mutiertem V_H3-21 Gen haben diese mit p53-Aberration ein kürzeres Gesamtüberleben. Das mediane Überleben war in der mutierten Patientengruppe undefiniert, in der unmutierten 63 Monate. Bei den V_H3-21 Mutierten lag es bei 52 Monaten, bei den Patienten mit p53-Aberration im Median bei 28 Monaten.

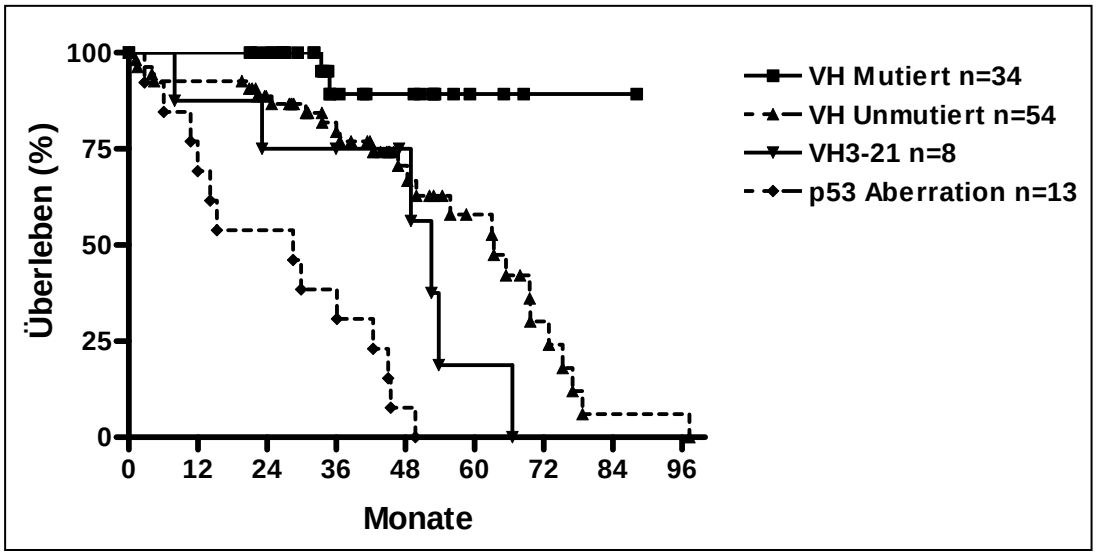

Abbildung 11: Kurve des Gesamtüberlebens: Vergleich – p53-Aberration versus VH-Mutiert, VH-Unmutiert, Mutation VH3-21. p<0,001.

Außerdem wurde der 11q-Deletionsstatus mittels FISH erhoben. In die Analysen des Gesamtüberlebens wurde schließlich auch diese Patientengruppe miteinbezogen. Es zeigte sich, dass Patienten mit p53-Aberration auch in diesem Vergleich die kürzesten Gesamtüberlebenszeiten haben.

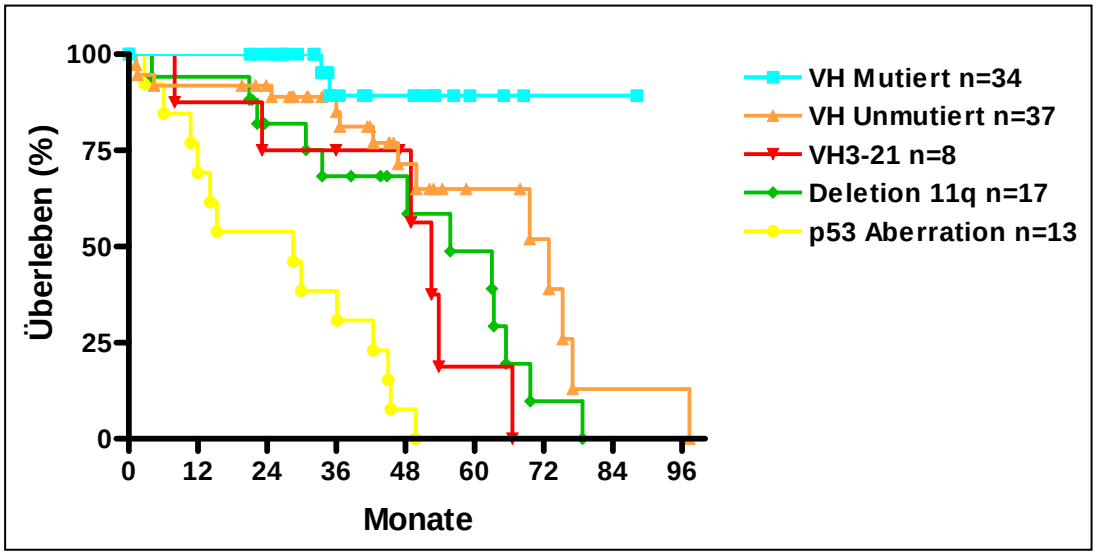

Abbildung 12: Kurve des Gesamtüberlebens: Vergleich – p53-Aberration versus VH-Mutiert, VH-Unmutiert, Mutation VH3-21 und 11q-Deletion. p<0,001.

3.4.3 Vergleich mono – und biallelischer p53 – Aberrationen

Ferner wurden die medianen Überlebenszeiten der Fälle mit mono- und biallelischen p53-Veränderungen verglichen. Diese lagen in unserem Gesamtkollektiv bei monoallelischer Aberration bei 44, bei biallelischer bei 29 Monaten nach Diagnosestellung der CLL. Nach Detektion des Defekts gleichen sich die Überlebenskurven zunehmend an. Es konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Überlebens bei mono- und biallelischen p53 Veränderungen gefunden werden (p=0,4296).

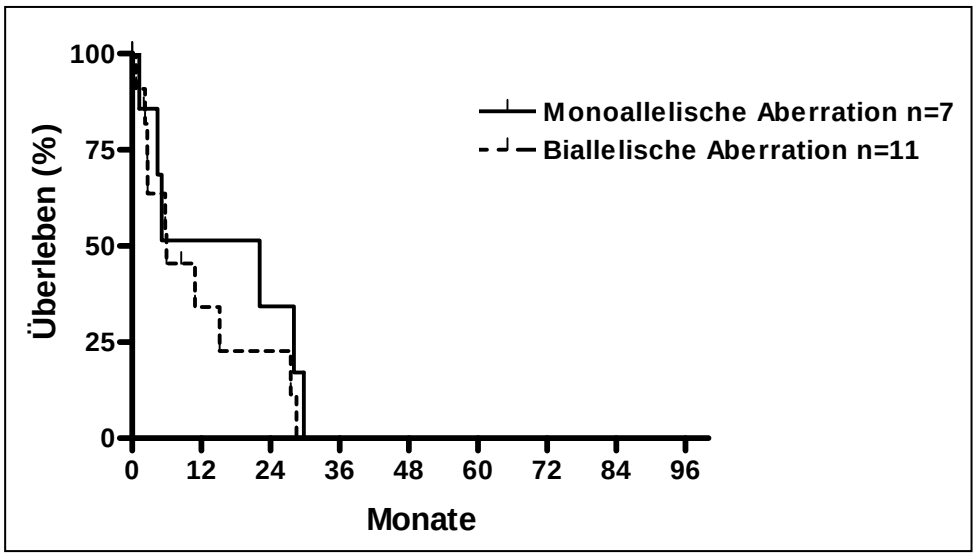

Abbildung 13: Überlebenskurve: Vergleich zwischen mono- und biallelischen Aberrationen nach Detektion der p53-Aberration.

3.5 Verlaufsanalysen unter Therapie

Bei vier der mehrfach im Laufe der Zeit untersuchten sechs Patienten wurde im Verlauf der Erkrankung eine Mutation des p53-Gens gefunden. Diese war erst nach Verabreichung von Chemotherapie und daraus folgender Abnahme der Leukozytenzahl detektierbar. Exemplarisch werden hier zwei Patienten dargestellt.

Bei Patient 156 konnte die Mutation nachgewiesen werden, nachdem er über 6 Monate eine Chlorambucil-Therapie erhalten hatte. Eine zweite Therapie mit Fludarabin hatte einen weiteren Signalverlust des Wildtyps zur Folge. Gleichzeitig mit der Mutation wurde auch in der FISH-Analyse eine Deletion diagnostiziert. Der Anteil der p53-deletierten Zellen nahm nach der Fludarabin-Therapie ebenfalls zu.

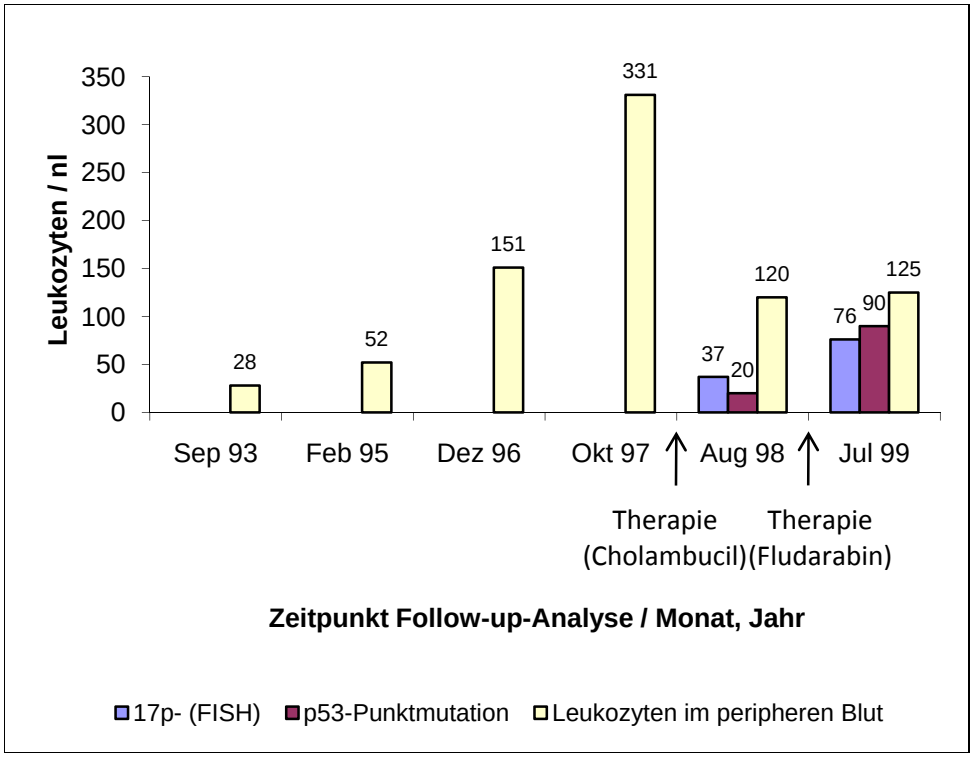

Abbildung 14: Graphische Darstellung der Leukozytenwerte im peripheren Blut und des Anteils des p53-mutierten und deletierten Zellklons von Patient 156. Auffallend ist das Auftreten des Klons mit p53-Aberration nach Reduktion der Zellzahl durch Chemotherapie 59 Monate nach Diagnose und dessen Zunahme nach erneuter Behandlung.

Auch bei Patient 122 wurde die Mutation erst nach einer Chlorambucil-basierten Chemotherapie sichtbar. Allerdings war eine monoallelische Deletion in der FISH schon 15 Monate vorher detektierbar.

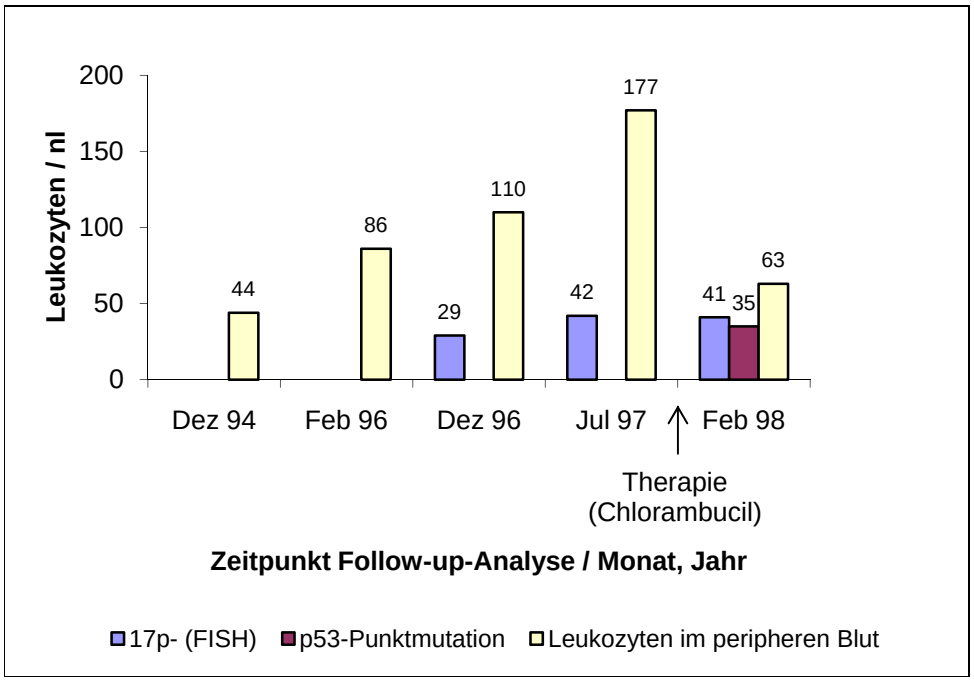

Abbildung 15: Graphische Darstellung der Verlaufsanalysen bei Patient 122. Der monoallelische Verlust des p53-Gens wurde 2 Jahre nach Diagnose detektiert. Erst nach Chemotherapie konnte die Punktmutation nachgewiesen werden.

In einem weiteren Fall konnten nach intensiver Chemotherapie mit Chlorambucil, mehrfach Fludarabin, CHOP und Bendamustin erst fast sieben Jahre nach Diagnosestellung zwei p53-Mutationen nachgewiesen werden. Es fand sich keine 17p-Deletion in der FISH-Analyse. Demgegenüber fand sich bei einer anderen Patientin nach wiederholter Therapie mit COP, Chlorambucil, Fludarabin und Epirubicin sowohl eine p53-Mutation als auch eine 17p-Deletion.

Die anderen beiden Patienten hatten dagegen eine bereits bei Diagnose nachweisbare Mutation im p53-Gen. Sie bekamen jedoch keine systemische Chemotherapie innerhalb des Beobachtungszeitraumes. Im Verlauf zeigten sich in der Sequenzanalyse keine zusätzlichen Mutationen und kein weiterer Verlust des Wildtyp-Restsignals.

4. Diskussion

4.1 Diskussion der Methodik

Im Zentrum der hier dargestellten Experimente stand das Amplifizieren des gesamten kodierenden Abschnitts des p53-Gens mittels PCR, wozu zunächst intronspezifische Primer konstruiert werden mussten. Die PCR musste mit diesen zunächst etabliert werden. Danach wurden die erhaltenen Produkte direkt sequenziert.

4.1.1 Konstruktion der Oligonukleotid – Primer

Zur Amplifikation des p53-Gens wurden zunächst neue Oligonukleotide hergestellt. Diese liegen im Gegensatz zu bereits veröffentlichten Oligonukleotiden (GAIDANO et al., 1991; FENAUX et al., 1992; FRANKEL et al., 1992; LEPELLEY et al., 1994) in ihrer gesamten Länge im Intron, so dass alle Exons des p53-Gens mit den „splice-sites“ am Exon-Intron-Übergang dargestellt werden können. Die in der CLL seltenen Mutationen im Intron, die die „splice-sites“ betreffen (BROMIDGE et al., 2000), könnten detektiert werden. Probleme ergaben sich bei der Amplifikation von Exon 10 und 11, so dass auf bereits veröffentlichte Primer zurückgegriffen werden musste (MURAKAMI et al., 1991). Drei dieser vier Primer lagen direkt an der Intron-Exon-Grenze. Somit könnten „splice-site“-Mutationen an den Übergängen von Intron 9 zu Exon 10, von Exon 10 zu Intron 10 und von Intron 10 zu Exon 11 nicht detektiert werden. Um dieses Problem zu umgehen, wurde die PCR mit dem Primer F1, der am Übergang von Intron 9 zu Exon 10 liegt und mit dem im nicht codierenden Exon 11 liegenden Primer G2 durchgeführt. Beim Sequenzieren, wozu auch die beiden anderen Primer mitbenutzt werden mussten, konnte so mindestens ein Strang von jedem Exon, „sense“ oder „antisense“, gewonnen werden, der den Übergang darstellt. Die einzige Stelle des p53-Gens, an der bei unseren Analysen Veränderungen nicht sicher nachgewiesen werden konnten, war der Übergang von Intron 9 zu Exon 10.

4.1.2 Amplifikation des p53 – Gens und Cycle Sequencing

Die Amplifikation mittels PCR und nachfolgendes direktes Sequenzieren sind robuste, sensitive und wenig anfällige Methoden. Sicher können Mutationen allerdings erst nachgewiesen werden, wenn der Anteil unter den untersuchten Zellen mindestens ungefähr 20% beträgt (PREUDHOMME et al., 1997). Zu einer Minderung der Sensitivität kann es kommen, wenn zu wenig DNA eingesetzt wird. Die Signalintensität der Sequenzen ist dann gering und Mutationen, die nur einen geringeren Anteil der leukämischen Zellen ausmachen, sind nicht mehr zu erkennen.

Außerdem spielt die Qualität der DNA eine wichtige Rolle. Qualitativ schlechte DNA, die beispielsweise reaktionshemmende Substanzen wie Ethanolreste aus der Extraktion enthält, macht eine Erhöhung der Zyklenzahl notwendig. Damit können Verunreinigungen hochamplifiziert werden, die die Detektion von Mutationen verhindern. Durch sorgfältiges Abdampfen des Alkohols in der DNA-Extraktion kann dieses Problem umgangen werden. Schwierig stellt sich auch die Amplifikation von degradierter DNA dar. Hierzu wurden Oligonukleotide konstruiert, die einen kleineren DNA-Abschnitt umspannen und so doch noch zur Produktbildung führen.

Eine weitere Fehlerquelle dieser Technik besteht in der Möglichkeit von akzidentiellen Kontaminationen. Durch striktes Achten auf Sauberkeit und Verwendung von autoklavierten Materialien konnte diese aber sehr gering gehalten werden. Kontrolliert wurden eventuelle Verunreinigungen durch das Mitführen von Negativkontrollen. Um sicherzugehen, dass Mutationen nicht von Verunreinigungen, sondern von der DNA des Patienten herrühren, wurden die Ergebnisse in einer unabhängigen PCR verifiziert.

4.1.3 Methoden zur Detektion von p53 – Aberrationen

Charakteristisch treten Aberrationen im p53-Gen in über 90% der Fälle als Punktmutationen auf (VOUSDEN et al., 2002). Da es durch den Austausch einer einzigen Base zu einer sehr geringen Veränderung auf DNA-Ebene kommt, sind Punktmutationen sehr schwer zu detektieren. Verschiedene Methoden werden hierzu angewendet:

- Serologische Analysen

  Ein Drittel der Patienten mit soliden Tumoren und p53-Mutation produziert zirkulierende Antikörper gegen p53, die in Gegenwart von Mutationen auftreten. Der Nachweis dieser Antikörper durch ELISA oder Immunopräzipitation ist deshalb sehr spezifisch. Bei hämatologischen Erkrankungen ist die Sensitivität wegen der begleitend auftretenden Immunschwäche und der damit verbundenen verminderten Antikörperproduktion jedoch eventuell niedrig (PREUDHOMME et al., 1997).

- Immunzyto – und immunhistochemische Analysen

  Immunzyto- und immunhistochemische Analysen sind schnelle, einfach durchführbare Methoden, die eine Aussage über die p53-Integrität machen können, indem akkumuliertes p53-Protein in den mutierten Tumorzellen durch monoklonale Antikörper nachgewiesen wird. Allerdings ist eine direkte Detektion der p53-Mutationen nicht möglich. Außerdem führen nur missense-Mutationen zu einer Verlängerung der Halbwertszeit des Proteins. Demzufolge werden 10-15% der Mutationen, wie Mutation zu einem Stop-Codon, „frame-shift“- und „splice-site“-Mutationen, nicht aufgedeckt (IMAMURA et al., 1994; PREUDHOMME et al., 1997). Ein weiteres Problem stellt ein gewisser Anteil an falsch positiven Ergebnissen dar. Hier kann es sich einerseits um mutierte Proben handeln, deren mutierter Anteil sehr gering und damit mit SSCP und direktem Sequenzieren noch nicht nachweisbar ist (LEPELLEY et al., 1994). Andererseits kann die Stabilisierung des p53-Proteins auch durch andere Mechanismen als eine p53-

Mutation bedingt werden (SOUSSI et al., 1994). Veränderungen in der Signalkaskade der Regulation der p53-Expression, z.B. Alteration des MDM2 Gens, oder ein Verlust der Komponenten der von p53 eingeleiteten Apoptosekaskade, z.B. Caspase-9 oder APAF1, können dafür verantwortlich sein (VOUSDEN et al., 2002).

- Molekulare Analysen: PCR-SSCP und direktes Sequenzieren von DNA

  Durch die SSCP-Analyse können in DNA-Fragmenten mit einer Länge von 100 bis 300 bp Mutationen mit einer Spezifität von mehr als 95% detektiert werden (IMAMURA et al., 1994). Die Sensitivität ist jedoch niedriger. Einige Mutationen haben keinen Mobilitäts-Shift in der SSCP zur Folge und bleiben mit dieser Methode unerkannt (HOWES et al., 1996), so dass Punktmutationen nur in 80-90% der Fälle detektiert werden (HAYASHI, 1992). Mutationen, deren Anteil unter den leukämischen Zellen weniger als 20% beträgt, können sowohl mit SSCP als auch mit direktem Sequenzieren nicht mehr sicher nachgewiesen werden (PREUDHOMME et al., 1997). Außerdem wird die Detektionsrate dieser Methode von verschiedenen Faktoren, wie Konstanz der Temperatur während der Elektrophorese, Länge des DNA-Fragments und Gelzusammensetzung stark beeinflusst (HAYASHI et al., 1993; YUAN et al., 1999). Mit der SSCP kann nur die Existenz einer Mutation nachgewiesen werden, nicht ihre genaue Lokalisation auf dem Gen. Deshalb ist anschließendes Sequenzieren der Fälle mit abnormalem SSCP-Ergebnis notwendig, um zwischen richtigen Mutationen, stillen Mutationen und Polymorphismen zu unterscheiden (IMAMURA et al., 1994).

Punktmutationen auf einem Allel des p53-Gens gehen meist mit einer Deletion des zweiten Allels einher. Da Deletionen mit den oben bereits angesprochenen Methoden nicht sicher gefunden werden können, wird hierzu die zytogenetische Analyse angewendet. Mit der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) können Verluste und strukturelle Abnormalitäten eines spezifischen Gens mit hoher Sensitivität nachgewiesen werden. Auch eine Quantifizierung der Zellen, die eine Deletion tragen, kann bestimmt werden (DÖHNER et al., 1995).

Aufgrund des Aberrationsmusters von p53 und 17p stellte sich die Frage, ob die aufwendige direkte Sequenzanalyse bei der Detektion von p53-Aberrationen einen zusätzlichen Informationsgewinn zu der in der Routine einfacher durchführbaren FISH-Analyse bringt. Unsere Ergebnisse zeigen, dass sich die beiden Methoden in frühen Stadien der Erkrankung ergänzen. Jede für sich allein würde einen kleinen Prozentsatz an Patienten mit Veränderungen am Tumorsuppressorgen p53 nicht aufdecken, in unserem Kollektiv 4 von 119 (3,4 %) in der Sequenzanalyse und 2 von 119 (1,7 %) in der FISH-Analyse. Die zytogenetische Analyse kann Deletionen mit hoher Sensitivität detektieren (DÖHNER et al., 1995), jedoch keine Punktmutationen. Diese können durch PCR und direktes Sequenzieren erkannt werden. Für das p53-Screening von großen CLL-Patientenkollektiven erscheint diese Methode zeitlich zu aufwendig, da der Anteil der zusätzlich gefundenen Patienten klein ist. Zur Feststellung des p53-Mutationsstatus bei hohen Fallzahlen bietet sich die SSCP-Analyse an (SOUSSI et al., 1994; IMAMURA et al., 1994; HOWES et al., 1996). Zur Identifikation der Mutationen kann anschließend direkt sequenziert werden. SSCP-Analysen zeigen in einer Studie gleiche (FENAUX et al., 1992), meist aber etwas geringere Detektionsraten als die direkte Sequenzanalyse (PREUDHOMME et al., 1997). Diese Aussagen sollten wegen der unterschiedlichen Krankheitsstadien zum Untersuchungszeitpunkt jedoch kritisch beurteilt werden. Zusammenfassend kann das Fazit gezogen werden, dass jede Methode, SSCP und direktes Sequenzieren, Vor- und Nachteile haben und in Abhängigkeit von der Fragestellung eingesetzt werden sollten. Ergänzend sollte auch eine FISH-Analyse durchgeführt werden. Keine der diskutierten Methoden alleine wird alle p53-Veränderungen darstellen können.

4.2 p53 – Mutationen in der B – CLL

4.2.1 Inzidenz

p53-Mutationen kommen in der B-CLL im Vergleich zu soliden Tumoren relativ selten vor. In früheren Studien wurden in Kollektiven von 39 bis 115 CLL-Patienten Aberrationsraten des p53-Gens von 10 bis 15 % beschrieben (GAIDANO et al.,1991; FENAUX et al., 1992; EL ROUBY et al., 1993; WATTEL et al., 1994; DÖHNER et al., 1995; LENS et al., 1997, THORNTON et al., 2004). Diese Ergebnisse wurden durch SSCP-Analyse und anschließendes Sequenzieren oder durch FISH-Analyse gewonnen. Da knapp 90% der Mutationen zwischen Exon 5 und 8 liegen und bei hämatologischen Erkrankungen Mutationen außerhalb dieser Region nur selten vorkommen (GREENBLATT et al., 1994), wurden die Analysen meist auf diese Bereiche begrenzt. Wir untersuchten DNA von 119 Patienten durch PCR und anschließendes direktes Sequenzieren, wodurch auch Mutationen detektiert werden können, die keine Konformationsänderung des p53-Gens und somit keinen Mobilitätsshift in der SSCP haben. Außerdem wurde das gesamte codierende p53-Gen von Exon 2 bis 11 analysiert, um Mutationen außerhalb der DNA-bindenden Domäne mit zu erfassen. Dennoch zeigten unsere Mutationsanalysen bezüglich der Inzidenz keine anderen Erkenntnisse im Vergleich zu den oben genannten Studien. Die p53-Mutationsrate betrug 8%. Bei zusätzlicher Beachtung der FISH-Ergebnisse ergab sich eine p53-Aberrationsrate von 12%. Die Analysen wurden bei 82% unserer Patienten innerhalb eines Jahres nach Diagnosestellung durchgeführt. Beim direkten Sequenzieren muss der Anteil des mutierten Allels mindestens 20% betragen, um dieses sicher zu detektieren (PREUDHOMME et al., 1997). Möglicherweise wurden aus diesem Grund einige bereits vorhandene Mutationen nicht detektiert. p53-Aberrationen scheinen zumindest teilweise spät im Verlauf der Erkrankung erworben (PREUDHOMME et al., 1997) bzw. erst im Verlauf detektierbar zu werden (ZENZ et al., 2008).

4.2.2 Mutationsspektrum

Beim Vergleich von 50 Studien, die das gesamte p53-Gen untersucht haben, konnte innerhalb der Exons 5 bis 8 eine Mutationshäufigkeit von 87% gefunden werden. Mit hoher Frequenz fanden sich die Mutationen in den hochkonservierten Bereichen und zwischen den Codons 151-164, 193-200, 213-223. Die anderen Mutationen verteilten sich zum Großteil auf Exon 4 (8 %) und Exon 10 (4 %) und waren durch einen hohen Anteil von Mutationen zu einem Stop-Codon oder Frameshifts gekennzeichnet (GREENBLATT et al., 1994). Innerhalb der lymphatischen Erkrankungen dominierten Transitionen, die häufig die Codons 175, 245, 248 und 273 betrafen (HOLLSTEIN et al,.1991; NEWCOMB et al., 1995, OLIVIER et al., 2002). Das Mutationsspektrum in der B-CLL zeigte im Vergleich dazu jedoch mehrere Unterschiede. Nur 80% der Mutationen lagen innerhalb dieser sieben oben genannten „hot-spot"-Bereiche. Weiter war eine Häufung von Mutationen in Codon 209 zu beobachten. Hierbei handelte es sich meist um kleine Deletionen, die in der B-CLL generell relativ häufig auftreten (GANDINI et al., 1994). Am CpG-Dinukleotid des Codons 273 dominierten in der CLL Transversionen (NEWCOMB et al., 1995). Unsere Ergebnisse wiesen eine Mutationshäufigkeit von 87 % innerhalb von Exon 5 bis 8 auf, wovon außer einer „missense"-Mutation in Codon 167 alle in den oben genannten „hot-spot"-Bereichen lagen. Allerdings waren 5 der 15 p53-Mutationen (Codon 98, 167, 193, 214, 317) bisher bei der CLL nicht vorbeschrieben (Vergleich mit IARC database, Version R10, 07/2005, OLIVIER et al., 2002). In Exon 4 und 9 fanden sich, übereinstimmend mit der Literatur, Mutationen zum Stopcodon und Frameshift. Auch wir fanden eine 2bp-Deletion in Codon 209. Der hohe Anteil an Transitionen entspricht ebenfalls den Angaben der Literatur (PROKOCIMER et al., 1994). Allerdings traten diese nicht gehäuft in CpG-Dinukleotiden auf (SOUSSI et al., 1994). Codon 273 war als einziges CpG-Dinukleotid betroffen. Hier zeigte sich die für die CLL typische Transversion (NEWCOMB et al., 1995). Die Aberrationen waren relativ gleichmäßig über die Exons 4 bis 9 verteilt, abgesehen von einer Anhäufung in Exon 5 und 6. Auffallend war zudem eine spezifische Mutation in Codon 179, die unter den 15 nachgewiesenen Mutationen dreimal gefunden wurde und bisher bei der CLL nur zweimal vorbeschrieben war (OLIVIER et al., 2002). Eine „splice-site"-Mutation konnte bei unserem Patientenkollektiv nicht detektiert

werden, diese ist bisher in der CLL nur in einem Fall beschrieben worden (BROMIDGE et al., 2000).

Diese Veränderungen führen auf unterschiedliche Weise mutmaßlich zum Funktionsverlust des Proteins. p53 Mutationen, die die sequenzspezifische DNA-Bindungsdomäne betreffen, können in zwei verschiedene Arten unterteilt werden (SOUSSI et al., 1996; LEVINE, 1997): Einerseits kann der direkte Kontakt mit der DNA gestört sein und damit die Fähigkeit, als Transkriptionsfaktor zu wirken. Dies wird beispielsweise durch eine Mutation im Codon 273 verursacht (LEVINE, 1997). Andererseits kann die Mutation zu einer Konformationsänderung des Proteins und dadurch zum Funktionsverlust führen, was z.B. bei Veränderungen in Codon 212-217 der Fall ist. Bei Deletionen der prolinreichen Region zwischen den AS 61 und 94 kann das mutierte Protein zwar die transkriptionelle Aktivität normal vermitteln. Allerdings kommt es zu einer deutlichen Abnahme der Apoptose und des Zellzyklusarrests (LEVINE, 1997).

4.2.3 Prognostische Bedeutung von p53 – Aberrationen

Obwohl Aberrationen, die das p53 Gen betreffen in der B-CLL im Vergleich zu soliden Tumoren relativ selten vorkommen, wird ihnen dennoch enorme klinische Bedeutung zugeschrieben. EL ROUBY et al. (1993) fanden p53-Mutationen als stärksten unabhängigen prognostischen Faktor. Auch in einer prospektiven Studie, die mit Chromosomenbänderungsanalyse durchgeführt wurde, waren 17p-Aberrationen die einzige chromosomale Aberration von prognostischer Relevanz (GEISLER et al., 1997).

Als anderer wichtiger prognostischer Faktor gilt der V_H-Mutationsstatus (DAMLE et al., 1999; HAMBLIN et al., 1999), der auch für Patienten in frühen klinischen Stadien (Binet A) eine hohe Aussagekraft hat (KRÖBER et al., 2002). Unabhängig vom Mutationsstatus ist die Expression spezifischer V_H-Gene, wie z.B. V_H3-21 mit schlechterem klinischem Ergebnis und signifikant kürzeren Überlebenszeiten assoziiert (TOBIN et al., 2002; LIN et al., 2003; KRÖBER et al., 2002 [Abstract]). Zwischen dem V_H-Mutationsstatus und genomischen Aberrationen wurde eine Korrelation beobachtet. So finden sich Aberrationen mit schlechter Prognose, wie 11q-, 17p-Deletionen oder p53-Mutationen, gehäuft in der V_H-unmutierten Subgruppe (KRÖBER et al., 2002; OSCIER et al., 2002;

LIN et al., 2002). In multivariaten Analysen bezüglich der Überlebenszeit ergaben sich der V_H-Mutationsstatus, 11q-Deletion und 17p-Deletion/p53-Mutation oder p53-Dysfunktion als unabhängige prognostische Faktoren (KRÖBER et al., 2002; OSCIER et al., 2002; LIN et al., 2002). Dies konnte in unseren Untersuchungen an einem Patientenkollektiv, das zu 82% innerhalb des ersten Jahres nach Diagnosestellung genetisch untersucht wurde, bestätigt werden. Die Patientengruppe mit p53-Aberrationen wies unter allen Subgruppen das schlechteste Gesamtüberleben auf, unabhängig von anderen ungünstigen Prognosefaktoren wie V_H-Unmutiert, Expression von V_H3-21 und 11q-Deletion.

17p-Veränderungen sind vermehrt mit fortgeschrittenem klinischen Stadium (GAIDANO et al., 1991; FENAUX et al., 1992; WATTEL et al., 1994; LENS et al. 1997; CORDONE et al., 1998; DÖHNER et al,. 2000) und aggressiverem Krankheitsverlauf mit B-Symptomatik, wie Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsverlust, mit niedrigeren Hämoglobin-, Thrombozyten- und Serum-Albuminwerten sowie mit erhöhten LDH- und AP-Werten vergesellschaftet (DÖHNER et al., 2000). Obwohl unser Patientenkollektiv zu 82% im ersten Jahr nach Diagnosestellung untersucht wurde, zeigte sich bei 77% der Patienten mit p53-Aberration ein klinisch fortgeschrittenes Krankheitsstadium (Binet B oder C). Veränderungen des p53-Gens gehen im Vergleich zu Patienten ohne derartige Aberrationen mit einem signifikant kürzeren behandlungsfreien Intervall einher (DÖHNER et al., 1995; CORDONE et al., 1998; KRÖBER et al., 2002).

Außerdem korrelieren sie auch mit sehr kurzen Überlebenszeiten (EL ROUBY et al., 1993; WATTEL et al., 1994; DÖHNER et al., 1995; LENS et al., 1997; CORDONE et al., 1998; THORNTON et al., 2004). Wir fanden in unseren Auswertungen bei Patienten mit p53-Aberrationen eine schlechte Prognose (mediane Überlebenszeit 29 Monate nach Diagnosestellung versus 67 Monate ohne p53-Aberration). Es fallen jedoch generell für die CLL kurze Gesamtüberlebenszeiten des untersuchten Kollektivs auf. Dies liegt an der Überrepräsentation von ungünstigen genomischen Aberrationen. Insbesondere sind die Überlebenszeiten der V_H-mutierten Patienten kurz. Ursächlich dafür sind am ehesten die V_H3-21-Patienten, die eine schlechte Prognose haben und in Abbildung 10 in einer Gruppe zusammengefasst sind. Kritisch sollte angemerkt werden, dass die Patientenauswahl nach Materialverfügbarkeit und möglichst kurzem Zeitraum zwischen Diagnose und Materialeingang getroffen wurde. Obwohl es sich hier also um ein atypisches

Patientenkollektiv mit ungünstiger Prognose handelt, zeigt sich dennoch bei Patienten mit p53-Aberrationen der ungünstigste Verlauf.

Veränderungen von p53 sind durch Therapieresistenz gekennzeichnet. EL ROUBY et al. (1993) beschrieben ein schlechtes klinisches Ansprechen auf Therapie mit dem Alkylans Chlorambucil bei Patienten mit p53-Mutation. Auf Fludarabin-Therapie sprach bei DÖHNER et al. (1995) kein Patient mit 17p-Deletion an. Bestätigt wurde das fehlende Ansprechen auf konventionelle Chemotherapie durch in verschiedenen Studien (GREVER et al., 2007; CATOVSKY et al., 2007). Auch die Therapie mit dem monoklonalen Antikörper anti-CD20 Rituximab zeigte bei Patienten mit 17p- oder p53-Aberrationen ein schlechtes Ansprechen (BYRD et al., 2003; 2006). Mit dem monoklonalen Antikörper anti-CD52 Alemtuzumab konnten bei fludarabinrefraktären Patienten mit 17p-Aberrationen allerdings komplette Remissionen erzielt werden (STILGENBAUER et al., 2002; 2007; LOZANSKI et al., 2004; HILLMEN et al., 2007).

4.3 Vergleich zwischen mono – und biallelischen Aberrationen

Am häufigsten führt bei der B-CLL eine Mutation eines Allels und ein Verlust des zweiten Allels zum Funktionsverlust des p53-Proteins. In der Literatur variieren jedoch die Angaben über die Inzidenz. FENAUX et al. (1992) zeigten an einem kleinen Kollektiv, dass p53-Mutation und 17p-Monosomie zusammen auftreten. WATTEL et al. (1994) beschrieben, dass in einem Prozentsatz von 75% der p53-mutierten Patienten keine Wildtypsequenz mehr nachweisbar ist. GAIDANO et al. (1994) hingegen konnten nur bei 60% der CLL-Fälle gleichzeitig Defekte auf beiden Allelen finden. In einer weiteren Studie wiesen 4 der 5 p53-mutierten Fälle eine Deletion des verbliebenen Allels auf. Zusätzlich fiel bei weiteren 4 Patienten ein Verlust eines Allels ohne gleichzeitige Mutation auf (LENS et al., 1997). Die unterschiedliche Inzidenz dieser Ereignisse ist zu einem Teil auf die Sensitivität und Spezifität der verwendeten Untersuchungstechniken zurückzuführen. Andererseits wurden Patienten in verschiedenen Krankheitsstadien untersucht.

In unseren Analysen konnte bei insgesamt 12% der Patienten ein Defekt von 17p oder p53 aufgedeckt werden. 57% (n=8) davon zeigten eine biallelische Aberration, bei 43% (n=6)

war nur ein Allel betroffen, wobei es sich in vier Fällen um 17p-Deletionen, in zwei Fällen um p53-Mutationen handelte. Unsere Ergebnisse zeigten im Vergleich zu den früheren Studien ein relativ seltenes Auftreten von p53-Mutation mit gleichzeitigem Verlust des zweiten Allels durch 17p-Deletion. Es wurde bereits die Hypothese aufgestellt, dass die Deletion eines Allels nur das erste Ereignis ist und dann im Verlauf aufgrund der genetischen Instabilität eine zweite Mutation auf dem anderen Allel hinzukommt (DÖHNER et al., 1995). Dass Deletion und Mutation zu unterschiedlichen Zeitpunkten auftreten können, wurde bereits an einigen Fällen von CML (Chronisch myeloische Leukämie) (NAKAI et al., 1992) und SLVL (splenic lymphoma with villous lymphocytes) gezeigt (GRUSZKA-WESTWOOD et al., 2001).

An experimentellen Mausmodellen wurde bereits gezeigt, dass die Mutation eines Allels, die Deletion eines Allels und die Inaktivierung beider Allele unterschiedliche Auswirkungen auf das Tumorwachstum haben (DONEHOWER et al., 1996). DU et al. (1995) wiesen nach, dass in niedrig malignen MALT-Lymphomen monoallelische p53-Defekte vorherrschen, während in hochmalignen Tumoren in der Mehrzahl der Fälle beide Allele geschädigt waren. Eine weitere Studie zeigte, dass eine Inaktivierung beider Allele gehäuft bei CLL/PL, einer Form mit atypischer Lymphozytenmorphologie, auftritt (LENS et al., 1997).

Ob es bei CLL-Patienten mit 17p- oder p53-Aberrationen, die generell eine sehr schlechte Prognose haben, Unterschiede zwischen mono- und biallelischen Aberrationen gibt, wurde bisher noch nicht beschrieben. Hinsichtlich des Gesamtüberlebens konnte bei unserem Patientenkollektiv kein signifikanter Unterschied gefunden werden. Es gibt über die prognostische Relevanz von monoallelischen p53-Mutationen wenig Daten. Alle bisherigen Studien konnten die biologische und prognostische Signifikanz alleiniger p53-Mutationen nicht dokumentieren (GREVER et al., 2007). In einer multivariaten Analyse wurden monoallelische p53-Mutationen als unabhängiger prognostischer Faktor bewertet (ZENZ et al., 2008).
Die Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass für den Funktionsverlust von p53 nicht immer der Verlust des intakten Allels erforderlich ist. Punktmutationen können in Abhängigkeit von ihrer Lokalisation neben dem Funktionsverlust zusätzlich einen dominant negativen Effekt auf das verbliebene Wildtyp-Allel ausüben und dieses

inaktivieren, indem sie eine Konformationsänderung induzieren, was dann einem vollständigen Funktionsverlust gleichkommt (DITTMER et al., 1993). In manchen Fällen ist eine Aktivierung von p53 zum Onkogen möglich (ZENZ et al., 2008).

4.4 p53 – Mutationen im Therapieverlauf

Um die p53-Mutationshäufigkeit in frühen CLL-Stadien zu bestimmen, untersuchten wir 119 Patienten und fanden in 8% der Fälle p53-Mutationen. Diese Daten zeigen, dass die Mutationen auch bereits kurze Zeit nach Beginn der Erkrankung auftreten. Dennoch wurden sie gehäuft, auch in unserem Patientenkollektiv, in fortgeschrittenen klinischen Stadien der CLL, vor allem Binet B und C, und bei progressivem Krankheitsverlauf gefunden (GAIDANO et al., 1991; FENAUX et al., 1992; WATTEL et al., 1994; LENS et al., 1997; CORDONE et al., 1998). Häufig werden die genetischen Veränderungen im Verlauf der Erkrankung erworben (PREUDHOMME et al., 1997; OSCIER et al., 2002). Des Weiteren treten 17p- und p53-Aberrationen bei unbehandelten Patienten deutlich seltener auf als bei behandelten oder therapierefraktären (THORNTON et al., 2004). Dass die klonale Evolution in der CLL eine nicht unbedeutende Rolle spielt, wiesen LEUPOLT et al. (1999) nach. In 16% der untersuchten 55 Fälle konnten im Verlauf der Erkrankung in der FISH-Analyse zusätzliche neu aufgetretene Aberrationen aufgedeckt werden. Am häufigsten betrafen diese sekundären Deletionen den kurzen Arm von Chromosom 17 (LEUPOLT et al., 1999; CHEVALLIER et al., 2002). Diese Beobachtungen legten die Vermutung nahe, dass es im Verlauf der Erkrankung auch zu einer Veränderung des p53-Mutationsstatus kommen könnte. Wir konnten bei unseren Analysen in den vier Fällen, die bei Diagnose nicht mutiert waren, nach intensiver Chemotherapie eine 17p-Deletion und/oder eine p53-Mutation detektieren. Im Fall von Patient 122 trat die Deletion bereits 24 Monate nach Diagnosestellung auf, die p53-Mutation konnte erst nach Durchführung einer Therapie nachgewiesen werden. Durch die Behandlung kommt es zu einer Tumorreduktion, die sich klinisch unter anderem durch eine Abnahme der Leukozytenzahl im peripheren Blut äußert. Allerdings reduzierte sich dadurch nur die Zahl der p53-unmutierten Leukozyten. Der therapierefraktäre p53-mutierte Zellklon wuchs unverändert weiter. Da er somit einen größeren prozentualen Anteil an der Gesamtleukozytenzahl hat, wird er auch durch konventionelle Methoden wie direktes Sequenzieren detektierbar. Bei

Patient 156 konnten wir die prozentuale Zunahme der aberranten Zellen an der Gesamtleukozytenzahl zeigen. Unsere Ergebnisse zeigen die Therapieresistenz des p53-mutierten Zellklons gegen konventionelle Chemotherapie in vivo als Grundlage für das beobachtete Therapieversagen bei p53-mutierten CLL-Patienten (EL ROUBY et al., 1993; WATTEL et al., 1994, DÖHNER et al., 1995, CORDONE et al., 1998). Bei den anderen zwei unserer im Verlauf der Erkrankung beobachteten Fälle, die im Gegensatz zu den anderen vier Patienten keine oder nur sehr milde Therapie bekommen haben, konnte in der Sequenzanalyse keine Zunahme des p53-mutierten Zellklons beobachtet werden. Um auf die Mutationsentstehung schließen zu können, müssten sensitivere Methoden angewendet und größere Fallzahlen untersucht werden. Bisher gibt es über die Genese der p53-Mutationen in der CLL nur Hypothesen. Einerseits könnte die Chemotherapie zu genetischer Instabilität führen und die Mutationsentstehung begünstigen. Andererseits könnte bereits bei Diagnosestellung in einem kleinen Anteil der Tumorzellen eine p53-Mutation vorhanden sein, die durch konventionelle Methoden, wie beispielsweise SSCP und direktes Sequenzieren, zu diesem Zeitpunkt nicht detektiert werden kann (WATTEL et al., 1994). Das sehr kurze Intervall zwischen Diagnose und erster Therapie würde diese Hypothese unterstützen. Die klonale Expansion eines anfangs kleinen Subklons mit mutiertem p53 während des Fortschreitens der Erkrankung wurde bereits in Gehirntumoren (SIDRANSKY et al., 1992) und akuter myeloischer Leukämie (WADA et al., 1994) mit sensitiven Methoden nachgewiesen.

4.5 p53 als relevantes Gen auf 17p13.1 ?

17p-Deletionen werden normalerweise mit einem Funktionsverlust des Tumorsuppressorgens p53 in Verbindung gebracht. Es wird jedoch immer wieder die Frage gestellt, ob nicht auch andere Tumorsuppressorgene, die auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 liegen, für die Tumorprogression verantwortlich sein können (FUJII et al., 1998;. HUANG et al., 2000). Unsere Ergebnisse sprechen in mehrfacher Hinsicht dafür, dass p53 das relevante Gen bei 17p-Deletionen ist und eine enge Korrelation zwischen 17p-Deletion und p53-Mutation besteht. Der klinische Verlauf ist ähnlich. 17p-Deletionen gehen in 57% der Fälle mit einer Punktmutation des p53-Gens einher. Somit kommt es durch Inaktivierung beider Allele zu einem vollständigen Funktionsverlust. Im Verlauf der

Erkrankung kann zusätzlich zur 17p-Deletion auch eine p53-Mutation auftreten. Außerdem zeigten auch monoallelische p53-Mutationen einen schlechten klinischen Verlauf.

4.6 Schlussfolgerungen

Abschließend kann aus den vorliegenden Daten geschlossen werden, dass sich die FISH-Analyse und das direkte Sequenzieren bei der Detektion von Veränderungen, die das Tumorsuppressorgen p53 betreffen, ergänzen. Keine der Untersuchungen kann alle Aberrationen feststellen. Jedoch erscheint die direkte Sequenzanalyse für das Screening großer Kollektive zu zeitaufwendig. Bei unseren Untersuchungen konnten in 12% der Fälle im frühen Verlauf der Erkrankung p53-Aberrationen identifiziert werden. Die Mutationen lagen größtenteils an den beschriebenen „hot-spots“. Obwohl ein atypisches Patientenkollektiv mit ungünstiger Prognose untersucht wurde, wiesen Patienten mit p53-Aberrationen unabhängig von V_H-Mutationsstatus und ungünstigen prognostischen Faktoren, wie Gebrauch von V_H3-21 und 11q-Deletion, die schlechtesten Überlebenszeiten auf. Zwischen mono- und biallelischen Aberrationen konnte hinsichtlich der Prognose kein signifikanter Unterschied gefunden werden. Nach dem Zeitpunkt des Nachweises der p53-Mutation nimmt die Überlebenswahrscheinlichkeit weiter ab. Aus diesem Grund sollte die p53-Veränderung möglichst früh diagnostiziert werden. Somit könnte eine Risikostratifizierung und die Einleitung einer dementsprechenden Therapie, z.B. mit Alemtuzumab, erfolgen. Da sowohl Mutationen als auch Deletionen erst im Verlauf der Erkrankung auftreten können, sollte bei partieller Remission, fehlendem Ansprechen auf die Therapie oder Rezidiven eine erneute genetische Analyse durchgeführt werden. Bei den Verlaufsanalysen konnte in vivo die Resistenz von p53-mutierten B-Zell-Klonen gegen Chemotherapie nachgewiesen werden.

4.7 Ausblick

Das Tumorsuppressorgen p53 und die von ihm abhängigen Gene spielen bei der Resistenzentwicklung gegen Chemotherapeutika in der B-CLL eine wichtige Rolle. Der genaue Mechanismus, der letztendlich zur Resistenz führt, ist nicht bekannt (PANASCI et

al., 2001). p53 ist ein zentraler Regulator der Apoptoseinduktion. Hiermit könnte das Therapieversagen bei Patienten mit p53-Aberrationen erklärt werden (LOWE et al., 1993). Die meisten Chemotherapeutika und Bestrahlung vermitteln ihre Wirkung, indem sie in der Zelle Apoptose auslösen (REED, 1998). Allerdings scheint intaktes p53 nicht für alle Apoptosewege notwendig zu sein (PROKOCIMER et al., 1994). Ein p53-unabhängiger Mechanismus könnte der Wirksamkeit des Antikörpers Alemtuzumab (Campath-1H) zugrunde liegen. Hiermit wurden bei B-CLL mit p53-Mutation komplette Remissionen erzielt (STILGENBAUER et al., 2002; LOZANSKI et al., 2004), so dass dies eine neue vielversprechende Behandlungsoption darstellt. Weitere erfolgversprechende prospektive Studien laufen derzeit. So ergab sich in einer Zwischenanalyse der CLL2H-Studie der deutschen CLL-Studiengruppe (GCLLSG), in der fludarabinrefraktäre Patienten mit Alemtuzumab behandelt werden, gute Ansprechraten (33%) bei p53/17p-Aberrationen (STILGENBAUER et al., 2007). Weitere neue Therapieansätze, wie z.B. der cyclinabhängige Kinaseinhibitor Flavopiridol, hochdosierte Steroide in Kombination mit Alemtuzumab oder Lenalidomide werden in klinischen Studien geprüft (BYRD et al., 2004; PETTITT et al., 2006). Außerdem wurde in vitro bereits versucht, die p53-Funktion in mutierten Tumorzellen zu reaktivieren und dadurch einen therapeutischen Gewinn zu erzielen (VOUSDEN et al., 2002).

5. Zusammenfassung

Die chronisch lymphatische Leukämie vom B-Zell Typ (B-CLL) ist die häufigste Leukämie in der westlichen Hemisphäre. Sie ist durch äußerst unterschiedliche klinische Verläufe gekennzeichnet. In letzter Zeit wurden durch den Einsatz molekularbiologischer und zytogenetischer Techniken verschiedene prognostische Faktoren identifiziert. Den ungünstigsten prognostischen Wert haben Aberrationen, die das Tumorsuppressorgen p53 betreffen. Dieses liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 (17p) und spielt eine zentrale Rolle in der Kontrolle des Zellzyklus, bei der Reparatur von DNA(Desoxyribonukleinsäure)-Schäden und der Apoptoseauslösung. In der vorliegenden Dissertation wurde bei 119 Patienten mit B-CLL im frühen Verlauf der Erkrankung die Inzidenz von p53-Mutationen und 17p-Deletionen bestimmt. Prognostische Untersuchungen bezüglich des Überlebens wurden zusätzlich im Vergleich mit dem V_H-Mutationsstatus durchgeführt. Außerdem war die Inzidenz mono- und biallelischer 17p-Veränderungen und deren prognostische Bedeutung für CLL-Patienten mit von besonderem Interesse. In sechs Fällen wurden zusätzlich im Verlauf der Erkrankung Aberrationen des p53-Gens untersucht.

Fragmente von genomischer DNA, die die Exons 2-4, 5-9 und 10 und 11 enthielten, wurden durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Der p53-Mutationsstatus wurde durch direktes Sequenzieren mit intronspezifischen Oligonukleotidprimern analysiert. Zudem lag bei allen Patienten der 17p-Deletionsstatus vor, der durch Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) gewonnen wurde.

In der Sequenzanalyse wurde in 10 von 119 Fällen (8%) eine p53-Mutation gefunden. Diese Mutationen verteilten sich über die Exons 4 bis 9. Sie traten nur teilweise an den für die CLL typischen „hot-spots“ auf. Bei zusätzlicher Beachtung der FISH-Ergebnisse betrug die Inzidenz der p53-Aberrationen 12%. Obwohl ein atypisches Patientenkollektiv mit ungünstiger Prognose untersucht wurde, wiesen Patienten mit p53-Aberrationen unabhängig von V_H-Mutationsstatus und ungünstigen prognostischen Faktoren, wie Gebrauch von V_H3-21 und 11q-Deletion, die schlechtesten Überlebenszeiten auf. Nach dem Auftreten der p53-Aberration war die Prognose deutlich schlechter. Aus diesem Grund sollte die p53-Veränderung möglichst früh diagnostiziert werden. Somit könnte eine

Risikostratifizierung und die Einleitung einer dementsprechenden Therapie, z.B. mit Alemtuzumab, erfolgen.

Bei den Verlaufsanalysen konnte in 4 der 6 untersuchten Fälle, die bei Diagnose der Erkrankung keine detektierbare Aberration hatten, nach Chemotherapie eine p53-Punktmutation und/oder 17p-Deletion nachgewiesen werden. Somit konnte die Therapieresistenz des p53-Klons auch in vivo gezeigt werden. Da sowohl Mutationen als auch Deletionen erst im Verlauf der Erkrankung auftreten können, sollte bei partieller Remission, fehlendem Ansprechen auf die Therapie oder Rezidiven eine erneute genetische Analyse durchgeführt werden.

Eine monoallelische Veränderung hatten 5% der Patienten. In 7% der Fälle wurden biallelische Defekte nachgewiesen. Hinsichtlich der Prognose konnte kein signifikanter Unterschied gefunden werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich die FISH-Analyse und die direkte Sequenzierung beim Nachweis von p53-Aberrationen ergänzen. Die Inzidenz dieser Veränderungen ist bei der B-CLL relativ niedrig. Allerdings ist diese Patientengruppe durch kurze Überlebenszeiten und eine schnelle Progression der Erkrankung gekennzeichnet, vor allem nach Detektion der p53-Veränderung. Die Verlaufsanalysen konnten die Resistenz des p53-Klons gegen Chemotherapie in vivo zeigen. Um Aussagen über die Inzidenz und den genauen Zeitpunkt des Auftretens der p53-Mutation machen zu können, müssen weitere Untersuchungen an größeren Fallzahlen durchgeführt werden.

6. Literaturverzeichnis

1. ALBRECHTSEN N, DORNREITER I, GROSSE F, KIM E, WIESMÜLLER L, DEPPERT W. Maintenance of genomic integrity by p53: complementary roles for activated and non-activated p53. *Oncogene*, 18: 7706-7717, 1999.
2. BATES S, VOUSDEN KH. Mechanisms of p53-mediated apoptosis. *Cell Mol Life Sci*, 55: 28-37, 1999.
3. BENNETT JM, CATOVSKY D, DANIEL MT, FLANDRIN G, GALTON DAG, GRALNICK HR, SULTAN C. Proposals for the classification of chronic (mature) B and T lymphoid leukemias. *J Clin Pathol*, 42: 567-584, 1989.
4. BINET JL, AUQUIER A, DIGIHIERO G, CHASTANG C, PIGUET H, GOASGUEN J, VAUG G, POTRON G, COLONA P, OBERLING F, THOMAS M, TCHERNIA G, JACQUILLAT C, BOIVIN C, LESTY C, DUAULT MT, MONCONDUIT M, BELABBES S, GREMY F. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from multivariate survival analysis. *Cancer*, 48: 198-206, 1981.
5. BÖYUM A. Isolation of lymphozytes, granulozytes and macrophages. *Scand J Immunol*, 5: 9-15, 1976.
6. BROMIDGE T, LOWE C, PRENTICE A, JOHNSON S. p53 intronic point mutation, aberrant splicing and telomeric associations in a case of B-chronic lymphocytic leukemia. *Br J Haematol*, 111: 223-229, 2000.
7. BULLRICH F, RASIO D, KITADA S, STAROSTIK P, KIPPS T, KEATING M, ALBITAR M, REED JC, CROCE CM. *ATM* Mutations in B-Cell chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Res*, 59: 24-27, 1999.
8. BYRD JC, GRIBBEN JG, PETERSON BL, GREVER MR, LOZANSKI G, LUCAS DM, LAMPSON B, LARSON RA, CALIGIURI MA, HEEREMA NA. Select high-risk genetic features predict earlier progression following chemoimmunotherapy with fludarabine and rituximab in chronic lymphocytic leukemia: justification for risk-adapted therapy. *J Clin Oncol*, 24: 437-443, 2006.

9. BYRD JC, RAI KR, SAUSVILLE EA, GREVER MR. Old and New Therapies in Chronic Lymphocytic Leukemia: Now Is the Time for a Reassessment of Therapeutic Goals. *Semin Oncol*, 25: 65-74, 1998.

10. BYRD JC, SMITH L, HACKBARTH ML, FLINN IW, YOUNG D, PROFFITT JH, HEEREMA NA. Interphase Cytogenetic Abnormalities in Chronic Lymphocytic Leukemia May Predict Response to Rituximab. *Cancer Res*, 63: 36-38, 2003.

11. BYRD JC, STILGENBAUER S, FLINN IW. Chronic Lymphocytic Leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program:* 163-183, 2004.

12. BYRD JC, WASELENKO JK, KEATING M, RAI K, GREVER MR. Novel Therapies for Chronic Lymphocytic Leukemia in the 21st Century. *Semin Oncol*, 27: 587-597, 2000.

13. CATOVSKY D, RICHARDS S, MATUTES E, OSCIER D, DYER MJ, BEZARES RF, PETTITT AR, HAMBLIN T, MILLIGAN DW, CHILD JA, HAMILTON MS, DEARDEN CE, SMITH AG, BOSANQUET AG, DAVIS Z, BRITO-BABAPULLE V, ELSE M, WADE R, HILLMEN P; UK NATIONAL CANCER RESEARCH INSTITUTE (NCRI) HAEMATOLOGICAL ONCOLOGY CLINICAL STUDIES GROUP; NCRI CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKAEMIA WORKING GROUP. Assessment of fludarabine plus cyclophosphamide for patients with chronic lymphocytic leukaemia (the LRF CLL4 Trial): a randomised controlled trial. *Lancet*, 370: 230-239, 2007.

14. CHESON BD, BENNETT JM, GREVER M, KAY N, O'BRIEN S, RAI KR. National Cancer Institute – Sponsored Working Group guidelines for Chronic Lymphocytic Leukemia: Revised Guidelines for Diagnosis and Treatment. *Blood*, 87: 4990-4997, 1996.

15. CHEVALLIER P, PENTHER D, AVET-LOISEAU H, ROBILLARD N, IFRAH N, MAHÉ B, HAMIDOU M, MAISONNEUVE H, MOREAU P, JARDEL H, HAROUSSEAU JL, BATAILLE R, GARAND R. CD38 expression and secondary 17p deletion are important prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia. *Br J Haematol*, 116: 142-150, 2002.

16. CLL TRIALIST'S COLLABORATIVE GROUP. Chemotherapeutic Options in chronic Lymphocytic Leukemia: a Meta-analysis of the Randomized Trials. *J Natl Cancer Inst*, 91: 861-868, 1999.

17. CORDONE I, MASI S, ROMANA MAURO FR, SODDU S, MORSILLI O, VALENTINI T, LUCE VEGNA M, GUGLIELMI C, MANCINI F, GIULIACCI S, SACCHI A, MANDELLI F, FOA R. p53 Expression in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia: A Marker of Disease Progression and Poor Prognosis. *Blood*, 91: 4342-4349, 1998.

18. CRESPO M, BOSCH F, VILLAMOR N, BELLOSILLO B, COLOMER D, ROZMAN M, MARCÉ S, LÓPEZ-GUILLERMO A, CAMPO E, MONTSERRAT E. ZAP-70 Expression as a Surrogate for Immunoglobulin-Variable-Region Mutations in Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*, 348: 1764-1775, 2003.

19. DAMLE RN, WASIL T, FAIS F, GHIOTTO F, VALETTO A, ALLEN SL, BUCHBINDER A, BUDMAN D, DITTMAR K, KOLITZ J, LICHTMAN SM, SCHULMAN P, VINCIGUERRA VP, RAI KR, FERRARINI M, CHIORAZZI N. Ig V Gene Mutation Status and CD38 Expression As Novel Prognostic Indicators in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*, 94: 1840-1847, 1999.

20. DIGHIERO G, BINET JL. When and How to Treat Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*, 343: 1799-1801, 2000.

21. DIGHIERO G, MALOUM K, DESABLENS B, CAZIN B, NAVARRO M, LEBLAY R, LEPORRIER M, JAUBERT J, LEPEU G, DREYFUS B, BINET JL, TRAVADE P. Chlorambucil in indolent chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 338: 1506-1514, 1998.

22. DITTMER D, PATI S, ZAMBETTI G, CHU S, TERESKY AK, MOORE M, FINLAY C, LEVINE AJ. Gain of functions mutations in p53. *Nat Genet*, 4: 42-46, 1993.

23. DÖHNER H, FISCHER K, BENTZ M, HANSEN K, BENNER A, CABOT G, DIEHL D, SCHLENK R, COY J, STILGENBAUER S, VOLKMANN M, GALLE PR, POUSTKA A, HUNSTEIN W, LICHTER P. p53 Gene Deletion Predicts for Poor Survival an Non-Response to Therapy With Purine Analogs in Chronic B-Cell Leukemias. *Blood*, 85: 1580-1589, 1995.

24. DÖHNER H, STILGENBAUER S, BENNER A, LEUPOLT E, KRÖBER A, BULLINGER L, DÖHNER K, BENTZ M, LICHTER P. Genomic Aberrations and Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*, 343: 1910-1916, 2000.

25. DÖHNER H, STILGENBAUER S, DÖHNER K, BENTZ M, LICHTER P. Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia: reassessment based on molecular cytogenetic analysis. *J Mol Med*, 77: 266-281, 1999.

26. DÖHNER H, STILGENBAUER S, JAMES MR, BENNER A, WEILGUNI T, BENTZ M, FISCHER K, HUNSTEIN W, LICHTER P. 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood*, 89: 2516-2522, 1997.

27. DONEHOWER LA. Effects of p53 mutation on tumour progression: recent insights from mouse tumour models. *Biochim Biophys Acta*, 1242: 171-176, 1996.

28. DREGER P, MONTSERRAT E. Autologous and allogeneic stem cell transplantation for chronic lymphocatic leukemia. *Leukemia*, 16: 985-992, 2002.

29. DREGER P, STILGENBAUER S, BENNER A, RITGEN M, KRÖBER A, KNEBA M, SCHMITZ N, DÖHNER H. The prognostic impact of autologous stem cell transplantation in patients with chronic lymphocytic leukemia: a risk-matches analysis based on the V_H gene mutational status. *Blood*, 103: 2850-2858, 2004.

30. DU M, PENG H, SINGH N, ISAACSON PG, PAN L. The accumulation of p53 abnormalities is associated with progression of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Blood*, 86: 4587-4593, 1995.

31. EL ROUBY S, THOMAS A, COSTIN D, ROSENBERG CR, POTMESIL M, SILBER R, NEWCOMB W. p53 Gene Mutation in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia Is Associated With Drug Resistance and Is Independent of MDR1/MDR3 Gene Expression. *Blood*, 82: 3452-3459, 1993.

32. ESCUDIER SM, PEREIRA-LEAHY JM, DRACH JW, WEIER HU, GOODACRE AM, CORK MA, TRUJILLO JM, KEATING MJ, ANDREEFF M.

Flourescent in situ hybridization and cytogenetic studies of trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 81: 2702-2707, 1993.

33. ESTEVE J, VILLAMOR N, COLOMER D, CERVANTES F, CAMPO E, CARRERAS E, MONTSERRAT E. Stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia: different outcome after autologous and allogeneic transplantation and correlation with minimal residual disease status. *Leukemia*, 15: 445-451, 2001.
34. FAGUET GB. Chronic Lymphocytic Leukemia: An updated review. *J Clin Oncol*, 12: 1974-1990, 1994.
35. FENAUX P, PREUDHOMME C, LAI JL, QUIQUANDON I, JONVEAUX P, VANRUMBEKE M, SARTIAUX C, MOREL P, LOUCHEUX-LEFEBRE MH, BAUTERS F, BERGER R, KERCKAERT P. Mutations of the p53 Gene in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia: a Report on 39 Cases with Cytogenetic Analysis. *Leukemia*, 6: 246-250, 1992.
36. FRANKEL RH, BAYONA W, KOSLOW M, NEWCOMB EW. p53 Mutations in Human Malignant Gliomas: Comparison of Loss of Heterozygosity with Mutation Frequency. *Cancer Res*, 52: 1427-1433, 1992.
37. FUJII H, BIEL MA, ZHOU W, WEITZMAN SA, BAYLIN SB, GABRIELSON E. Methylation of the *HIC-1* candidate tumor suppressor gene in human breast cancer. *Oncogene*, 16: 2159-2164, 1998.
38. GAIDANO G, BALLERINI P, GONG JZ, INGHIRAMI G, NERI A, NEWCOMB EW, MAGRATH IT, KNOWLES DM, DALLA-FAVERA R. p53 mutations in human lymphoid malignancies: Association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 5413-5417, 1991.
39. GAIDANO G, NEWCOMB EW, GONG JZ, TASSI V, NERI A, CORTELEZZI A, CALORI R, BALDINI L, DALLA-FAVERA R. Analysis of Alterations of Oncogenes and Tumor Suppressor Genes in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Am J Pathol*, 144: 1312-1319, 1994.
40. GALE RP, FOON KA. Biology of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Hematol*, 24: 209-229, 1987.
41. GANDINI D, AGUIARI GL, CUNEO A, PIVA R, CASTOLDI GL, DEL SENNO L. Novel small deletions of the p53 gene in late stage B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*, 88: 881-885, 1994.

42. GATZ SA, WIESMÜLLER L. p53 in recombination and repair. *Cell Death Differ*, 13: 1003-1016, 2006.

43. GEISLER CH, PHILIP P, EGELUND CHRISTENSEN B, HOU-JENSEN K, TINGGAARD PEDERSEN N, MYHRE JENSEN O, THORLING K, ANDERSEN E, BIRGENS HS, DRIVSHOLM A, ELLEGAARD J, LARSEN JK, PLESNER T, BROWN P, KRAGH ANDERSEN P, MORK HANSEN M. In B-cell chronic lymphocytic leukemia chromosome 17 abnormalities and not trisomy 12 are the single most important cytogenetic abnormalities for the prognosis: a cytogenetic and immunophenotypic study of 480 unselected newly diagnosed patients. *Leuk Res*, 21: 1011-1023, 1997.

44. GREENBLATT MS, BENNETT WP, HOLLSTEIN M, HARRIS CC. Mutations in the *p53* Tumor Suppressor Gene: Clues to Cancer Etiology and Molecular Pathogenesis. *Cancer Res*, 54: 4855-4878, 1994.

45. GREVER MR, LUCAS DM, DEWALD GW, NEUBERG DS, REED JC, KITADA S, FLINN IW, TALLMAN MS, APPELBAUM FR, LARSON RA, PAIETTA E, JELINEK DF, GRIBBEN JG, BYRD JC. 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*, 25: 799-804, 2007.

46. GRUSZKA-WESTWOOD AM, HAMOUDI RA, MATUTES E, TUSET E, CATOVSKY D. p53 abnormalities in splenic lymphoma with villous lymphocytes. *Blood*, 97: 3552-3558, 2001.

47. HALLEK M, CHESON BD, CATOVSKY D, CALIGARIS-CAPPIO F, DIGHIERO G, DÖHNER H, HILLMEN P, KEATING MJ, MONTSERRAT E, RAI KR, KIPPS TJ. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop in Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*, 111: 5446-5456, 2008.

48. 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*, 94: 1848-1854, 1999.

49. HARVEY M, VOGEL H, MORRIS D, BRADLEY A, BERNSTEIN A, DONEHOWER LA. A mutant p53 transgene accelerates tumour development in heterozygous but not in nullizygous mice. *Nat Genet*, 9: 305-311, 1995.

50. HAYASHI K. PCR-SSCP: A model for detection of mutations. *Genet Anal Tech Appl*, 9: 73, 1992.

51. HAYASHI K, YANDELL DW. How sensitive is PCR-SSCP? *Hum Mutat*, 2: 338-346, 1993.

52. HILLMEN P, SKOTNICKI AB, ROBAK T, JAKSIC B, DMOSZYNSKA A, WU J, SIRARD C, MAYER J. Alemtuzumab Compared With Chlorambucil As First-Line Therapy for Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Clin Oncol*, 25: 5616-5623.

53. HOLLSTEIN M, SIDRANSKY D, VOGELSTEIN B, HARRIS CC. p53 Mutations in Human Cancers. *Science*, 253: 49-53, 1991.

54. HOWES GP, STEPHENSON J, HUMPHREYS S. Sensitve and reliable PCR and sequencing used to detect p53 point mutations in fine needle aspirates of the breast. *J Clin Pathol*, 49: 570-573, 1996.

55. HUANG J, HU N, GOLDSTEIN AM, EMMERT-BUCK MR, TANG ZZ, ROTH MJ, WANG QH, DAWSEY SM, HAN XY, DING T, LI G, GIFFEN C, TAYLOR PR. High frequency allelic loss on chromosome 17p13.3-p11.1 in esophageal squamous cell carcinoma from a high incidence area in northern China. *Carcinogenesis*, 21: 2019-2026, 2000.

56. HUHN D, VON SCHILLING C, WILHELM M, HO AD, HALLEK M, KUSE R, KNAUF W, RIEDEL U, HINKE A, SROCK S, SERKE S, PESCHEL C, EMMERICH B FOR THE GERMAN CLL STUDY GROUP. Rituximab therapy of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 98: 1326-1331, 2001.

57. IMAMURA J, MIYOSHI I, KOEFFLER HP. p53 in Hematologic Malignancies. *Blood*, 84: 2412-2421, 1994.

58. ISOBE M, EMANUEL BS, GIVOL D, OREN M, CROCE CM. Localization of gene for p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature*, 320: 84-85, 1986.

59. JANUS F, ALBRECHTSEN N, DORNREITER I, WIESMÜLLER L, GROSSE F, DEPPERT W. The dual role model for p53 in maintaining genomic integrity. *Cell Mol Life Sci*, 55: 12-27, 1999.

60. JAYARAMAN L, PRIVES C. Covalent and noncovalent modifiers of the p53 protein. *Cell Mol Life Sci*, 55: 76-87, 1999.

61. JULIUSSON G, MERUP M. Cytogenetics in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Semin Oncol*, 25: 19-26, 1998.

62. KALACHIKOV S, MIGLIAZZA A, CAYANIS E, FRACCHIOLLA NS, BONALDO MF, LAWTON L, JELENC P, YE X, QU X, CHIEN M, HAUPTSCHEIN R, GAIDANO G, VITOLO U, SAGLIO G, RESEGOTTI L, BRODJANSKI V, YANKOVSKY N, ZHANG P, SOARES MB, RUSSO J, EDELMAN IS, EFSTRATIADIS A, DALLA-FAVERA R, FISCHER SG. Cloning and Gene Mapping of the Chromosome 13q14 Region Deleted in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Genomics*, 42: 368-377, 1997.

63. KEATING MJ, FLINN I, JAIN V, BINET JL, HILLMEN P, BYRD J, ALBITAR M, BRETANN L, SANTABARBARA P, WACKER B, RAI KR. Therapeutic role of alemtuzumab (Campath-1H) in patients who have failed fludarabine: results of a large international study. *Blood*, 99: 3554-3561, 2002.

64. KENNEDY B, RAWSTRON A, CARTER C, RYAN M, SPEED K, LUCAS G, HILLMEN P. Campath-1H and fludarabine in combination are highly active in refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 99: 2245-2247, 2002.

65. KHOURI IF, KEATING M, KÖRBLING M, PRZEPIORKA D, ANDERLINI P, O'BRIEN S, GIRALT S, IPPOLITI C, VON WOLFF B, GAJEWSKI J, DONATO M, CLAXTON D, UENO N, ANDERSSON B, GEE A, CHAMPLIN R. Transplant-Lite: Induction of Graft-Versus-Malignancy Using Fludarabine-Based Nonablative Chemotherapy and Allogeneic Blood Progenitor-Cell Transplantation as Treatment for Lymphoid Malignancies. *J Clin Oncol*, 16: 2817-2824, 1998.

66. KNUDSON AG. Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 68: 820-823, 1971.

67. KNUDSON AG. Antioncogenes and human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 10914-10921, 1993.

68. KORN EL. Censoring distributions as a measure of follow-up in survival analysis. *Stat Med*, 5: 255-260, 1986.

69. KRÖBER A, BENNER A, BÜHLER A, DÖHNER H, STILGENBAUER S. Multivariate analysis of specific VH-genes in CLL: V3-21 and V3-23 are

prognostic factors independent of the VH mutation status [abstract]. *Blood*, 100: 196a, 2002.

70. KRÖBER A, SEILER T, BENNER A, BULLINGER L, BRÜCKLE E, LICHTER P, DÖHNER H, STILGENBAUER S. V_H mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 100: 1410-1416, 2002.
71. LANE DP. p53, the guardian of the genome. *Nature*, 358: 15-16, 1992.
72. LENS D, DYER MJS, GARCIA-MARCO JM, DE SCHOUWER PJJC, HAMOUDI RA, JONES D, FARAHAT N, MATUTES E, CATOVSKY D. p53 abnormalities in CLL are associated with excess of prolymphocytes and poor prognosis. *Br J Haematol*, 99: 848-857, 1997.
73. LEPELLEY P, PREUDHOMME C, VANRUMBEKE M, QUESNEL B, COSSON A, FENAUX P. Detection of p53 Mutations in Hematological Malignancies: Comparison Between Immunocytochemistry and DNA Analysis. *Leukemia*, 8: 1342-1349, 1994.
74. LEUPOLT E, STILGENBAUER S, LICHTER P, BENTZ M, DÖHNER H. Sequential FISH-studies in B-CLL reveal clonal evolution with the acquisition of deletions involving 6q21, 11q22 and 17p13 (*TP53*). *Blood*, 94(Suppl.1): 494a, 1999.
75. LEVINE AJ. p53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. *Cell*: 88: 323-331, 1997.
76. LEVINE AJ, HU W, FENG Z. The P53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell Death Differ*, 13: 1027-1036, 2006.
77. LEVINE AJ, MAMAND J, FINLAY CA. The p53 tumor suppressor gene. *Nature*, 351: 453-456, 1991.
78. LIN K, MANOCHA S, HARRIS RJ, MATRAI Z, SHERRINGTON PD, PETTITT AR. High frequency of p53 dysfunction and low level of V_H mutation in chronic lymphocytic leukemia patients using the V_H3-21 gene segment. *Blood*, 102: 1145-1146, 2003.
79. 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*, 100: 1404-1409, 2002.

80. LIU Y, CORCORAN M, RASOOL O, IVANOVA G, IBBOTSON R, GRANDÉR D, IYENGAR A, BARANOVA A, KASHUBA V, MERUP M, WU X, GARDINER A, MULLENBACH R, POLTARAUS A, HULTSTRÖM AL, JULIUSSON G, CHAPMAN R, TILLER M, COTTER F, GAHRTON G, YANKOVSKY N, ZABAROVSKY N, EINHORN S, OSCIER D. Cloning of two candidate tumor suppressor genes within a 10 bk region on chromosome 13q14, frequently deleted in chronic lymphocytic leukemia. *Oncogene*, 15: 2463-2473, 1997.

81. LOWE SW, RULEY HE, JACKS T, HOUSMAN DE. p53-Dependent Apoptosis Modulates the Cytotoxicity of Anticancer Drugs. *Cell*, 74: 957-967, 1993.

82. LOZANSKI G, HEEREMA NA, FLINN IW, HARBISON J, WEBB J, MORAN M, LUCAS M, LIN T, HACKBARTH ML, PROFFITT JH, LUCAS D, GREVER MR, BYRD JC. Alemtuzumab is an effective therapy for chronic lymphocytic leukemia with p53 mutations and deletions. *Blood*, 103: 3278-3281, 2004.

83. LUNDIN J, KIMBY E, BJÖRKHOLM M, BROLIDEN PA, CELSING F, HJALMAR V, MÖLLGARD L, REBELLO P, HALE G, WALDMANN H, MELLSTEDT H, ÖSTERBORG A. Phase II trial of subcutaneous CD52 monoclonal antibody alemtuzumab (Campath-1H) as first-line treatment for patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood*, 100: 768-773, 2002.

84. MEEK DW. Post-translational modification of p53 and the integration of stress signals. *Pathol Biol*, 45: 804-814, 1997.

85. MICHALOVITZ D, HALEVY O, OREN M. p53 Mutations: Gains or Losses? *J Cell Biochem*, 45: 22-29, 1991.

86. MILNER J. Structures and functions of the tumor suppressor p53. *Pathol Biol*, 10: 797-803, 1997.

87. MILNER J, MEDCALF EA. Cotranslation of Activated Mutant p53 with Wild Type Drives the Wild-Type p53 Protein into Mutant Conformation. *Cell*, 65: 765-774, 1991.

88. MINOT GP, ISAACS R. Lympathic Leukemia: Age, incidence, duration and benefit derived from irradiation. *Boston Med Surg J*, 191: 1-9, 1924.

89. MONTSERRAT E. Classical and new prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia: Where to now? *Hematol J*, 3:7-9, 2002.

90. MONTSERRAT E. New Prognostic Markers in CLL. *Hematology Am Soc Hemotol Educ Program:* 279-284, 2006.

91. MURAKAMI Y, HAYASHI K, SEKIJA T. Detection of Aberrations of the p53 Alleles and the Gene Transcript in Human Tumor Cell Lines by Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis. *Cancer Res*, 51: 3356-3361, 1991.

92. NAKAI H, MISAWA S, TOGUCHIDA J, YANDELL DW, ISHIZAKI K. Frequent p53 gene mutations in blast crisis of chronic myelogenous leukemia, especially in myeloid crisis harboring loss of a chromosome 17p. *Cancer Res*, 52: 6588-6593, 1992.

93. NEILSON JR, AUER R, WHITE D, BIENZ N, WATERS JJ, WHITTAKER JA, MILLIGAN DW, FEGAN CD. Deletions at 11q identify a subset of patients with typical CLL who show a consistent disease progression and reduced survival. *Leukemia*, 11: 1929-1932, 1997.

94. NEWCOMB EW, EL ROUBY S, THOMAS A. A Unique Spectrum of p53 Mutations in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia Distinct From That of Other Lymphoid Malignancies. *Mol Carcinog*, 14: 227-232, 1995.

95. OLIVIER M, EELES R, HOLLSTEIN M, KHAN MA, HARRIS CC, HAINAUT P. The IARC TP53 Database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum Mutat*, 19: 607-614, 2002.

96. ORCHARD JA, IBBOTSON RE, DAVIS Z, WIESTNER A, ROSENWALD A, THOMAS PW, HAMBLIN TJ, STAUDT LM, OSCIER DG. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet*, 363: 105-111, 2004.

97. ORITA M, IWAHANA H, KANAZAWA H, HAYASHI K, SEKIJA T. Detection of polymorphisms of human DN by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 2766-2770, 1989.

98. OSCIER DG, GARDINER AC, MOULD SJ, GLIDE S, DAVIS ZA, IBBOTSON RE, CORCORAN MM, CHAPMAN RM, THOMAS PW, COPPLESTONE JA, ORCHARD JA, HAMBLIN TJ. Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, *IGVH* gene mutational status, and loss or mutation of the *p53* gene are independent prognostic factors. *Blood*, 100: 1177-1184, 2002.

99. PANASCI L, PAIEMENT JP, CHRISTODOULOPOULOS G, BELENKOV A, MALAPETSA A, ALOYZ R. Chlorambucil Drug Resistance in Chronic Lymphocytic Leukemia: The Emerging Role of DNA Repair. *Clin Cancer Res*, 7: 454-461, 2001.

100. PETTITT AR, MATUTES E, OSCIER D. Alemtuzumab in combination with high-dose methylprednisolone is a logical, feasible, and highly active therapeutic regimen in chronic lymphatic leukemia patients with p53 defects. *Leukemia*, 20: 1441-1445, 2006.

101. PETTITT AR, SHERRINGTON PD, CAWLEY JC. The effect of p53 dysfunction on purine analogue cytotoxicity in chronic lymphocytic leukemia. *Br J Haematol*, 106: 1049-1051, 1999.

102. PREUDHOMME C, FENAUX P. The clinical significance of mutations of the p53 tumour suppressor gene in haematological malignancies. *Br J Haematol*, 98: 502-511, 1997.

103. PROKOCIMER M, ROTTER V. Structure and Function of p53 in Normal Cells and Their Aberrations in Cancer Cells: Projection on the Hematologic Cell Lineages. *Blood*, 84: 2391-2411, 1994.

104. RAI KR, DÖHNER H, KEATING MJ, MONTSERRAT E. Chronic Lymphocytic Leukemia: Case-Based Session. *Hematology Am Soc Hemat Educ Program*, 1: 140-156, 2001.

105. RAI KR, SAWITSKY A, CRONKITE EP, CHANANA AD, LEVY RN, PASTERNACK BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 46: 219-234, 1975.

106. REED JC. Molecular Biology of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Semin Oncol*, 25: 11-18, 1998.

107. ROZMAN C, MONTSERRAT E. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 333: 1052-1057, 1995.

108. SAIKI RK, SCHARF S, FALOONA F, MULLIS KB, HORN GT, ERLICH HA, ARNHEIM N. Enzymatic Amplifikation of beta-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science*, 230: 1350-1354, 1985.

109. SAIKI RK, GELFAND FH, STOFFEL S, SCHARF SJ, HIGUCHI R, HORN GT, MULLIS KB, ERLICH HA. Primer-Directed Enzymatic Amplifikation of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science*, 239: 487-491, 1988.

110. SANGER F, NICKLEN S, COULSEN AR. DNA sequencing with terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74: 5463-5467, 1977.

111. SCHAFFNER C, STILGENBAUER S, RAPPOLD GA, DÖHNER H, LICHTER P. Somatic *ATM* Mutations Indicate a Pathogenetic Role of ATM in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*, 94: 748-753, 1999.

112. SIDRANSKY D, MIKKELSEN T, SCHWECHHEIMER K, ROSENBLUM ML, CAVANEE W, VOGELSTEIN B. Clonal expansion of p53 mutant cells is associated with brain tumour progression. *Nature*, 355: 846-847, 1992.

113. SIGAL A, ROTTER V. Oncogenic Mutations of the p53 Tumor Suppressor: The Demons of the Guardian of the Genome. *Cancer Res*, 60: 6788-6793, 2000.

114. SOUSSI T, LEGROS Y, LUBIN R, ORY K, SCHLICHTHOLZ B. Multifactorial analysis of p53 alteration in human cancer: a review. *Int J Cancer*, 57: 1-9, 1994.

115. SOUSSI T, MAY P. Structural Aspects of the p53 Protein in Relation to Gene Evolution: A Second Look. *J Mol Biol*, 260: 623-637, 1996.

116. SPIER CM, KJELDBERG CR, HEAD DR. Chronic lymphocytic leukemia in young adults. *Am J Clin Pathol*, 84: 675-678, 1985.

117. STILGENBAUER S, DÖHNER H. Campath-1H-Induced Complete Remission of Chronic Lymphocytic Leukemia despite p53 Gene Mutation and Resistance to Chemotherapy. *N Engl J Med*, 347: 452-453, 2002.

118. STILGENBAUER S, NICKOLENKO J, WILHELM J, WOLF S, WEITZ S, DÖHNER K, BOEHM T, DÖHNER H, LICHTER P. Expressed sequences as candidates for a novel tumor suppressor gene at band 13q14 in B-cell chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma. *Oncogene*, 16: 1891-1897, 1998.

119. STILGENBAUER S, SCHERER K, KRÖBER A, BULLINGER L, HÖCHSMANN B, MAYER-STEINACKER R, BUNJES D, DÖHNER H. Campath-1H in Refractory B-CLL – Complete Remission Despite p53 Gene Mutation. *Blood* 100: 11, 2002.

120. STILGENBAUER S, WINKLER D, BÜHLER A, ZENZ T, GRONER S, BUSCH R, HENSEL M, DÜHRSEN U, FINKE J, DREGER P, JÄGER U, LENGFELDER E, TRÜMPER L, SÖLING U, SCHLAG R, HALLEK M, DÖHNER H. Subcutaneous Alemtuzumab (MabCampath) in Fludarabine-Refractory CLL (CLL2H Trial of the GCLLSG). *Blood,* 110: 3120, 2007.

121. THORNTON PD, GRUSZKA-WESTWOOD AM, HAMOUDI RA, ATKINSON S, KACZMAREK P, MORILLA RM, HILDITCH BL, A`HERN R, MATUTES E, CATOVSKY D. Characterisation of *TP53* abnormalities in chronic lymphocytic leukaemia. *Hematol J*, 5: 47-54, 2004.

122. TOBIN G, THUNBERG U, JOHNSON A, THÖRN I, SÖDERBERG O, HULTDIN M, BOTLING J, ENBLAD G, SÄLLSTRÖM, SUNDSTRÖM C; ROOS G, ROSENQUIST R. Somatically mutated Ig V_H3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia. *Blood,* 99: 2262-2264, 2002.

123. VOUSDEN KH, LU X. Live or let die: The cell's response to p53. *Nature*, 2: 594-604, 2002.

124. WADA H, ASADA M, NAKAZAWA S, ITOH H, KOBAYASHI Y, INOUE T, FUKUMURO K, CHON CHAN L, SUGITA K, HANADA R, AKUTA N, KOBAYASHI N, MIZUTANI S. Clonal Expansion pf p53 Mutant Cells in Leukemia Progression In Vitro. *Leukemia,* 8: 53-59, 1994.

125. WATTEL E, PREUDHOMME C, HECQUET B, VANRUMBEKE M, QUESNEL B, DERVITE I, MOREL P, FENAUX P. p53 Mutations Are Associated With Resistance to Chemotherapy and Short Survival in Hematologic Malignancies. *Blood*, 84: 3148-3157, 1994.

126. WEBER KJ, WENZ F. p53, Apoptosis and Radiosensitivity – Experimental and Clinical Data. *Onkologie*, 25: 136-141, 2002.

127. WIESTNER A, ROSENWALD A, BARRY TS, WRIGHT G, DAVIS E, HENRICKSON SE, ZHAO H, IBBOTSON RE, ORCHARD JA, DAVIS Z, STETLER-STEVENSON M, RAFFELD M, ARTHUR DC, MARTI GE, WILSON WH, HAMBLIN TJ, OSCIER DG, STAUDT LM. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood*, 101; 4944-4951, 2003.

128. YUAN B, THOMAS JP, VON KODOLITSCH Y, PYERITZ RE. Comparison of Heteroduplex Analysis, Direct Sequencing, and Enzyme Mismatch Cleavage for Detecting Mutations in a Large Gene, FBN1. *Hum Mutat*, 14: 440-446, 1999.

129. ZENZ T, KRÖBER A, SCHERER K, HÄBE S, BÜHLER A, BENNER A, DENZEL T, WINKLER D, EDELMANN J, SCHWÄNEN C, DÖHNER H, STILGENBAUER S. Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long term follow-up. *Blood*, 112: 3322-3329, 2008.

130. ZENZ T, BENNER A, DÖHNER H, STILGENBAUER S. Chronic lymphocytic leukemia and treatment resistance in cancer. *Cell Cycle*, 7: 3810-3814, 2008.

131. ZWIEBEL JA, CHESON BD. Chronic Lymphocytic Leukemia: Staging and Prognostic Factors. *Semin Oncol*, 25: 42-59, 1998.

7. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. H. Döhner, Ärztlicher Direktor der Klinik für Innere Medizin III der Universität Ulm, danke ich für die Überlassung des Themas und die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen.

Herrn Prof. Dr. med. Stephan Stilgenbauer, Oberarzt an der Klinik für Innere Medizin III, danke ich für die Hilfe bei der Einarbeitung in die umfangreiche Problematik und die engagierte Unterstützung.

Herrn Dr. med. Alexander Kröber danke ich für die Hilfe und Unterstützung bei der praktischen Durchführung der Arbeit.

Allen Mitarbeitern im Labor von Herrn Prof. Dr. med. H. Döhner möchte ich für die gute Zusammenarbeit, ihre Hilfsbereitschaft und die schöne Zeit danken.