

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

**Prognostische Bedeutung von
TP53-Mutationen beim Mantelzell-Lymphom**

Dissertation

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

vorgelegt von

Maria Theresia Heuberger
aus München

2012

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

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Thorsten Zenz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Wolfgang Kratzer

Tag der Promotion: 15.11.2013

„Inmitten der Schwierigkeiten liegt die Möglichkeit.“

Albert Einstein

FÜR MEINE FAMILIE

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Das Mantelzell-Lymphom (MCL).....	1
1.2 Das Tumorsuppressorgen <i>TP53</i>	10
1.3 Fragestellung der Arbeit.....	16
2 Material und Methoden	17
2.1 Material	17
2.2 Methoden.....	20
3 Ergebnisse.....	30
3.1 Inzidenz von <i>TP53</i> -Mutationen, 17p13-Deletionen, 9p21-Deletionen und 13q14-Deletionen.....	30
3.2 Verteilung und Art der <i>TP53</i> -Aberrationen.....	31
3.3 Prognostische Bedeutung von <i>TP53</i> -Aberrationen	33
3.4 Prognostische Bedeutung chromosomaler Aberrationen	35
3.5 Assoziation von <i>TP53</i> -Aberrationen mit chromosomalen Aberrationen ...	36
3.6 Bedeutung anderer prognostischer Faktoren.....	37
3.7 Multivariates Modell	38
4 Diskussion.....	40
4.1 Inzidenz von <i>TP53</i> -Mutationen, 17p13-Deletionen, 9p21-Deletionen und 13q14-Deletionen.....	40
4.2 Verteilung und Art der <i>TP53</i> -Aberrationen.....	41
4.3 Prognostische Bedeutung von <i>TP53</i> -Aberrationen	42
4.4 Prognostische Bedeutung chromosomaler Aberrationen	45
4.5 Assoziation von <i>TP53</i> -Aberrationen mit chromosomalen Aberrationen ...	48
4.6 Schlussfolgerung und Ausblick	48

5	Zusammenfassung	50
6	Literaturverzeichnis	i
	Anhang	ix
	Abbildungsverzeichnis	ix
	Tabellenverzeichnis	x
	Veröffentlichungen	xi
	Vielen Dank	xii
	Lebenslauf	xiii

Abkürzungsverzeichnis

14-3-3σ	14-3-3-sigma
17-AAG	17-N-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin (engl.)
μl	Mikroliter
∞	Lemniskate, hier: beliebig lang
A	Adenin
AKT	Eigenname einer Serin-/ Threoninproteinkinase
AraC	Zytarabin
ARF	Alternative reading frame (engl.)
AS	Aminosäure
ASCT	Autologous stem cell transplantation (engl.)
ASPM	Abnormal spindle-like microcephaly-associated (engl.)
ATM	Ataxia-teleangiectasia mutated (engl.)
ATR	Ataxia-teleangiectasia and Rad3 related (engl.)
AZ	Allgemeinzustand
BAX	BCL2-associated X (engl.)
BCL	B-cell CLL/lymphoma (engl.)
BH3	BCL-2 homology 3 (engl.)
BMI1	B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog (engl.)
bp	Basenpaar(e)
C	Cytosin
CAL	Eigenname eines Medikaments
CCND1	Cyclin D1
CD	Cluster of differentiation (engl.)
CDK	Cyclin dependent kinase (engl.)
CDKI	CDK inhibitor (engl.)
CDKN2A	Cycline-dependent kinase inhibitor 2A (engl.)
CGH	Comparative genomic hybridization (engl.)
CHK	Cell cycle checkpoint kinase (engl.)
CHOP	Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednisolon
CKAP2	Cytoskeleton associated protein 2 (engl.)
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
coef	Koeffizient
CpG	Cytosine – phosphate – guanine (engl.)
CR	Complete remission (engl.)
CT	C-terminale Domäne
CVAD	Cyclophosphamide, vincristine, adriamycin (doxorubicin), dexamethasone (engl.)
CYCLE	Zyklus
Cyclin D1, E2	Eigenname eines Proteins des Zellzyklus
D1	Cyclin D1
DBD	DNA-Bindungsdomäne
ddNTP	Didesoxyribonukleosid-triphosphate (engl.)
Del	Deletion
DHPLC	Denaturing high performance liquid chromatography (engl.)
DLBCL	Diffuses großes B-Zell-Lymphom
DNA	Deoxyribonucleic acid (engl.)
dNTP	Desoxyribonukleosid-triphosphate (engl.)
E2F	Eigenname eines Transkriptionsfaktors

ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group (engl.)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (engl.)
exp (coef)	Hazard ratio (engl.)
FC	Fludarabine, cyclophosphamide (engl.)
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
for	Forward (engl.)
fs	Frame shift (engl.)
g/dl	Gramm pro Deziliter
G	Guanin
G1, G2	Phasen des Zellzyklus
GADD 45	Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 (engl.)
H₂O dest.	destilliertes Wasser
HDAC	Histone deacetylase (engl.)
HIC1	Hypermethylated in cancer 1 (engl.)
HOLD	Halten, hier: Temperatur halten
HSP	Heat shock protein (engl.)
Hyper-CVAD	Hyper-fractionated CVAD (engl.)
IGH	Immunoglobulin heavy chain (engl.)
IGHV	Immunoglobulin heavy chain variable region (engl.)
IMID	Immunomodulatory drug (engl.)
INK4a	Inhibitor of kinase 4 (engl.)
ins	Insertion
IPI	International Prognostic Index (engl.)
Ki-67	Eigenname eines Proteins, das nur während aktiver Zellzyklusphasen nachzuweisen ist
L	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
M	Phase des Zellzyklus
MCGH	Matrix CGH (engl.)
MCL	Mantelzell-Lymphom
MDM2	Murine double minute 2 (engl.)
MDR1	Multidrug resistance 1 (engl.)
MgCl₂	Magnesiumchlorid
MgSO₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
MIPI	MCL International Prognostic Index (engl.)
MIPIb	Combined biological MIPI (engl.)
miR	MicroRNA
ml	Milliliter
mmol	Millimol
mRNA	Messenger ribonucleic acid (engl.)
MTAP	Methylthioadenosinphosphorylase
mTOR	Mammalian target of rapamycin (engl.)
Mut	Mutation
mV	Millivolt
MYC	Eigenname eines Protoonkogens / Transkriptionsfaktors
n	Anzahl
n.a.	Nicht auswertbar
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom

NLS	Nuclear localization signal (engl.)
nm	Nanometer
NOXA	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase activator (engl.)
NTP	Nukleotidtriphosphat
ORR	Overall response rate (engl.)
OS	Overall survival (engl.)
p	Kurzer Arm eines Chromosoms (innerhalb von Zahlen)/p-Wert
p-Wert	Überschreitungswahrscheinlichkeit, Signifikanzwert
p14_{ARF}	Proper name of a gene / CDKI (engl.)
p16_{INK4a}	Proper name of a gene / CDKI (engl.)
p21	CDKI 1A (engl.)
p53	Eigenname eines Tumorsuppressorproteins
p63/73	Eigenamen von Proteinen, die p53 ähneln
PCR	Polymerase chain reaction (engl.)
PD	Progressive disease (engl.)
q	Langer Arm eines Chromosoms
rev	Reverse (engl.)
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase (engl.)
PaR	Partial remission (engl.)
PR	Prolinreiche Domäne
PUMA	P53 upregulated modulator of apoptosis (engl.)
pUPD	Partielle uniparentale Disomie
R	Rituximab
RB1	Retinoblastoma 1 (engl.)
Reg	Regulatorische Domäne
RI	Radioimmuntherapie
RNA	Ribonucleic acid (engl.)
S	Phase des Zellzyklus
SCT	Stem cell transplantation (engl.)
SD	Stable disease (engl.)
sec	Sekunde
SIRT-1	Sirtuin-1
SOX11	Sex determining region Y (SRY)-box 11 (engl.)
t	Translokation
T	Thymin
TA	Transaktivierungsdomäne
TAE	Tris-acetate EDTA (engl.)
TE	Tris-EDTA (engl.)
TET	Tetramerisierungsdomäne
Temp.	Temperatur
TP53	Eigenname eines Tumorsuppressorgens
TRANS	Transaktivierungsdomäne
U/min	Umdrehungen pro Minute
ULN	Upper limit of normal (engl.)
vs.	Versus
WBCs	White blood cells (engl.)
WHO	World Health Organization (engl.)
WT	Wildtyp

Gene werden *kursiv* geschrieben.

1 Einleitung

1.1 Das Mantelzell-Lymphom (MCL)

1.1.1 Geschichte, Definition und Epidemiologie des MCL

Erstmals wurde das Mantelzell-Lymphom (MCL) 1974 aufgrund der Ähnlichkeit der Tumorzellen mit Zentrozyten als zentrozytisches Lymphom beschrieben (Gerard-Marchant et al. 1974). Zwischenzeitlich als diffuses Germinozytom bezeichnet (Lennert et al. 1975), wird seit 1992 der Begriff Mantelzell-Lymphom verwendet (Banks et al. 1992). Das MCL gehört nach der WHO-Klassifikation (World Health Organization) zu den reifen B-Zell-Neoplasien unter den Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL). Charakteristisch für das MCL ist sein Immunphänotyp sowie die Translokation $t(11;14)(q13;q32)$, die zu einer Cyclin D1-Überexpression führt. Mit einer Inzidenz von 2/100.000/Jahr ist das MCL selten und macht ca. 5% aller NHL aus (Herold 2012). Das MCL tritt insbesondere bei älteren Menschen auf (zwischen 29 und 85 Jahren, durchschnittlich mit 60 Jahren), Männer sind mindestens doppelt so häufig betroffen wie Frauen (Swerdlow et al. 2008).

1.1.2 Morphologie, Immunphänotyp und Ursprung des MCL

Zytologisch wird die klassische Variante (80-90%) von der blastoiden (10-20%) und der pleomorphen (selten) unterschieden (Jares und Campo 2008). Das klassische MCL zeichnet sich durch kleine bis mittelgroße Lymphozyten mit irregulären Kernen, feinem Chromatin und winzigen bis fehlenden Nukleoli aus; Zentroblasten, Paraimmunoblasten und Proliferationszentren fehlen im Gegensatz zum follikulären Lymphom und zur chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) (Swerdlow et al. 2008, Lennert et al. 1975). Das blastoide MCL ähnelt Lymphoblasten und zeigt runde Kerne, das pleomorphe MCL besitzt oft große Zellen mit irregulären und pleomorphen Kernen (Swerdlow et al. 2008, Jares et al. 2007). Die blastoide sowie die pleomorphe Variante weisen höhere Proliferationsraten, komplexe Karyotypen und eine aggressivere Klinik auf (Jares et al. 2007).

Immunhistologisch exprimieren MCL-Zellen neben B-Zell Markern wie CD20 (cluster of differentiation), CD22 oder CD79 meist auch CD5 (Jares et al. 2007). Eine CD5-Expression kommt unter den reifen B-Zell-Lymphomen sonst nur bei der CLL und selten beim diffusen großen B-Zell-Lymphom (DLBCL) vor (Swerdlow et al. 2008). Von der CLL lässt sich das MCL durch die fehlende CD23-Expression, vom folliculären Lymphom durch die Expression von CD10 und BCL6 (B-cell CLL/lymphoma 6) unterscheiden (Swerdlow et al. 2008).

Es gibt Hinweise darauf, dass das MCL eine heterogene Erkrankung ist, die ihren Ursprung aus verschiedenen B-Zell-Stadien nimmt. Der Phänotyp der meisten Tumorzellen sowie deren topographische Verteilung entsprechen einer kleinen Population naiver B-Zellen, den CD5-positiven B-Lymphozyten, die zwischen peripherem Blut, primären lymphoiden Follikeln und folliculären Mantelzonen zirkulieren (Dono et al. 2004, Swerdlow et al. 2008). 15% bis 40% der MCL-Fälle zeigen dagegen somatische Hypermutationen des *IGHV*-Gens (immunoglobulin heavy chain variable region), was auf B-Zellen aus dem folliculären Keimzentrum hindeutet, die bereits Antigenkontakt hatten (Jares und Campo 2008).

1.1.3 Klinik, Krankheitsstadien und Prognose des MCL

Das klinische Bild des MCL wird durch schmerzlose, persistierende oder progrediente Lymphknotenvergrößerungen (90%) und Splenomegalie (55%) bestimmt (Swerdlow und Williams 2002). Des Weiteren häufig betroffen sind Knochenmark (75%), Leber (35%), Blut (25%), Gastrointestinaltrakt (15%) und der Waldeyer'sche Rachenring (10%) (Swerdlow und Williams 2002). Eingeteilt wird das MCL in Stadien nach Ann Arbor (s. Tabelle 1). Die meisten Patienten sind bei Diagnosestellung bereits in einem fortgeschrittenen Stadium (Stadium III/IV) mit generalisierter Lymphadenopathie (Swerdlow et al. 2008).

Frühere Untersuchungen geben mittlere Überlebenszeiten für das MCL von drei bis vier Jahren an, aktuelle Studien gehen von fünf bis sieben Jahren aus (Pérez-Galán et al. 2011). Diese Verbesserung der mittleren Überlebenszeit könnte auf dosisintensivierte Therapieregime sowie auf effektivere „salvage“-Therapien zurückzuführen sein (Pérez-Galán et al. 2011). Trotzdem besitzt das MCL immer noch eine der ungünstigsten Langzeitprognosen unter den NHL (Herold 2012). Der klinische Verlauf kann sehr unterschiedlich sein mit individuellen Überlebenszeiten von einigen Monaten bis zu über zehn Jahren (Jares et al.

2007). Obwohl konventionelle Chemotherapien hohe Remissionsraten in unbehandelten Patienten erzielen, sind Rückfälle innerhalb weniger Jahre häufig (Pérez-Galán et al. 2011).

Tabelle 1: Stadieneinteilung für maligne Lymphome nach Ann Arbor

Abkürzungen: *E* = extranodaler Befall, *N* = nodaler Befall

Nach Carbone et al. 1971, Herold 2012.

Stadium	Befallsmuster
I	1 Lymphknotenregion <i>oder</i> 1 extranodaler Herd
II	≥ 2 Lymphknotenregionen auf einer Zwerchfellseite <i>oder</i> lokalisierte extranodale Herde und ≥ 1 Lymphknotenregion auf einer Zwerchfellseite
III	≥ 2 Lymphknotenregionen auf beiden Zwerchfellseiten <i>oder</i> lokalisierte extranodale Herde und Lymphknoten (III/E <i>oder</i> III/N/E)
III1	Subphrenisch, beschränkt auf Milz, zöliakale und/oder portale Lymphknoten allein <i>oder</i> gemeinsam
III2	Subphrenisch mit paraaortalen, mesenterialen, iliakalen und/oder inguinalen Lymphknoten allein <i>oder</i> gemeinsam
IV	Disseminierter Befall von ≥ 1 extralymphatischen Organ mit <i>oder</i> ohne Lymphknoten

1.1.4 Diagnose des MCL

Für die Diagnose eines MCL ist die Kombination aus Morphologie, Immunphänotyp und genomischen Charakteristika wichtig, da kein einzelner spezifischer Marker vorhanden ist (Swerdlow und Williams 2002). Die Expression von SOX11 (sex determining region Y box 11) könnte zukünftig einen Marker, insbesondere für das Cyclin D1-negative MCL, darstellen (Mozos et al. 2009).

1.1.5 Therapie des MCL

Das MCL ist, mit Ausnahme einer allogenen Stammzelltransplantation, nicht heilbar (Williams et al. 2011). Es ist keine Standardtherapie vorhanden (Williams et al. 2011). Gängige Therapiekonzepte sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Aktuell wird bei Patienten unter 65 Jahren eine hochdosierte Immunchemotherapie, beispielsweise R-CHOP (Rituximab, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednisolon) mit nachfolgender myeloablativer Therapie und autologer Stammzellentransplantation favorisiert (Dreyling et al. 2009). Bei Patienten über 65 Jahren wird z.B. R-CHOP mit Rituximab-Erhaltung eingesetzt (Dreyling et al. 2009).

Tabelle 2: Therapie des Mantelzell-Lymphoms

Ein Pfeil bedeutet nachfolgende Therapie, Therapien mit Fragezeichen sind umstritten.
 Abkürzungen (engl.): ASCT = autologous stem cell transplant, AZ = Allgemeinzustand (deutsch),
 CHOP = cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisolone, CVAD = cyclophosphamide,
 vincristine, adriamycin (doxorubicin), dexamethasone, FC = fludarabine, cyclophosphamide,
 Hyper-CVAD = hyper-fractionated CVAD, R = rituximab, RI = radioimmunotherapy, SCT = stem
 cell transplantation

Angelehnt an eine Abbildung nach Dreyling et al. 2009.

Patient ≤ 65 Jahre	Patient > 65 Jahre	Patient in schlechtem AZ
„First line“ Therapie		
Dosisintensivierte Immunchemotherapie, z.B. • R-CHOP → ASCT • R-Hyper-CVAD	Konventionelle Immunchemotherapie, z.B. R-CHOP → R? RI?	Immunchemotherapie • R-Monotherapie • Chlorambucil • Bendamustin
1. Rückfall		
Immunchemotherapie, z.B. R-FC → allogene SCT? R? RI?	Immunchemotherapie, z.B. • R-FC • R-Bendamustin → Molekulare Therapie? R? ASCT? RI?	• Immunchemotherapie, z.B. R-Bendamustin • Molekulare Therapie
> 1 Rückfall		
Molekulare Therapie / Wiederholung der zeitweise erfolgreichen Therapie		

Tabelle 3: Neue Therapieansätze (molekulare Therapie) in klinischer Entwicklung beim Mantelzell-Lymphom

Abkürzungen (engl.): 17-AAG = 17-N-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin, AKT = proper name of a serine/threonine protein kinase, BCL = b-cell CLL/lymphoma, BH3 = BCL-2 homology 3, CAL = proper name, CDK = cyclin-dependent kinase, CR = complete remission, HDAC = histone deacetylase, HSP = heat shock protein, IMID = immunomodulatory drug, mTOR = mammalian target of rapamycin, ORR = overall response rate, p53 = proper name of a tumor suppressor protein, PaR = partial remission, PI3K = phosphoinositide 3-kinase, RNA = ribonucleic acid, SD = stable disease

Angelehnt an eine Tabelle aus Pérez-Galán et al. 2011.

Medikamentenklasse	Wirkungsweise	Beispiel (Studienphase)
Proteasom-inhibitor	Apoptose, Zellzyklusarrest	Bortezomib (II): ORR 33-58% bei Rückfall / refraktärem MCL
CDK-Inhibitor	CDK-Inhibition, verminderte RNA-Stabilität	Flavopiridol (II): minimale Wirkung
PI3K- / AKT-Inhibitor	Apoptose, Zellzyklusarrest, Inaktivierung von AKT/mTOR, p53-Aktivierung	CAL-101 (I): PaR in 6/7 Patienten
mTOR-Inhibitor	Zellzyklusarrest	Temsirolimus (III): ORR 30-40% bei Rückfall
BH3-Mimetika	Inhibition von antiapoptotischen Mitgliedern der BCL2 Familie	Obatoclax (II)
IMID	Veränderung von Immunantwort, Mikroumgebung oder direkter Effekt auf Tumorzellen	Lenalidomid (II): ORR 42-53%, CR 20%
HDAC-Inhibitor	Apoptose, Zellzyklusarrest	Vorinostat (II)
HSP90-Inhibitor	Apoptose, Zellzyklusarrest, vermindertes Cyclin D1	17-AAG (II): meist SD

Es gibt Hinweise darauf, dass eine frühe Induktion mit Zytarabin (AraC) die Remissionsrate, insbesondere bei jungen Patienten, positiv beeinflusst (Geisler 2010). Einige neue Therapieansätze, die unter anderem den Signalweg PI3K/AKT/mTOR (phosphoinositide 3-kinase/Eigenname/mammalian target of rapamycin) betreffen, sind in Tabelle 3 dargestellt. Hiervon sind Proteasominhibitoren, mTOR-Inhibitoren und Lenalidomid derzeit für die Behandlung von MCL-Rückfällen verfügbar (Pérez-Galán et al. 2011).

1.1.6 Zytogenetik des MCL

Die Translokation $t(11;14)(q13;q32)$ und die daraus resultierende Cyclin D1-Überexpression sind für das MCL typisch, aber nicht spezifisch (Swerdlow und Williams 2002). Die Translokation $t(11;14)(q13;q32)$ betrifft zum einen den Immunglobulinschwerkettenlocus (IGH) auf Chromosom 14q32, zum anderen eine Region auf der Chromosomenbande 11q13. Diese Region wurde stellvertretend für ein dort postuliertes Protoonkogen zunächst *BCL1* (B-cell CLL/lymphoma 1), später *CCND1* (Cyclin D1) genannt. Das Protoonkogen *CCND1* kommt durch die Translokation unter den Einfluss des IGH-Promotors, das codierte Protein Cyclin D1 wird überexprimiert (Swerdlow et al. 2008).

Cyclin D1 spielt bei der Zellzyklusregulation eine wichtige Rolle. Es bildet zusammen mit Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) wie CDK4 und CDK6 einen aktiven Komplex, der eine Promotion der G1- in die S-Phase durch Phosphorylierung des Retinoblastomproteins und damit Freisetzung von Transkriptionsfaktoren wie E2F (Eigenname) bewirkt (Sherr 1996). Gehemmt wird der Cyclin D1/CDK4-Komplex durch das Tumorsuppressorprotein p53 (Eigenname) sowie durch Cyclin-abhängige Kinaseinhibitoren (CKI) wie p16^{INK4a} (Eigenname) (Hirama und Koeffler 1995). Abbildung 1 zeigt eine Übersicht der Mechanismen, die beim MCL zur Zellzyklusdysregulation beitragen.

Wenige Fälle (< 5%) weisen keine Translokation $t(11;14)(q13;q32)$ auf, sind aber morphologisch, phänotypisch und bezüglich des Expressionsprofils sowie der sekundären Aberrationen nicht vom MCL zu unterscheiden (Katzenberger et al. 2008). Interessanterweise exprimieren diese Patienten vermehrt Cyclin D2 oder Cyclin D3 und ihr Überleben ist nicht verändert (Rosenwald et al. 2003).

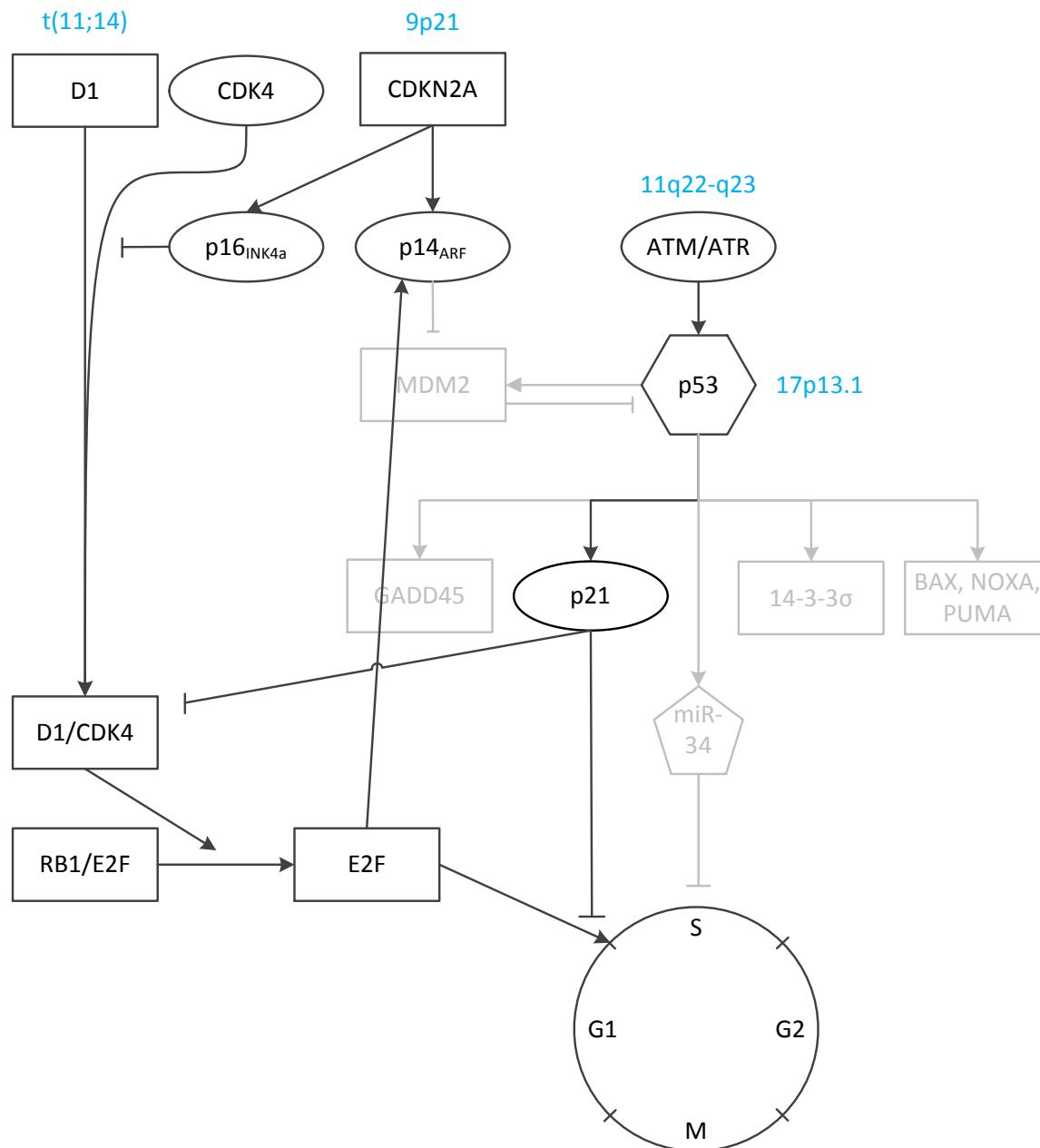


Abbildung 1: Dysregulation des Zellzyklus beim Mantelzell-Lymphom

Die Translokation t(11;14)(q13;q32) führt zu einer Überexpression von Cyclin D1. Cyclin D1/CDK4-Komplexe inaktivieren RB1 durch Hyperphosphorylierung. Dadurch wird E2F freigesetzt und führt zu einer G1/S-Phasentransition. Eine mögliche homozygote Deletion des *CDKN2A*-Locus auf Chromosom 9p21 führt über p16^{INK4a} zu einer hohen Konzentration an Cyclin D1/CDK4-Komplexen sowie über p14^{ARF} zu einer erhöhten p53-Degradierung. Blau markiert sind die Chromosomen-Loci der Proteine sowie die t(11;14). Kinasen sind eingekreist. Nicht direkt betroffene Teile des p53-Signalwegs sind grau eingezeichnet; diese werden mit Abkürzungen in Abbildung 4 in Kapitel 1.2.3. beschrieben.

Abkürzungen (engl.): *ATM* = ataxia-telangiectasia mutated, *ATR* = ataxia-telangiectasia and Rad3 related, *CDK* = cyclin-dependent kinase, *CDKN2A* = cycline-dependent kinase inhibitor 2A, *D1* = cycline D1, *E2F* = proper name of a transcription factor, *p14^{ARF}* = proper name of a CDK inhibitor, *p16^{INK4a}* = proper name of a CDK inhibitor, *p21* = CDKI 1A, *p53* = proper name of a tumor suppressor protein, *RB1* = retinoblastoma 1, *t(11;14)* = t(11;14)(q13;q32), G1, S, G2, M = stages of the cell cycle

Angelehnt an Abbildungen nach Bullock und Fersht 2001, He et al. 2007, Jares et al. 2007, Swerdlow et al. 2008 und Huber 2012.

1.1.7 Pathogenese des MCL

Obwohl die $t(11;14)(q13;q32)$ als wichtiges genetisches Ereignis für das MCL angesehen wird, reicht sie alleine für die Entstehung der Erkrankung nicht aus. So können geringe Konzentrationen von Zellen mit einer $t(11;14)(q13;q32)$ im Blut von ca. 1% der Bevölkerung ohne Krankheitsanzeichen festgestellt werden (Hirt et al. 2004). In einem transgenen Mausmodell waren für das Auftreten eines B-Zell-Lymphoms noch weitere Aberrationen, z.B. eine Alteration des *MYC*-Gens (Eigenname) nötig (Lovec et al. 1994). In einem anderen Modell entwickelten Mäuse mit einer nicht aus dem Nukleus exportierbaren Cyclin D1-Mutante reife B-Zell-Lymphome, die Alterationen im p53-MDM2-ARF-Signalweg (Murine double minute, alternative reading frame) und eine BCL2-Überexpression (B-cell CLL/lymphoma 2) aufwiesen (Gladden et al. 2006). Der Mechanismus, der neben der erhöhten Cyclin D1-Expression in der Pathogenese des MCL eine Rolle spielt, ist nicht abschließend geklärt. Ein mögliches Modell zeigt Abbildung 2.

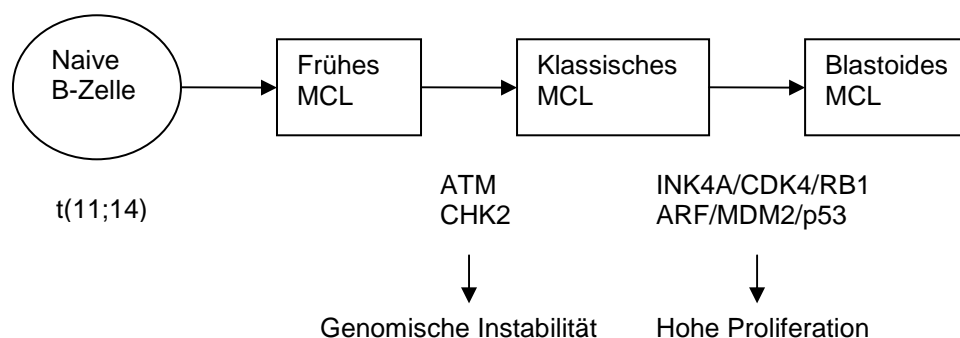


Abbildung 2: Modell für die molekulare Pathogenese und Progression des MCL

Die Translokation $t(11;14)(q13;q32)$ entsteht in unreifen B-Zellen. Erworbene Inaktivierungen des DNA-Reparaturwegs (z.B. *ATM*-Aberrationen) können weitere genetische Veränderungen sowie die Entstehung des klassischen MCLs erleichtern. Weitere Aberrationen (z.B. Aberrationen des Tumorsuppressorgens *TP53*) können u.a. Gene des Zellzyklus betreffen und zu hoher Proliferation und Aggressivität führen.

Abkürzungen (engl): *ATM* = *ataxia-telangiectasia mutated*, *ARF* = *alternative reading frame*, *CDK4* = *cyclin-dependent kinase 4*, *CHK2* = *cell cycle checkpoint kinase 2*, *INK4A* = *inhibitor of kinase 4*, *MCL* = *mantle cell lymphoma*, *MDM2* = *murine double minute 2*, *p53* = *proper name of a tumor suppressor protein*, *RB1* = *retinoblastoma 1*

Angelehnt an eine Abbildung nach Jares et al. 2007.

ATM-Mutationen (*ataxia-telangiectasia mutated*) werden, im Gegensatz zu ihrem seltenen Vorkommen bei anderen B-Zell-Lymphomen, in 40% bis 75% der Fälle beim MCL entdeckt (Fernández et al. 2005). Obwohl *ATM*-Mutationen mit einer erhöhten Anzahl chromosomaler Alterationen assoziiert sind, haben sie keinen Einfluss auf die Prognose oder die Proliferation (Fernández et al. 2005). Es wird

daher angenommen, dass *ATM*-Mutationen die Entwicklung einer genomischen Instabilität erleichtern und somit die Tumorentstehung fördern (Fernández et al. 2005). Spätere Aberrationen könnten für die Proliferation und die Aggressivität des MCL von Bedeutung sein (Jares et al. 2007). Typische sekundäre Aberrationen beim MCL sind Zugewinne bei 3q26, 7p21 und 8q24, Verluste bei 1p13-p31, 6q23-q27, 9p21, 11q22-q23, 13q11-q13, 13q14-q34 und 17p13-pter sowie eine Trisomie 12 (Swerdlow et al. 2008). Eine Tabelle mit Häufigkeiten der hier relevanten Aberrationen befindet sich in Kapitel 4.1. (Tabelle 20).

1.1.8 Prognosefaktoren des MCL

Eine Besonderheit des MCL sind die sehr individuellen Überlebenszeiten der Patienten von einigen Monaten bis zu über zehn Jahren (Jares et al. 2007). Dies macht die Suche nach Prognosefaktoren besonders interessant. Es gibt eine Vielzahl univariater Prognosefaktoren. Die für diese Arbeit relevanten Faktoren *TP53*-Mutation (Eigenname eines Tumorsuppressorgens), 9p21-Deletion und 13q14-Deletion (chromosomale Deletionen) waren in mehreren Studien negativ mit dem Gesamtüberleben assoziiert (s. Tabelle 21 in Kapitel 4.3.). Bisher konnten sie noch nicht in einem multivariaten Modell bestätigt werden. Die prognostische Bedeutung von 17p13-Deletionen ist umstritten (dafür: Espinet et al. 2010, Jares und Campo 2008, Rubio-Moscardo et al. 2005, Allen et al. 2002; dagegen: Halldórsdóttir et al. 2011, Kohlhammer et al. 2004, Rosenwald et al. 2003; s. Tabelle 21 in Kapitel 4.3.).

Viele Prognosefaktoren verlieren in multivariaten Modellen ihre Bedeutung. Dies kann teilweise dadurch erklärt werden, dass mehrere Parameter die Tumorproliferation reflektieren (Jares und Campo 2008). Für diese Arbeit relevante Merkmale, die auch in multivariater Analyse mit weiteren Prognosefaktoren signifikant ($p < 0,05$) mit dem Überleben assoziiert waren, sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Einer der aussagekräftigsten Prognoseparameter ist die Tumorproliferation, die oft durch die Anzahl der Ki-67 (Eigenname) positiven Zellen gemessen wird (Jares und Campo 2008). Als proliferationsunabhängig beschrieben sind von den aufgelisteten Faktoren nur Zugewinne in 3q, Verluste in 9q, die Expression von MYC, MDM2 und CCND1 sowie die gleichzeitige Inaktivierung der Signalwege p16^{INK4a}/CDK4 und p14^{ARF}/p53 (Jares und Campo 2008). Für *TP53*-Alterationen (p53-Überexpression und / oder *TP53*-Mutation)

konnte in einer kleinen Studie an 62 Patienten in einer multivariaten Analyse ein Trend ($p = 0,098$) festgestellt werden (Slotta-Huspenina et al. 2012).

Tabelle 4: Unabhängige Prognosefaktoren beim Mantelzell-Lymphom

Als unabhängig wird ein Prognosefaktor mit einem p -Wert $< 0,05$ in einer multivariaten Analyse betrachtet.

Abkürzungen (engl.): ASPM = *abnormal spindle-like microcephaly-associated*, CDK4 = *cyclin-dependent kinase 4*, IPI = *International Prognostic Index*, Ki-67 = *proper name of a protein that is only present in active phases of the cell cycle*, MCL = *mantle cell lymphoma*, MIPI = *MCL International Prognostic Index*, MDM2 = *murine double minute 2*, MYC = *proper name of a protooncogene/transcription factor*, p14_{ARF} = *proper name of a CDK inhibitor*, p16_{INK4a} = *proper name of a CDK inhibitor*, p53 = *proper name of a tumor suppressor protein*, RB1 = *retinoblastoma 1*, SOX11 = *sex determining region Y (SRY)-box 11*

Unabhängiger Prognosefaktor	Quelle
MIPI, IPI	Jares und Campo 2008
Ki-67 Index > 40%	Katzenberger et al. 2008
Proliferationsgenexpressionssignatur (u.a. ASPM)	Rosenwald et al. 2003
17p13.1-Deletion	Rubio-Moscardo et al. 2005
Zugewinne in 3q, Verluste in 9q	Salaverria et al. 2007
> 2 chromosomale Deletionen	Katzenberger et al. 2008
MYC, MDM2, ASPM, RB1 Expression	Kienle et al. 2007
Gleichzeitige Inaktivierung von p16 _{INK4a} /CDK4 und p14 _{ARF} /p53	Hernández et al. 2005
SOX11 Expression	Fernández et al. 2010

Ein viel zitierter Prognosefaktor ist der „MCL International Prognostic Index“ (MIPI). Er kombiniert die Prognosefaktoren Alter, ECOG Status (Eastern Cooperative Oncology Group), LDH (Laktatdehydrogenase) und Leukozytenzahl (Hoster et al. 2008, s. Tabelle 15 in Kapitel 2.2.7.). Dadurch entstehen drei Risikogruppen, die sich signifikant im Überleben unterscheiden. Da der Ki-67 Status ein vom MIPI unabhängiger Prognosefaktor ist, wird er im MIPIb (combined biological MIPI) mit berücksichtigt. Der MIPI ist unabhängig von der initialen zytoreduktiven Therapie (Hoster et al. 2008). Der bisher verwendete „International Prognostic Index“ (IPI) war für aggressive NHL entwickelt worden (The international Non-Hodgkin's lymphoma prognostic factors project 1993) und zeigte meist keine klare Separation der mittleren Risikogruppen beim MCL (Hoster et al. 2008). Mittlerweile konnte in einer großen, prospektiven Studie die Überlegenheit des MIPI gegenüber dem IPI bestätigt werden (Geisler et al. 2010). Ein weiterer wichtiger Prognosefaktor ist die Proliferationsgenexpressionssignatur nach Rosenwald. Anhand der Expression von 20 Genen können Patienten in vier Quartile bezüglich der Überlebenszeit eingeteilt werden (Rosenwald et al. 2003).

1.2 Das Tumorsuppressorgen *TP53*

1.2.1 Geschichte und Bedeutung des Gens *TP53* und des Proteins p53

Das Protein p53 wurde 1979 entdeckt (DeLeo et al. 1979, Lane und Crawford 1979, Linzer und Levine 1979, Melero et al. 1979) und zunächst aufgrund seiner Akkumulation in Tumorzellen als Onkogen missgedeutet. Erst 1989 wurde es als Tumorsuppressor erkannt (Finlay et al. 1989) und später aufgrund seiner entscheidenden Rolle bei der zellulären Antwort auf genotoxischen Stress als „Wächter des Genoms“ bezeichnet (Lane 1992). Seinen Namen verdankt das p53 der anfänglichen, falschen Annahme eines Gewichts von 53 Kilodalton.

Das Tumorsuppressorgen *TP53* codiert für das Protein p53, das im Zellkern lokalisiert ist und als Transkriptionsfaktor unter anderem Apoptose, Zellzyklusarrest oder DNA-Reparatur induziert. Die Rolle des *TP53*-Gens bei der Tumorentstehung wird dadurch unterstrichen, dass es bei über 50% aller soliden humanen Malignomen deletiert oder mutiert ist (Cheung et al. 2009). Es ist damit das am häufigsten veränderte Gen bei humanen Krebserkrankungen (Levine und Oren 2009). Bei einigen Malignomen, darunter auch bei Lymphomen sind *TP53*-Alterationen mit schlechtem Therapieansprechen und kurzem Überleben assoziiert (Brosh und Rotter 2009, Cheung et al. 2009). Kritische Stimmen weisen der *TP53*-Mutation dagegen eine situations-, gewebe- und tumorspezifische Bedeutung zu, die schwer in die klinische Praxis zu integrieren ist (Soussi 2007).

1.2.2 Aufbau des Proteins p53

Das *TP53*-Gen ist auf dem Chromosomenband 17p13.1 des kurzen Arms des Chromosoms 17 lokalisiert. Es besitzt elf Exons, von denen Exon 2 bis 11 codierend sind. Das Protein p53 besteht aus 393 Aminosäuren (AS) und wiegt 44 Kilodalton. Es kann auf molekularer Ebene in hoch konservierte und funktionelle Domänen unterteilt werden (s. Abbildung 3).

Hoch konservierte Domänen

Das p53-Molekül enthält fünf hoch konservierte Bereiche, die sich innerhalb der Vertebraten kaum unterscheiden und für die Tumorsuppressorfunktion des p53 essentiell sind (Malkin 2001). Vier der fünf Bereiche liegen in der zentralen funktionellen Domäne zwischen Exon 5 und 8 (Malkin 2001).

Funktionelle Domänen

1. Transaktivierungsdomäne: Dieser Abschnitt liegt N-terminal und ist Bindungsstelle vieler regulatorischer Liganden, darunter MDM2, das die zelluläre Konzentration von p53 regelt (Levine 1997).
2. Prolinreiche Domäne: Auch diese Region kann die Transkription regeln, wahrscheinlich gemeinsam mit der Transaktivierungsdomäne (Vousden und Prives 2009).
3. DNA-Bindungsdomäne oder zentrale Domäne: Diese Region ist für die direkte, sequenzspezifische DNA-Bindung verantwortlich und enthält die meisten hoch konservierten Domänen sowie die meisten Mutationen (Cheung et al. 2009).
4. Oligomerisierungsdomäne: Sie ist für die Tetramer-Form des p53 verantwortlich, die für die Aktivität des p53 nötig ist (Joerger und Fersht 2008).
5. C-terminale oder regulatorische Domäne: Diese Region erkennt geschädigte DNA, bindet DNA unspezifisch, kann die spezifische DNA-Bindung regulieren und enthält drei nukleäre Lokalisationssignale (NLS) für den Transport des Proteins in den Zellkern (Cheung et al. 2009, Levine 1997).

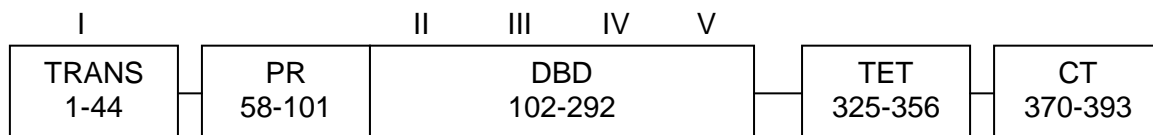


Abbildung 3: Struktur des Tumorsuppressorproteins p53

Dargestellt sind die fünf funktionellen Domänen des p53. Die Zahlen unter den Domänen entsprechen den jeweiligen Aminosäuren. Die römischen Ziffern I bis V entsprechen den hoch konservierten Domänen.

Abkürzungen: CT = C-terminale Domäne, DBD = DNA-Bindungsdomäne, PR = Prolinreiche Domäne, TET = Tetramerisierungsdomäne, TRANS = Transaktivierungsdomäne

Angelehnt an Abbildungen aus Cheung et al. 2009 und der p53 „knowledgebase“ (<http://p53.bii.a-star.edu.sg/aboutp53/protseq/index.php>)

1.2.3 Funktion des Proteins p53

Normalerweise wird p53 in der Zelle durch Ubiquitin-vermittelte Proteolyse in konstant niedrigen Konzentrationen gehalten (Momand et al. 2000). Dies geschieht über einen negativen „Feedback“-Mechanismus: p53 induziert die Transkription des MDM2-Proteins, das den Abbau von p53 einleitet (Momand et al. 2000). Stressoren, zum Beispiel DNA-Schäden, führen vor allem durch eine Degradierung oder eine schwächere Bindungsfähigkeit von MDM2 zu einer erhöhten Konzentration sowie zu einer erhöhten Transkriptionsaktivität von p53

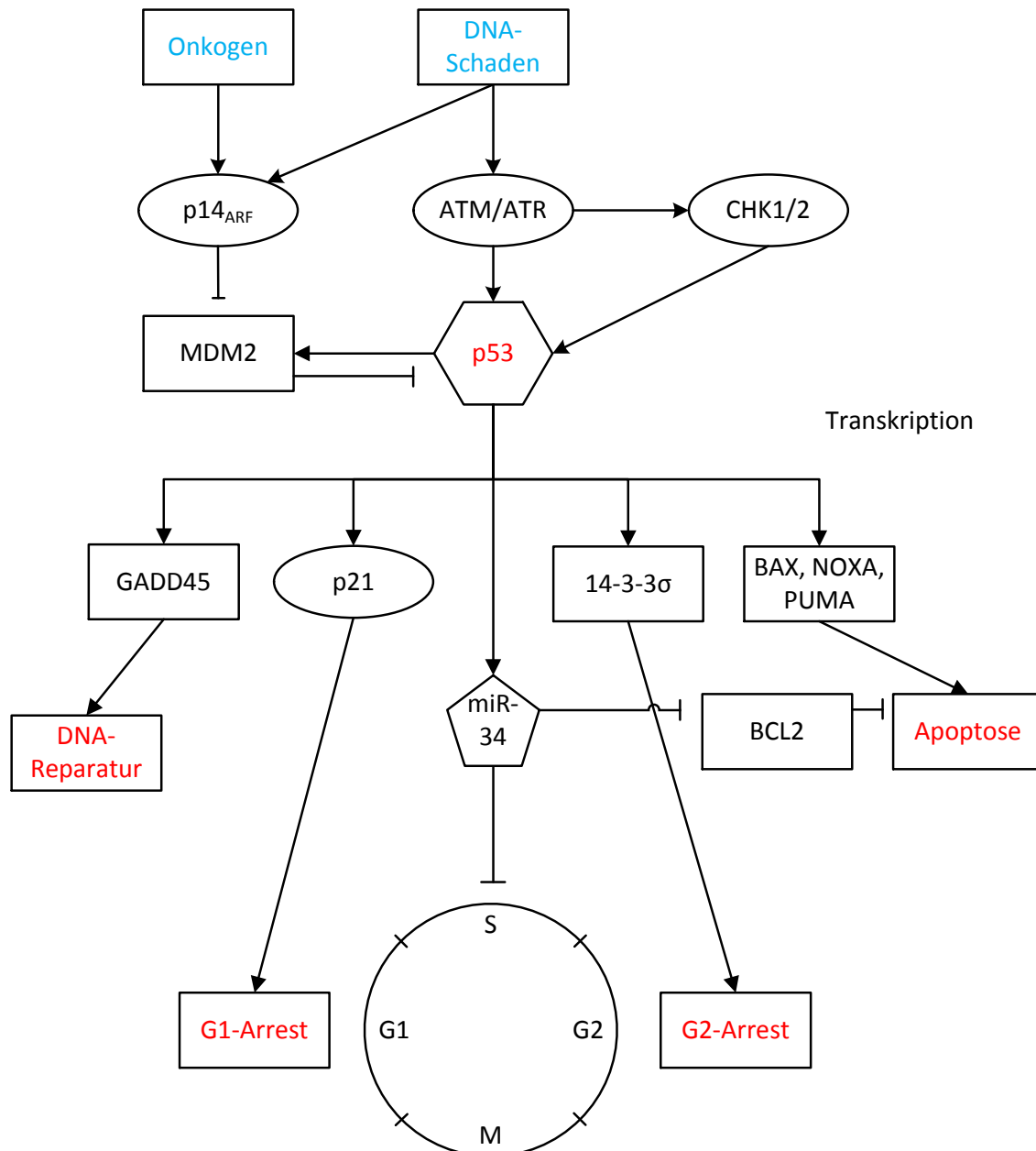


Abbildung 4: Aktivierung und Funktion des p53-Proteins

Stressoren aktivieren über verschiedene Mediatoren p53, das mit MDM2 einen negativen „Feedback“-Mechanismus bildet. Das aktivierte p53 leitet über die Transkription verschiedener codierender Gene oder microRNA-34 einen Zellzyklusarrest, DNA-Reparaturmechanismen oder die Apoptose ein – je nach Art des Stressors. Die Stressoren sind blau geschrieben, Folgen der p53-Aktivierung sind rot markiert. Kinasen sind eingekreist.

Abkürzungen (engl.): 14-3-3 σ = 14-3-3-sigma, ATM = ataxia telangiectasia mutated, ATR = ataxia-telangiectasia and Rad3 related, BAX = BCL2-associated X protein, BCL2 = B-cell CLL/lymphoma 2, CHK1/2 = checkpoint kinase 1/2, GADD45 = growth arrest and DNA-damage-inducible protein 45, MDM2 = murine double minute 2, miR-34 = microRNA-34, p14_{ARF} = proper name of a CDK inhibitor, p21 = CDK1 1A, NOXA = Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activator, PUMA = P53 upregulated modulator of apoptosis, G1, S, G2, M = stages of the cell cycle

Angelehnt an Abbildungen aus Bullock und Fersht 2001, He et al. 2007, Jares et al. 2007 und Huber 2012.

(Levine und Oren 2009). Die Art der Stressoren, die Zellart sowie die p53-Konzentration bestimmen, welche Gene durch das aktivierte p53 vermehrt transkribiert werden (Zhao et al. 2000). Ist der Schaden an der DNA reparabel, induziert p53 unter anderem p21 (CDKI 1A), das einen Zellzyklusarrest bewirkt. Bei irreparablen Schäden bewirkt p53 eine Apoptose, beispielsweise über die Induktion von BAX (BCL2-associated X protein). Weitere wichtige Aufgaben des p53 sind Zellalterung, DNA-Reparatur, Kommunikation mit umliegenden Zellen und die Initialisierung von „Feedback“-Mechanismen, die p53 mit anderen Signalwegen verbinden (Levine et al. 2006). Es wird vermutet, dass die Effizienz des p53-Signalweges individuell ist, da Hunderte von Genen und Polymorphismen dieser Gene beteiligt sind (Levine et al. 2006). Abbildung 4 zeigt die wichtigsten Funktionen und Aktivierungsmechanismen von p53.

1.2.4 *TP53*-Mutationen

Bei den meisten Tumorsuppressorgenen überwiegen Deletionen, Insertionen oder Nonsense-Mutationen (Soussi 2007). Beim *TP53*-Gen dagegen handelt es sich in 74% der Mutationen um einzelne Missense-Mutationen, bei denen nur eine AS vertauscht ist (s. Abbildung 5). Da sich diese hauptsächlich in den hoch konservierten Bereichen der DNA-Bindungsdomäne (DBD) befinden, beschränkten sich frühere Studien bei der Mutationsanalyse oft auf die Exons 5 bis 8. Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass sich mindestens 10% aller Mutationen außerhalb dieser Exons befinden (Hjortsberg et al. 2008). Etwa ein Drittel der Missense-Mutationen verteilen sich auf sechs „hotspots“ in der DBD (Brosh und Rotter 2009). Es werden DNA-Kontaktmutationen (die DNA-Bindung betreffend) von Konformationsmutationen unterschieden, die die Tertiärstruktur beeinflussen (Brosh und Rotter 2009). Die Verteilung der *TP53*-Mutationen wird durch endogene und exogene Faktoren beeinflusst. So neigt das methylierte Cytosin in cytosin- und guaninreichen CpG-Regionen (Cytosine – phosphate – guanine) zu spontaner Desaminierung und damit zu vermehrten Transitionsmutationen (Austausch innerhalb der Purine bzw. Pyrimidine) (Hjortsberg et al. 2008). Exogene Karzinogene führen dagegen zu bestimmten Transversionen (Austausch zwischen Purinen und Pyrimidinen) (Hjortsberg et al. 2008).

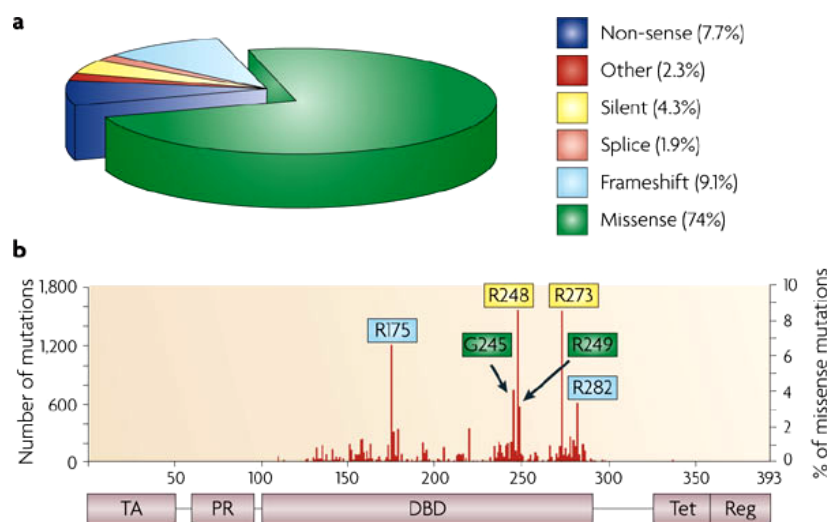


Abbildung 5: Verteilung von TP53-Mutationen in humanen Malignomen nach Daten der „IARC TP53 Mutation Database“

- a) Das Kuchendiagramm zeigt die Häufigkeit der Mutationsarten beim TP53-Gen.
 b) Über der Struktur des TP53 sind die Anzahlen der einzelnen Missense-Mutationen pro Codon aufgetragen. Die sechs „hotspots“ der DBD sind markiert.

Abkürzungen: DBD = DNA-Bindungsdomäne, IARC = International Agency for Research on Cancer (engl.), PR = Prolinreiche Domäne, Reg = regulatorische Domäne, TA = Transaktivierungsdomäne, Tet = Tetramerisierungsdomäne

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Cancer (Brosh and Rotter: When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field), copyright (2009).

TP53-Mutationen bewirken meist die Synthese eines stabilen Proteins, das sich im Zellkern von Tumorzellen anreichert (Brosh und Rotter 2009). Mutiertes p53 kann auf drei verschiedene Arten wirken, deren karzinogener Effekt vom jeweiligen Gewebetyp abhängt (Brosh und Rotter 2009):

1. „Loss of function“: Mutiertes p53 verliert meist seine Transkriptionsaktivität.
2. „Dominant negative effect“: Viele mutierte p53-Proteine inaktivieren durch eine dominant-negative Wirkung das Wildtyp-p53, das vom verbleibenden Wildtyp-Allel produziert wird. Dieser Effekt wird insbesondere durch Missense-Mutationen hervorgerufen.
3. „Gain of function“: Einige mutierte p53-Proteine gewinnen neue onkogene Eigenschaften dazu. Diese Hypothese wurde durch „knock-in“-Mausmodelle für bestimmte TP53-Punktmutationen untermauert, die zusätzliche Tumore im Vergleich zu p53^{-/-} Mäusen entwickelten (Olive et al. 2004, Song et al. 2007). Die erhöhte Chemotherapieresistenz bestimmter Malignome mit TP53-Mutation könnte durch die „gain of function“ erklärt werden: einerseits über die Inaktivierung der p53-verwandten Proteine p63 und p73, andererseits über die Transkription des Gens „multi-drug resistance 1“ (MDR1) (Li und Prives 2007, Bush und Li 2002).

Während der Tumorprogression folgt einer *TP53*-Mutation des einen Allels normalerweise ein Verlust der Heterozygotität durch eine Deletion des Wildtyp-Allels oder eine partielle uniparentale Disomie (pUPD) (Brosh und Rotter 2009). Dies lässt eine Selektion durch die Mutation vermuten (Brosh und Rotter 2009). Bei einer pUPD wird nach einem Chromosomenbruch der weggebrochene Anteil durch eine Kopie des verbliebenen Chromosoms ersetzt (Vater et al. 2008). Abbildung 6 stellt die Möglichkeiten eines Funktionsausfalls des *TP53*-Gens dar.

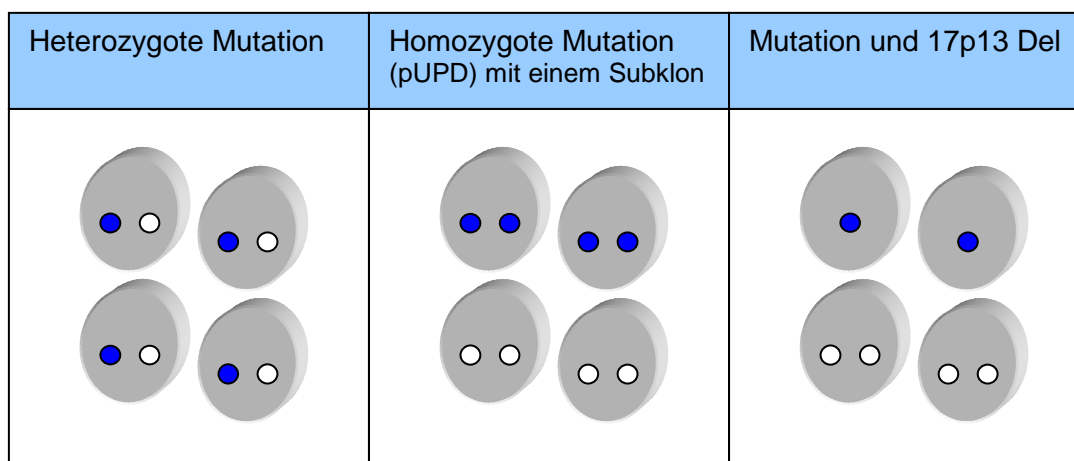


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Funktionsausfalls des *TP53*-Gens

Heterozygote Mutationen besitzen ein intaktes, funktionsfähiges Allel. Es gibt mindestens 50% unmutierte Allele. Bei homozygoten Mutationen durch partielle uniparentale Disomie existieren in diesem Subklon zwei mutierte, nicht mehr funktionsfähige Allele. Hier können über 50% mutierte Allele auftreten. Bei Mutationen eines Allels und Verlust des anderen Allels durch 17p13-Deletion ist nur noch ein mutiertes, nicht funktionsfähiges Allel vorhanden. Hier können über 50% mutierte Allele nachgewiesen werden, aber auch eine 17p13-Deletion. Blaue Punkte stellen mutierte *TP53*-Gene dar, weiße Punkte stehen für Wildtyp-*TP53*.

Abkürzungen (engl.): *Del* = deletion, *pUPD* = partial uniparental disomy

Angelehnt an eine Abbildung nach Häbe 2009.

Auf die Rolle, Häufigkeit und Verteilung von *TP53*-Aberrationen (Mutationen oder Deletionen) sowie partieller uniparentaler Disomien beim MCL wird in der Diskussion im direkten Bezug auf die Ergebnisse eingegangen (s. Kapitel 4.1. und 4.2.).

1.3 Fragestellung der Arbeit

Bei der CLL konnte gezeigt werden, dass die *TP53*-Mutation neben der 17p-Deletion signifikant mit dem Überleben assoziiert ist (Zenz et al. 2008). Es gab Hinweise darauf, dass bestimmte Chemotherapeutika p53-mutierte Klone selektieren (Zenz et al. 2008). Bei aggressiven B-Zell-Lymphomen sind *TP53*-Mutationen als unabhängiger Prognosefaktor etabliert (Ichikawa et al. 1997).

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob die beim MCL schon häufiger in Studien mit kleiner Fallzahl mit dem Überleben assoziierte *TP53*-Mutation in einem großen Kollektiv und in einem multivariaten Modell mit einer schlechten Prognose und niedriger Therapieansprechrates korreliert. Des Weiteren ist interessant, ob beim MCL auch eine 17p13-Deletion das Überleben und das Ansprechen auf Chemotherapie beeinflusst, insbesondere bei bisher widersprüchlichen Studienergebnissen (s. Tabelle 21 in Kapitel 4.3.). Weiterhin liegen keine Daten zu Unterschieden zwischen *TP53*-Mutationen und 17p13-Deletionen im Zusammenhang mit anderen chromosomalen Aberrationen vor.

Im Rahmen dieser Dissertation soll der genaue Stellenwert der *TP53*-Aberrationen unter anderen biologischen und klinischen Prognosefaktoren, wie MIPI, Ki-67 und genomischen Aberrationen beim MCL untersucht werden sowie Korrelationen zwischen *TP53*-Aberrationen und anderen chromosomalen Aberrationen. Dabei sollen im Gegensatz zu früheren Studien auch die Gruppen alleinige *TP53*-Mutation, alleinige 17p13-Deletion sowie eine Kombination aus *TP53*-Mutation und 17p13-Deletion differenziert werden. Das Mutationsprofil ist ebenfalls von Interesse.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Kohorte

Es wurde Material von 122 Patienten mit Mantelzell-Lymphom (MCL) retrospektiv untersucht. Einverständniserklärungen der Patienten und ein Ethikvotum der Ethikkommission der Universität Ulm lagen vor. Alle Fälle erfüllten die Diagnosekriterien für das MCL, zeigten also eine Kombination aus typischer Morphologie, Immunphänotyp und Zytogenetik (Swerdlow und Williams 2002, s. Kapitel 1.1.). Die zu untersuchenden Zellen wurden über einen Zeitraum von 1987 bis 2007 aus peripherem Blut, Lymphknotengewebe oder Knochenmark gewonnen. Die zytogenetische Analyse wurde entweder im Zytogenetischen Labor der Abteilung Innere Medizin III der Universität Ulm oder im Pathologischen Institut der Universität Würzburg durchgeführt, die *TP53*-Mutationsanalyse in Ulm. Bei 108 Patienten wurden Exon 4 bis 10 amplifiziert, eine FISH- (Fluoreszenz in situ Hybridisierung) oder MCGH-Analyse (Matrix Comparative Genomic Hybridization) wurde bei 86 dieser Patienten durchgeführt und lag bei 14 weiteren vor. Klinische Daten waren für 95 Patienten vorhanden. Eine Komplettierung der Daten war aufgrund der langen Einschlussdauer sowie der teilweise geringen Probenmengen nur begrenzt möglich. Die mittlere Nachbeobachtungszeit betrug 31,2 Monate. Der Altersmedian der Patienten lag zum Zeitpunkt der Untersuchung bei 63,9 Jahren (Spannweite: 38-90 Jahre), 80% der Patienten waren männlich (93/116). Die Patienten befanden sich zum Zeitpunkt der Untersuchung in folgenden Krankheitsstadien nach Ann Arbor: 6% in Stadium I (6/97), 5% in Stadium II (5/97), 9% in Stadium III (9/97), 79% in Stadium IV (77/97). Das mediane Überleben betrug 46,6 Monate, eine Gesamtremission (komplette oder partielle Remission) konnte bei 64% (56/87) der Patienten erreicht werden. Definierte Endpunkte der Arbeit waren Gesamtüberleben und Gesamtremission.

2.1.2 Geräte, Reagenzien und sonstige Materialien

Tabelle 5: Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller
8-Kanal-Pipette	Fa. Kioehn, Las Vegas (USA)
ABI Prism 3100 Genetic Analyzer	Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt
Eagle eye [®] IT Still Video System	Fa. Stratagene, Amsterdam (NL)
Eppendorf Biophotometer	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Pipettierroboter epMotion 5075	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Thermomixer comfort 5355	Eppendorf AG, Hamburg
Gelkammer	LMS Labortechnik GmbH, Dossenheim
Kolbenhubpipetten 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Multifuge 3 S-R Heraeus	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
Thermal Cycler 2720	Fa. PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Vakuumpumpe LABOPORT [®] Vacuum Pump	KNF Neuberger GmbH, Freiburg
Vortex Genie 2 [™]	Bender und Hobein AG, Zürich (CH)
Wave [®] Nucleic Acid Fragment Analysis System 3500 HT	Transgenomic Inc., Omaha (USA)

Tabelle 6: Reagenzien und sonstige Materialien

Reagenz / sonstiges Material	Hersteller
Acrylamide 40% / Bis Solution 29:1	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Aqua ad iniectionabilia Braun 10ml	B. Braun AG, Melsungen
Aqua Spüllösung	Boehringer AG, Mannheim
ART 10/20/200/1000 REACH Pipet Tips	Molecular Bio Products Inc., San Diego (USA)
Biocoll Separating Solution	Biochrom AG, Berlin
Blue Dextran/EDTA	Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt
Blue Juice [™] Loading Buffer 10x	Invitrogen AG, Karlsruhe
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt
Discoverase dHPLC	Invitrogen AG, Karlsruhe
DNA Sequencing Kit: BigDye [™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction	Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt
DNA-Ladder 100bp	Invitrogen AG, Karlsruhe
DyeEx [™] 96 Kit	Fa. QIAGEN, Hilden (NL)
EDTA	Merck KGaA, Darmstadt
Ep T.I.P.S. Motion 1-50µl Eppendorf Filtertips in Racks	Eppendorf AG, Hamburg
epMotion reservoir 30ml	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Safe-lock Tubes 1,5ml	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Safe-lock Tubes 2,0ml	Eppendorf AG, Hamburg
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt

Ethanol absolut für Analyse	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Ethidiumbromid-Lösung 0,07%	AppliChem GmbH, Darmstadt
Formamid, deionisiert	Fa. Amresco, Solon (USA)
Gene Amp dNTP Blend	Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt
Harnstoff	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
HPLC-Wasser	Fa. Roth, Karlsruhe
Isopropanol für Analyse	Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt
Micro Amp™ 8-Cap Strip	Fa. Applied Biosystems, Carlsbad (USA)
Micro Amp™ 8-Tube Strip 0,2ml	Fa. Applied Biosystems, Carlsbad (USA)
Micro Amp™ Clear Adhesive Film	Fa. Applied Biosystems, Carlsbad (USA)
Micro Amp™ optical 96-well Reaction Plate	Fa. Applied Biosystems, Carlsbad (USA)
PBS (10x)	Fa. Gibco-BRL, New York (USA)
Puffer A Wave optimized™	Transgenomic Inc., Omaha (USA)
Puffer B Wave optimized™	Transgenomic Inc., Omaha (USA)
Roti@garose	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
QIAquick® PCR Purification Kit	Fa. QIAGEN, Hilden (NL)
RPMI 1640	Biochrom KG, Berlin
Sequencing Analysis Version 3.4 (Software)	Fa. PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Solution D Wave optimized™	Transgenomic Inc., Omaha (USA)
Syringe Wash Solution Wave optimized™	Transgenomic Inc., Omaha (USA)
TBE10x Extended Range Buffer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
TEMED (N,N,N,N'-Tetramethylethyldiamin)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Thermowell 96well PCR Plate 200µl	Corning/Costar GmbH, Wiesbaden
Trisbase	Merck KGaA, Darmstadt
TRIzol® Reagent	Invitrogen AG, Karlsruhe
WAVE® High range Mutation Control Standard 180µl	Transgenomic Inc., Omaha (USA)
WAVE® Low range Mutation Control Standard 180µl	Transgenomic Inc., Omaha (USA)

Tabelle 7: Häufig verwendeter Puffer

Lösungsbezeichnung	Menge der Bestandteile	Bestandteile
TAE 50 x Stammlösung	242 g	Trisbase
	57 ml	Essigsäure
	100 ml	EDTA 0,5 mol/l, pH 8,0
	1000 ml	H ₂ O dest.

2.2 Methoden

Die verwendeten, teilweise optimierten Protokolle beruhen auf Vorarbeiten aus der Arbeitsgruppe (Häbe 2009, Denzel 2010).

2.2.1 Isolierung mononukleärer Zellen aus Blut und Knochenmark

Mononukleäre Zellen wurden nach der modifizierten Methode von Boyum (Boyum 1976) isoliert. Dabei werden die Blutbestandteile aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichtegradienten durch Zentrifugation separiert. Es wurde 20 ml heparinisieretes Blut in einem 50 ml-Falcon auf 20 ml Biocoll Separating Solution geschichtet. Nach einer Zentrifugation (2800 U/min = Umdrehungen pro Minute, 20 min, Raumtemperatur) entstand zwischen der Biocoll Separating Solution und dem Plasma die sogenannte Interphase, in der sich die mononukleären Zellen befanden. Diese wurden abpipettiert, gewaschen (PBS = phosphatgepufferte Salzlösung), pelletiert (Zentrifugation bei 1200 U/min, 10 min, Raumtemperatur), mit dem Zellkulturmedium RPMI-1640 gemischt und bei - 80°C gelagert.

2.2.2 DNA-Präparation

2.2.2.1 DNA-Isolierung

Die Pellets wurden mit 1 ml Trizolreagenz homogenisiert und inkubiert (5 min, Raumtemperatur). In Trizol enthaltenes Guanidiniumthiocyanat lysierte die Zellen und inaktivierte Enzyme. Phenol (ebenfalls Bestandteil von Trizol) löste Proteine und DNA. Durch Zugabe von 200 µl Chloroform, erneuter Inkubation und Zentrifugation (13000 U/min, 15 min, 4°C) entstand zwischen einer wässrigen und einer Chloroform-Phenol-Phase eine Interphase, die DNA enthielt. Die wässrige Phase wurde abpipettiert. Nach Zugabe von 300 µl Ethanol 100% wurde die Probe zentrifugiert (13000 U/min, 5 min, Raumtemperatur). Die entstandenen Pellets wurden mit Ethanol 75% gewaschen und bei - 20°C gelagert.

2.2.2.2 DNA-Konzentrationsbestimmung

2 µl einer DNA-Probe wurden mit 98 µl H₂O dest. verdünnt. Mit Hilfe des Biophotometers der Firma Eppendorf wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem mittleren Absorptionsmaximum der Nukleotidbasen, gemessen.

Zusätzlich wurde mit 2 µl der DNA-Probe eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt, um die Länge der DNA-Fragmente zu bestimmen (s. Kapitel 2.2.3.4.). Es wurden Verdünnungen mit Konzentrationen von 25 ng/µl und 200 ng/µl hergestellt und bei - 20°C tiefgefroren.

2.2.3 DNA-Amplifikation

2.2.3.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion kann ein beliebiger Abschnitt des DNA-Moleküls *in vitro* selektiv und exponentiell vervielfältigt werden (Mullis et al. 1986, Saiki et al. 1988).

Ein DNA-Synthese-Zyklus bestand aus drei Schritten:

1. Denaturierung: Die doppelsträngige DNA wurde auf 94°C erhitzt, um die Stränge durch Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen zu trennen.
2. Primerannealing: Damit die ausgesuchten Primer (spezifische Oligonukleotide) an ihren komplementären Strang binden konnten, wurde die Temperatur exonspezifisch gesenkt.
3. Elongation: Bei 68°C füllte eine thermostabile DNA-Polymerase die fehlenden Nukleotide auf. Dadurch entstanden zwei neue Doppelstränge.

Da dieser Zyklus 30-mal wiederholt wurde und sich die DNA jedes Mal verdoppelte, ergab sich eine exponentielle Vervielfachung des gewünschten DNA-Abschnitts.

2.2.3.2 Oligonukleotide und Polymerase

Tabelle 8: Primersequenzen der Exons des TP53-Gens

Abkürzung: *bp* = Basenpaare

Nach Häbe 2009.

Exon	bp	5' Primer (forward)	3' Primer (reverse)
4	411	ctt cct gaa aac aac gtt ctg	gag atc aca cat taa gtg gg
5	422	cta gct cgc tag tgg gtt gc	cac tcg gat aag atg ctg ag
6	411	cca cca tga gcg ctg ctc ag	ccc tta gcc tcg taa gct tc
7	332	gcc tcc cct gct tgc cac ag	ggg agc agt aag gag att cc
8 / 9	411	ttc ctt act gcc tct tgc tt	aga aaa cgg cat ttt gag tg
10	475	cga gag tga gac ccc atc tc	tgg tta tag gat tca acc gg

Tabelle 8 zeigt die verwendeten Primer nach Smith (Smith et al. 2002) und für Exon 8/9 nach Gross (Gross et al. 2001), angelehnt an eine DHPLC-Optimierung an einem Patientenkollektiv mit bekannten *TP53*-Mutationen (Häbe 2009). Für die PCR wurde die Discoverase dHPLC der Firma Invitrogen verwendet.

2.2.3.3 PCR des *TP53*-Gens

Durch einen Pipettierroboter wurden in 96-Well-Platten je 10 µl H₂O dest. und 1,2 µl Patienten-DNA in einer Konzentration von 25 ng/µl vorgelegt und bei - 20°C gelagert. Um den 30µl-Ansatz (Tabelle 9) zu vervollständigen wurde der Mastermix bei 0°C (auf Eis) hergestellt und zugefügt. Die Platte wurde zum Schutz vor Verdunstung mit einer Folie verschlossen und im Thermocycler amplifiziert.

Tabelle 9: PCR-Ansatz exemplarisch für einen Patienten

Abkürzungen: µl = Mikroliter, dNTP = Desoxyribonukleosidtriphosphat, for = forward (engl.), l = Liter, MgSO₄ = Magnesiumsulfat, mmol = Millimol, ng = Nanogramm, PCR = polymerase chain reaction, rev = reverse (engl.)

Nach Häbe 2009.

Bestandteil	Menge [µl]
5xPCR Puffer (MgSO ₄)	6
(10 mmol/l) dNTP	2,4
p53 Primer 1 (for)	1,2
p53 Primer 2 (rev)	1,2
Discoverase	0,6
H ₂ O dest.	17,4
Probe 25 ng/µl	1,2
Gesamt	30

Tabelle 10: PCR-Programm zur DNA-Amplifikation

Die Anzahl der PCR-Zyklen des jeweiligen Exons (X Zyklen) sowie die Temperatur X°C ist Tabelle 12 zu entnehmen.

Abkürzungen: ∞ = beliebig lang, CYCLE = Zyklus, HOLD = Temperatur halten, min = Minute, PCR = polymerase chain reaction, sec = Sekunde

Nach Häbe 2009.

Modus	Temperatur	Zeit
HOLD	94°C	30 sec
CYCLE (X Zyklen)	94°C	30 sec
	X °C	60 sec
	68°C	60 sec
HOLD	68°C	4 min
HOLD	4°C	∞

Das PCR-Programm ist in Tabelle 10 dargestellt. Die Anzahl der PCR-Zyklen für das jeweilige Exon ist Tabelle 12 zu entnehmen. Die PCR-Produkte wurden bei 4°C gelagert. Um zufällige Verunreinigungen aufzudecken, wurde bei allen PCR-Ansätzen eine Negativkontrolle (2 µl H₂O dest. statt Patienten-DNA) mitgeführt.

2.2.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Mittels Agarose-Gelelektrophorese wurde der Erfolg der PCR kontrolliert. Bei dieser Methode werden die DNA-Moleküle durch das Anlegen eines elektrischen Feldes der Größe nach aufgetrennt. Die negativ geladenen Nukleinsäuren wandern von der Kathode zur Anode, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit von der Anzahl der Basenpaare abhängt. Ethidiumbromid interkaliert in die doppelsträngige DNA, so dass die Fragmente unter UV-Licht fluoreszieren und dadurch sichtbar werden.

Für das Agarosegel wurden 4 g Agarose in 200 ml 1xTAE-Puffer (Tris-acetate ethylenediaminetetraacetic acid) aufgekocht. Nach kurzem Abkühlen wurde 1 Tropfen Ethidiumbromid hinzugefügt und das Gel in Gelschlitten mit Kämmen zur Aussparung der Ladetaschen gefüllt. Das vollständig erstarrte Gel wurde in eine mit 1xTAE-Puffer gefüllte Gelkammer überführt, die Kämmen wurden entfernt. In die Ladetaschen wurde eine Mischung aus 10 µl PCR-Produkt und 2 µl Loading Buffer pipettiert. Einmal pro Reihe wurde ein DNA-Ladder als Vergleichsmuster statt der Mischung aufgetragen, um die Länge der Fragmente abzuschätzen. Für 30 min wurde eine Spannung von 145 Volt und einer Stromstärke von 500 Milliampere angesetzt. Danach konnte das Gel unter UV-Licht der Wellenlänge 254 nm (Nanometer) fotografiert werden.

Voraussetzung für den nächsten Arbeitsschritt war das Vorhandensein des zu bestimmenden Exons. Dafür wurde die Bandenlänge mit dem DNA-Ladder verglichen.

2.2.4 Mutationsanalyse mittels DHPLC

2.2.4.1 DHPLC

Mit der DHPLC (denaturing high-performance liquid chromatography) können viele Proben schnell, kostengünstig und sensitiv auf DNA-Veränderungen untersucht werden. Die erstmals von Oefner und Underhill (Oefner und Underhill 1995)

beschriebene Methode basiert auf der Unterscheidung zwischen Hetero- und Homoduplexen anhand eines Chromatogramms. Abbildung 7 zeigt dieses Prinzip.

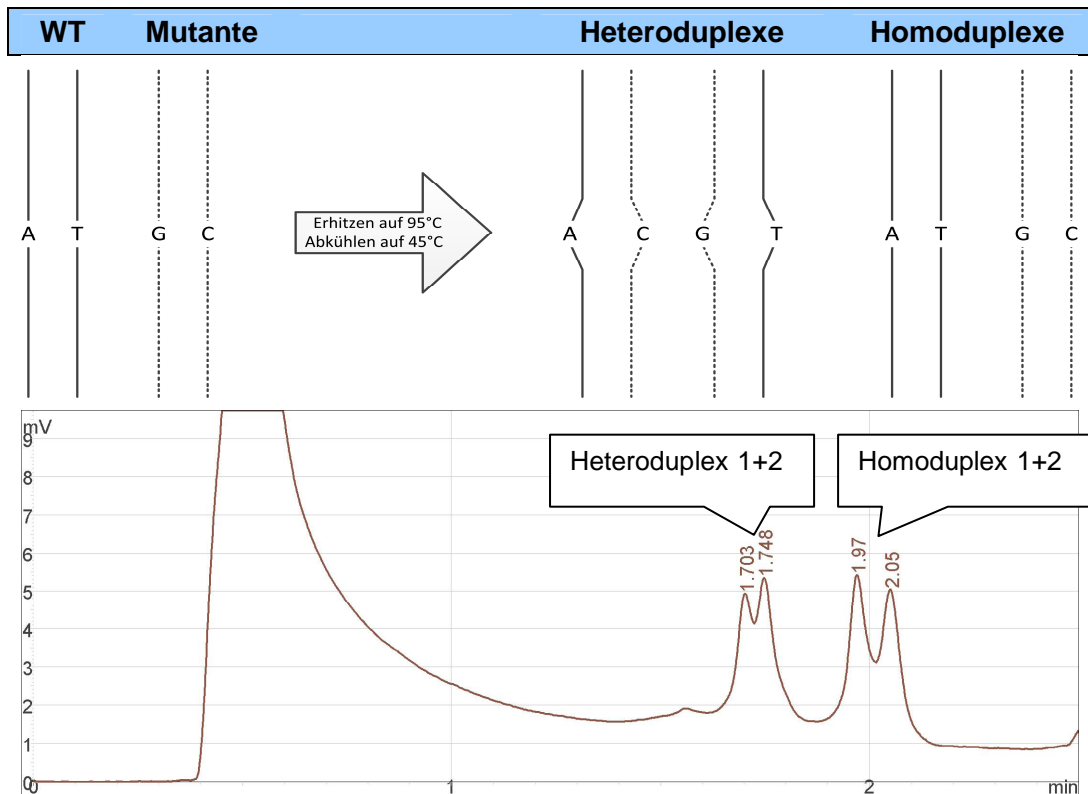


Abbildung 7: Homo- und Heteroduplex-Bildung

Oben: Schematische Darstellung der Homo- und Heteroduplex-Bildung, nach Schwarzer 2000, zitiert nach Häbe 2009.

Unten: WAVE-Standard-Chromatogramm mit Homo- und Heteroduplexpeaks mit freundlicher Genehmigung der Autorin aus Häbe 2009.

Abkürzungen: A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, min = Minute, mV = Millivolt, T = Thymin, WT = Wildtyp

Durch Erhitzen doppelsträngiger PCR-Produkte wurden diese denaturiert, es entstanden zwei Einzelstränge. Diese lagerten sich beim Abkühlen wieder zusammen. Wichen die Sequenzen an einer Stelle, beispielsweise durch eine Punktmutation, voneinander ab, lagerten sich einerseits die komplementären Stränge der Wildtyp-DNA bzw. die der veränderten DNA aneinander (Homoduplexe). Andererseits paarten sich auch Wildtyp-DNA und veränderte DNA (Heteroduplexe), was zu Basenpaarkombinationen außerhalb des Watson-Crick-Systems führte. Durch die Ionenpaar-Umkehr-Chromatographie (ion-pair reversed-phase high performance liquid chromatography) konnten die Homo- und Heteroduplexe aufgrund ihrer verschiedenen physikalischen Eigenschaften getrennt und analysiert werden. Der positiv geladene Puffer TEAA

(Triethylammoniumazetat) band die negativ geladene DNA an das hydrophile, stationäre Material der Säule (Poly(styrene-divinylbenzene)-Copolymer). Die mobile, acetonitrilhaltige Phase (Puffer A und B) wusch mit zunehmender Konzentration die DNA von der Säule. Über eine UV-Lampe wurde das Chromatogramm detektiert, wobei sich Homo- und Heteroduplices durch verschiedene Peaks und Retentionszeiten unterschieden.

2.2.4.2 Zumischung von Wildtyp-DNA und Heteroduplex-Formierung

Da für eine Detektion eine Heteroduplexbildung nötig war, musste letztere auch bei homozygoten Anlageträgern ermöglicht werden. Deshalb wurde der amplifizierte Patienten-DNA 20% Wildtyp-DNA zugemischt. Die verwendeten Zelllinien Granta (für Exon 4, 5 und 7) und BL-60 (für Exon 6, 8/9 und 10) wurden vorher durch direkte Sequenzierung überprüft. Bei Patienten mit bekannter 17p13-Deletion sollte eine Mutation mit größtmöglicher Sicherheit ausgeschlossen werden. Dazu wurden diese Patienten zusätzlich direkt sequenziert (Exon 4-10).

Tabelle 11: PCR-Programm zur Heteroduplex-Formierung

Abkürzungen: ∞ = beliebig lang, CYCLE = Zyklus, HOLD = Temperatur halten, min = Minute, PCR = polymerase chain reaction, sec = Sekunde

Nach Häbe 2009.

Modus	Temperatur	Zeit
HOLD	95°C	2 min
HOLD	94°C	10 sec
CYCLE (24 Zyklen)	minus 2°C / Zyklus	10 sec
HOLD	45°C	30 min
HOLD	4°C	∞

Für die Heteroduplex-Formierung wurden die PCR-Produkte mit Zumischung in einer PCR-Maschine auf 95°C erhitzt, um zu denaturieren. Durch schrittweises Abkühlen auf 45°C bildeten sich Homo- und Heteroduplices (s. Tabelle 11). Die Produkte wurden maximal 14 Tage bei 4°C gelagert, sonst wurde die Formierung wiederholt.

2.2.4.3 Mutationsanalyse

Die Mutationsanalyse wurde mit dem WAVETM-System der Firma Transgenomic durchgeführt. Vor der Analyse wurden Mutationsstandards bei 56°C und 70°C gemessen, um die Auftrennungsgenauigkeit des Gerätes zu kontrollieren. Die

Standards mussten vier „Peaks“ im Chromatogramm zeigen und ihre Retentionszeiten durften die von der Firma Transgenomic empfohlenen nicht überschreiten. Als zusätzliche Qualitätskontrolle liefen bei der Analyse jedes Exons Positiv- und Negativkontrollen mit, die zuvor durch direkte Sequenzierung verifiziert wurden. Zur Qualitätssicherung wurde nach jedem Wechsel der Analysebedingungen das System equilibriert und nach 100 Messungen eine „Cleanmethode“ durchgeführt.

Die heteroduplexformierten 96-Well-Platten wurden im Autosampler des Gerätes platziert. Je nach Ausbeute der PCR wurde ein Injektionsvolumen zwischen 5 µl und 7 µl verwendet. Die Analyse und Erstellung des Chromatogramms führte die Software eigenständig durch. Die Bedingungen sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

Tabelle 12: PCR- und DHPLC-Bedingungen für die untersuchten Exons

Abkürzungen: *bp* = Basenpaare, *DHPLC* = Denaturing high performance liquid chromatography (engl.), *l* = Liter, *MgSO₄* = Magnesiumsulfat, *mmol* = Millimol, *PCR* = polymerase chain reaction, *Temp.* = Temperatur

Nach Häbe 2009.

Exon	Länge	PCR			DHPLC		
		Temp. [°C]	MgSO ₄ [mmol/l]	PCR [Zyklen]	Temp. [°C]		
4	411	60	1	28	61	64	
5	422	62	1	28	60,2	64,2	66,2
6	411	62	0	35	60	62	
7	332	64	1	30	59,7	61,7	63,7
8/9	411	58	1	33	59	62	
10	475	55	1	33	61		

2.2.5 Sequenzierung der DNA

2.2.5.1 Kettenabbruchmethode

Falls das Chromatogramm der DHPLC-Analyse eine Mutation vermuten ließ, wurde die entsprechende Probe mit der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger et al. 1977) direkt sequenziert.

Bei dieser Methode werden neben dNTPs (Desoxyribonukleosid-Triphosphate, N = A, C, G oder T) auch geringe Mengen von ddNTPs (Dideoxyribonukleosid-Triphosphate) bei der Amplifikation eingesetzt. Den ddNTPs fehlt die Hydroxylgruppe am 3'-C-Atom der Ribose, die die Phosphodiesterbrücke zum

nächsten Nukleotid bildet. Dadurch wird eine Elongation der DNA verhindert und es kommt zum Kettenabbruch. Es werden die vier natürlichen dNTPs und je eines der vier, mit Fluoreszenz-Farbstoff markierten ddNTPs zu einem PCR-Ansatz gegeben. Die Polymerase baut in zufälliger Verteilung ddNTPs ein, es entsteht ein Gemisch unterschiedlich langer DNA-Stücke. Das Experiment wird mit allen vier ddNTPs durchgeführt. Aus dem Muster der entstehenden Banden kann man die Abfolge der Basen auf dem DNA-Abschnitt ablesen.

2.2.5.2 Reinigung der PCR-Produkte

In einer separaten PCR wurde DNA einer Konzentration von 200 ng/μl verwendet. Die Primer und Reagenzien entsprachen denjenigen der DHPLC-Analyse (Tabelle 8, 9, 10 und 12). Mit den amplifizierten PCR-Produkten wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt (s. Kapitel 2.2.3.4.).

Zur Reinigung der PCR-Produkte wurde das QIAquick™ PCR Purification Kit der Firma Qiagen verwendet. Dabei konnten DNA-Fragmente zwischen 100 bp (Basenpaare) und 10.000 bp durch eine Silikagel-Membran von den übrigen PCR-Komponenten, insbesondere von Verunreinigungen, getrennt werden. Zunächst wurden 40 μl des PCR-Produktes und 200 μl des Binding Buffers auf die Membran pipettiert. Durch den hohen Salzanteil im Puffer wurde die DNA selektiv gebunden, die restlichen Bestandteile passierten die Membran. Anschließend wurden die Salze durch zweimaliges Waschen mit 1 ml ethanolhaltigem Puffer (PE Wash Buffer) entfernt und der Alkohol durch Anlegen eines Vakuums verdampft. Die DNA wurde durch Zugabe von 75 μl Elution Buffer direkt in 8er-Tubes eluiert.

2.2.5.3 Sequenzreaktion

Tabelle 13: Ansatz für die Sequenzreaktion exemplarisch für einen Patienten

Abkürzungen: μl = Mikroliter, H₂O dest. = destilliertes Wasser

Nach Häbe 2009.

Bestandteil	Menge [μl]
BigDye™ Ready Reaction Mix	6
Primer (forward oder reverse)	5
Probe	5
H ₂ O dest.	4
Gesamt	20

Für die Synthese der komplementären DNA-Stränge wurde das DNA-Sequencing Kit BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction der Firma Applied

Biosystems verwendet (s. Tabelle 13). Darin enthalten waren mit vier unterschiedlichen dRhodamin-Farbstoffen markierte ddNTPs, dNTPs, eine Taq-Polymerase, MgCl₂ und Puffer. Die Primer der vorausgegangenen PCR wurden einzeln anstatt paarweise in einer Konzentration von 1 µmol/l hinzugefügt. Die PCR fand im Thermocycler statt (s. Tabelle 14).

Tabelle 14: PCR-Programm zur Sequenzierung

Abkürzungen: ∞ = beliebig lang, CYCLE = Zyklus, HOLD = Temperatur halten, min = Minute, PCR = polymerase chain reaction, sec = Sekunde

Nach Häbe 2009.

Modus	Temperatur	Zeit
HOLD	95°C	45 sec
CYCLE (25 Zyklen)	96°C	15 sec
	52°C	10 sec
	60°C	4 min
HOLD	4°C	∞

2.2.5.4 Reinigung der Sequenzreaktion

Die eingebauten ddNTPs wurden durch Gelfiltrationschromatographie mit dem DyeEx™ 96-Kit der Firma Qiagen entfernt. Das gesamte PCR-Produkt (20 µl) wurde auf die DyeEx™ Säulen pipettiert und zentrifugiert (2350 U/min, 3 min, Raumtemperatur). Die Stopnukleotide wurden in den Poren der Säule festgehalten, die DNA diffundiert und wurde in einer 96-Well-Platte aufgefangen. Anschließend konnten die Proben bei 4°C oder -20°C einige Tage gelagert oder sofort sequenziert werden.

2.2.5.5 Analyse der Sequenzreaktion

Die Sequenzreaktion wurde mit dem ABI Prism 3100 Genetic Analyzer der Firma Applied Biosystems analysiert. Dabei konnten Größenunterschiede bis zu einem Basenpaar aufgetrennt werden. Die vier verschiedenen Farbstoffe der ddNTPs wurden von einem Argonlaser angeregt. Das emittierende Licht verschiedener Wellenlänge wurde von einer Kamera aufgenommen.

Die Rohdaten wurden gespeichert und anschließend mit dem Programm Sequencing Analysis Version 5.2 der Firma Applied Biosystems analysiert und gedruckt. Die gewonnenen Sequenzen wurden mit Wildtypsequenzen verglichen und mit dem Internetprogramm NCBI Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) überprüft.

2.2.6 Statistische Analyse

Das Gesamtüberleben (OS = overall survival) wurde mit Kaplan-Meier-Kurven anhand der Informationen über Erstdiagnosedatum und letztem Kontakt (last known alive) oder Tod bestimmt. Es wurde mit Hilfe des Logrank-Tests nach Unterschieden in den Überlebenskurven von Patienten mit und ohne Aberrationen gesucht (Weiß 2008). Für die Gegenüberstellung kategorialer Variablen, beispielsweise der chromosomalen Aberrationen untereinander, kam der exakte Test nach Fisher für zwei unverbundene Stichproben bei nicht normal verteilter Stichprobe zur Anwendung. Dieser Test wurde verwendet, da er auch bei kleiner Fallzahl zuverlässige Ergebnisse liefert (Weiß 2008). Das Signifikanzniveau wurde mit $p = 0,05$ relativ schwach gewählt, um bei relativ niedrigen Fallzahlen kleine Unterschiede eher bestimmen zu können und die Güte des Tests trotzdem zu erhalten. Für die statistische Analyse wurde das Programm „GraphPad Prism 5“ (GraphPad Software, La Jolla, USA) verwendet. Eine multivariate Analyse sowie ein Trend-Logrank-Test wurden vom Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg durchgeführt.

2.2.7 Berechnung des MIPI und IPI

Zur Berechnung des MIPI sowie des IPI wurden die in Tabelle 15 dargestellten Formeln und Einteilungen in Risikogruppen vorgenommen.

Tabelle 15: Prognoseindizes für das Mantelzell-Lymphom

Der MIPI wird folgendermaßen berechnet (engl.): $\text{MIPI score} = 0.03535 \times \text{age}(\text{years}) + 0.06978$ (if ECOG > 1) + $1.367 \times \log_{10}(\text{LDH}/\text{ULN}) + 0.9393 \times \log_{10}(\text{WBCs} / 10^6 \text{ liter})$

Abkürzungen (engl.): ECOG = Eastern Cooperative Oncology Group, IPI = International Prognostic Index, LDH = lactate dehydrogenase, MIPI = Mantle Cell Lymphoma International Prognostic Index, ULN = upper limit of normal, WBCs = white blood cells

Nach "The international Non-Hodgkin's lymphoma prognostic factors project" 1993 und Hoster et al. 2008.

Index	Faktoren	Risikogruppen	Anzahl der Faktoren / Punkte
IPI	> 60 Jahre Ann-Arbor III/IV > 1 extranodaler Befall ECOG > 1 LDH erhöht	niedrig	0-1
		niedrig-intermediär	2
		hoch-intermediär	3
		hoch	4-5
MIPI	Alter ECOG LDH Leukozyten	niedrig	< 5,7
		mittel	≥ 5,7 und < 6,2
		hoch	≥ 6,2

3 Ergebnisse

3.1 Inzidenz von *TP53*-Mutationen, 17p13-Deletionen, 9p21-Deletionen und 13q14-Deletionen

Die Inzidenz von *TP53*-Mutationen liegt bei 25% der untersuchten Patienten (27/108). 17p13-Deletionen treten in 19% (19/100) der Patienten auf, 9p21-Deletionen in 40 % (38/95) und 13q14-Deletionen in 45% (45/100).

Von den 27 Patienten mit einer *TP53*-Mutation haben neun gleichzeitig eine 17p13-Deletion (45% der Patienten mit Angaben zu beiden Aberrationen), elf besitzen eine alleinige *TP53*-Mutation ohne 17p13-Deletion (55%) und von sieben Patienten sind keine 17p13-Deletionsdaten vorhanden. Im Gegensatz zu den 45% bei der Gruppe mit *TP53*-Mutation zeigen in der Gruppe ohne *TP53*-Mutation nur 14% eine 17p13-Deletion. Von den 19 Patienten mit 17p13-Deletion besitzen neun gleichzeitig eine *TP53*-Mutation (50%), neun weisen eine alleinige 17p13-Deletion ohne *TP53*-Mutation auf (50%) und bei einem Patient sind keine *TP53*-Mutationsdaten vorhanden.

Das molekulargenetische Profil beim MCL mit *TP53*-Mutation unterscheidet sich von demjenigen ohne *TP53*-Mutation durch relativ häufigere Deletionen in 17p13 und 9p21 (s. Abbildung 8).

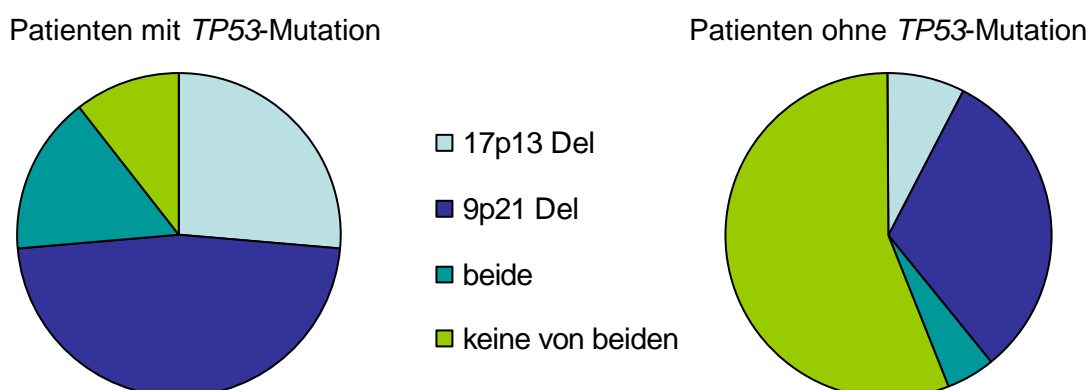


Abbildung 8: Molekulargenetische Veränderungen, unterteilt in Patienten mit *TP53*-Mutation (n = 19) und Patienten ohne *TP53*-Mutation (n = 64)

Bei Patienten mit *TP53*-Mutation sind gleichzeitige 9p21-Deletionen (47%), 17p13-Deletionen und eine Kombination beider Deletionen relativ häufiger als bei Patienten ohne *TP53*-Mutation. Bei letzteren überwiegen Patienten ohne eine der beiden betrachteten Deletionen (56%).

Abkürzungen: *Del* = *Deletion*

3.2 Verteilung und Art der *TP53*-Aberrationen

3.2.1 *TP53*-Mutationsprofil

Insgesamt treten 30 *TP53*-Mutationen bei 27 Patienten auf. Bei drei Patienten sind zwei verschiedene Mutationen vorhanden. Missense-Mutationen sind mit 19 Fällen die häufigsten, gefolgt von fünf Nonsense-Mutationen, bei denen durch den Austausch einer Base ein Stopcodon entsteht. Drei Fälle lassen eine Verschiebung des Leserasters (frame shift) erkennen, zweimal sind Introns von der Mutation betroffen. 26 Mutationen liegen in der DNA-Bindungsdomäne (87%), eine Mutation betrifft die Oligomerisierungsdomäne, drei Mutationen betreffen keine funktionelle Domäne (zwei Intron- und eine Nonsense-Mutation). Transitionen ($n = 14$) sind häufiger als Transversionen ($n = 12$). Tabelle 16 fasst die Ergebnisse der Mutationsanalyse zusammen.

Die Mehrheit der *TP53*-Mutationen sind damit Missense-Mutationen in den Exons 5 bis 8 ($17/30 = 57\%$) (Abbildung 9). Am häufigsten betroffen ist Exon 5 mit acht Mutationen. Es kommen vier der sechs häufigsten „hotspots“ vor. Mit 7% ist die Mutation p.Y220C vertreten.

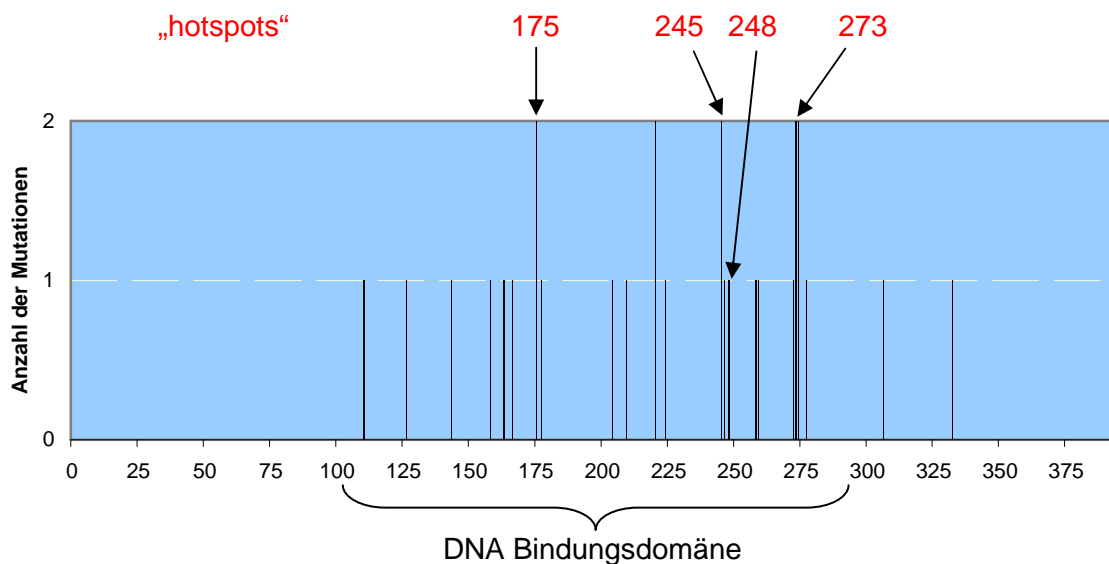


Abbildung 9: Grafische Darstellung der Verteilung der *TP53*-Mutationen

26 der 30 Mutationen in Exons liegen innerhalb der DNA-Bindungsdomäne. Es kommen vier der sechs häufigsten „hotspots“ vor (nach Brosh und Rotter 2009). Die Zahlen der „hotspots“ bezeichnen das betroffene Codon.

Tabelle 16: Ergebnisse der Sequenzanalyse

Es werden 30 *TP53*-Mutationen bei 27 Patienten gefunden. Mutationen, die bei demselben Patienten auftreten, sind in der gleichen Farbe markiert. Hoch konservierte Domänen umfassen folgende Codons: II 117-142, III 171-181, IV 234-250, V 270-286 (Malkin 2001). Die Codonverteilung der funktionellen Domänen lautet: DNA-Bindung 102-292, Tetramerisierung 325-356 (s. Kapitel 1.2.2).

Abkürzungen (engl.): *bp* = Basenpaare (deutsch), *D* = DNA-Bindung (deutsch), *del* = deletion, *fs* = frame shift, *ins* = insertion, *ms* = missense, *n.a.* = nicht auswertbar (deutsch), *ns* = nonsense, *T* = Tetramerisierung (deutsch), *Ts* = transition, *Tv* = transversion

p53 Exon	17p13-Deletion (1=ja, 0=nein)	Codon und Aminosäure-Austausch	Position und Basenaustausch	hot spot (1=ja, 0=nein)	Tv=Transversion, Ts=Transition	Mutation (ns=nonsense, ms=missense, fs= frame shift, del=deletion)	Hoch konservierte Domäne (I-V)	Restaktivität des p53 (≤10,79 ist niedrig)	Funktionelle Domäne (D=DNA-Bindung, T=Tetramerisierung)
10	n.a.	p.I332N	c.995T>A	0	Tv	ms	-	6,84	T
Intron 9	n.a.	-	c.994-9T>G	0	Tv	intron	-	n.a.	-
8	1	p.R306X	c.916C>T	0	Ts	ns	-	0	-
8	1	p.C277X	c.831T>A	0	Tv	ns	V	0	D
8	0	p.V274G	c.821T>G	0	Tv	ms	V	5,25	D
8	0	p.V274D	c.821T>A	0	Tv	ms	V	1,32	D
8	0	p.R273H	c.818G>A	1	Ts	ms	V	1,01	D
8	1	p.R273H	c.818G>A	1	Ts	ms	V	1,01	D
8	1	p.V272L	c.814G>T	0	Tv	ms	V	7,06	D
7	0	p.D259V	c.776A>T	0	Tv	ms	-	10,87	D
7	0	p.E258K	c.772G>A	1	Ts	ms	IV	0,31	D
7	0	p.R248Q	c.743G>A	1	Ts	ms	IV	0	D
7	1	p.M246V	c.736A>G	0	Ts	ms	IV	0	D
7	1	p.G245D	c.734G>A	1	Ts	ms	IV	1,95	D
7	0	p.G245S	c.733G>A	1	Ts	ms	IV	0	D
6	1	p.E224X	c.670G>T	0	Tv	ns	-	0	D
6	1	p.Y220C	c.659A>G	1	Ts	ms	-	1,21	D
6	n.a.	p.Y220C	c.659A>G	1	Ts	ms	-	1,21	D
6	0	p.R209KfsX6	c.626_627del2bp	0	-	fs	-	n.a.	D
6	1	p.E204GfsX44	c.610_611insGG	0	-	fs	-	n.a.	D
5	n.a.	p.P177_S182del	c.529_546del18bp	0	-	del	III	n.a.	D
5	0	p.R175H	c.524G>A	1	Ts	ms	III	12,41	D
5	0	p.R175H	c.524G>A	1	Ts	ms	III	12,41	D
5	n.a.	p.S166X	c.497C>G	0	Tv	ns	-	0	D
5	1	p.Y163C	c.488A>G	1	Ts	ms	-	18,30	D
5	n.a.	p.R158H	c.473G>A	1	Ts	ms	-	8,78	D
5	0	p.V143VfsX25	c.429_435del7bp	0	-	fs	-	n.a.	D
5	0	p.Y126X	c.378C>G	0	Tv	ns	II	0	D
Intron 4	n.a.	-	c.375+5 G>T	0	Tv	intron	-	n.a.	-
4	n.a.	p.R110P	c.329G>C	0	Tv	ms	-	10,79	D

3.2.2 Alleinige *TP53*-Mutation und alleinige 17p13-Deletion

Bei Patienten, die eine *TP53*-Mutation ohne 17p13-Deletion aufweisen, überwiegen in zehn von elf Fällen die mutierten Allele (Wildtyp < 50%). Dieses Phänomen lässt sich durch eine pUPD erklären (s. Kapitel 1.2.4.). Bei allen Patienten mit 17p13-Deletion ohne *TP53*-Mutation, bei denen prozentuale Deletionsdaten vorhanden sind (4/9), beträgt diese Deletion über 60%.

3.3 Prognostische Bedeutung von *TP53*-Aberrationen

3.3.1 *TP53*-Mutation

Um die Auswirkung der *TP53*-Mutation auf das untersuchte Patientenkollektiv zu beurteilen, wird das Gesamtüberleben in Bezug auf das Vorhandensein einer *TP53*-Mutation betrachtet. Patienten ohne *TP53*-Mutation zeigen ein Gesamtüberleben von 61,4 Monaten ($n = 59$), Patienten mit *TP53*-Mutation überleben im Mittel mit 32 Monaten signifikant kürzer ($n = 24$; $p < 0,001$; s. Abbildung 10).

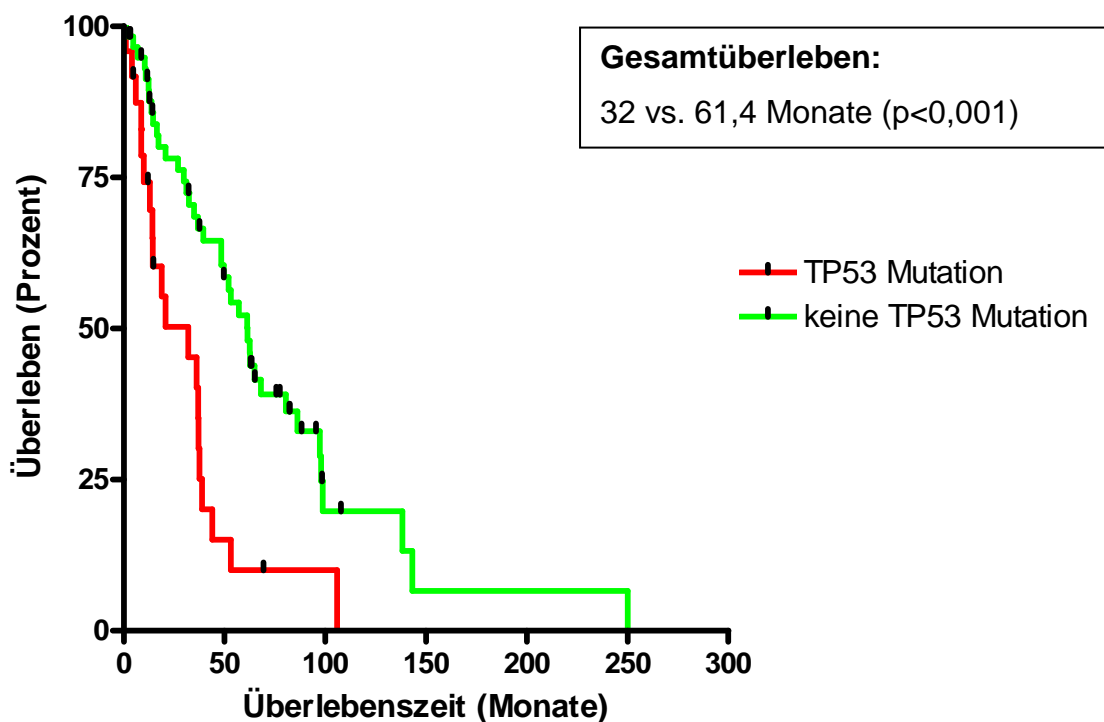


Abbildung 10: Gesamtüberleben mit und ohne *TP53*-Mutation

Kaplan-Meier-Kurven des Gesamtüberlebens von MCL-Patienten mit vs. ohne *TP53*-Mutation. Die schwarzen Punkte auf den Kurven zeigen lebende Patienten zum Zeitpunkt des letzten Kontakts an. Das Gesamtüberleben ist bei Patienten mit *TP53*-Mutation signifikant verkürzt.

Die Gesamtansprechraten (komplette und partielle Remission) auf die angewandten unterschiedlichen Therapien ist bei Patienten mit *TP53*-Mutation signifikant erniedrigt. Während nur neun von 23 Patienten mit *TP53*-Mutation (39%) eine Remission erreichen, gelingt dies bei 41 von 53 Patienten ohne Mutation (77%; $p = 0,0031$). Betrachtet man die Fälle ohne Ansprechen der Therapie, findet sich bei 14 von 26 Patienten (54%) eine *TP53*-Mutation.

3.3.2 17p13-Deletion

Patienten mit 17p13-Deletion ($n = 16$) haben mit 29,7 Monaten kein signifikant kürzeres Gesamtüberleben als Patienten ohne 17p13-Deletion ($n = 63$) mit 48,3 Monaten ($p = 0,5066$). Auch die Ansprechraten sind nicht signifikant verschieden ($p = 0,1471$).

3.3.3 Alleinige *TP53*-Mutation und alleinige 17p13-Deletion

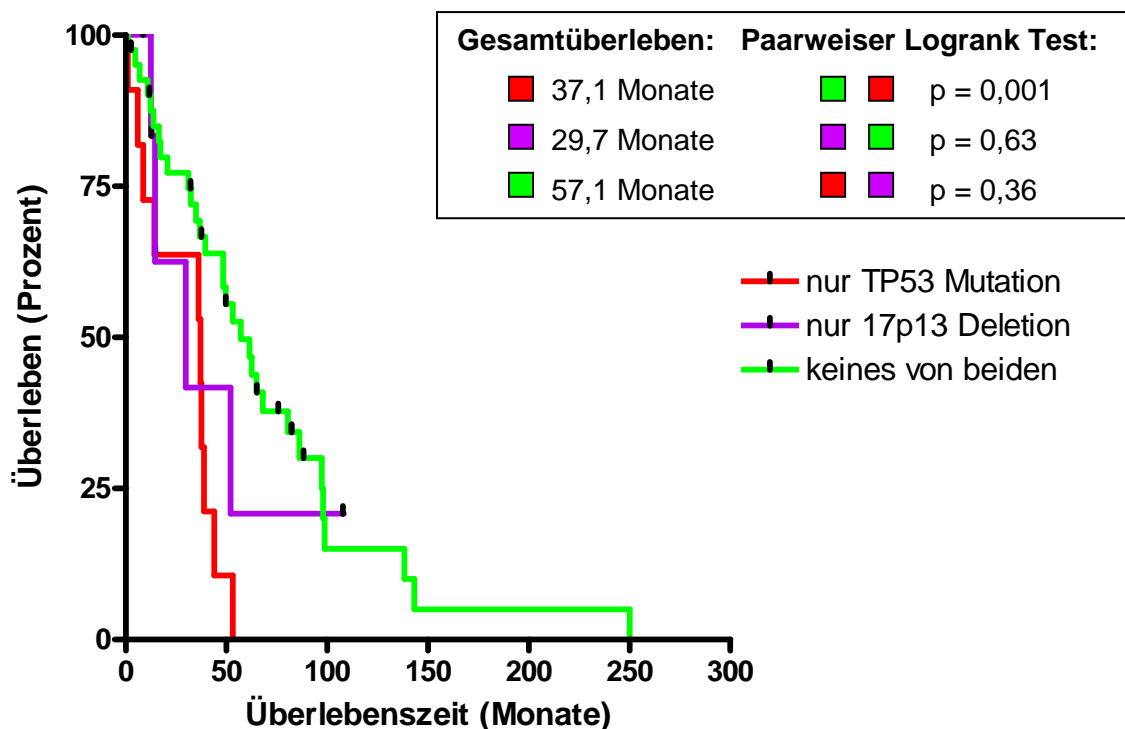


Abbildung 11: Gesamtüberleben mit alleiniger *TP53*-Mutation, alleiniger 17p13-Deletion und ohne *TP53*-Aberration

Kaplan-Meier-Kurven des Gesamtüberlebens von MCL-Patienten mit alleiniger *TP53*-Mutation vs. alleiniger 17p13-Deletion vs. ohne *TP53*-Aberration. Im Logrank-Test zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit alleiniger *TP53*-Mutation und Patienten ohne *TP53*-Aberration. „Alleinige“ oder „nur“ *TP53* Mutation bedeutet in diesem Fall, dass die *TP53*-Mutation die einzige *TP53*-Aberration darstellt, andere genomische Aberrationen sind hier nicht berücksichtigt.

Beim genaueren Aufschlüsseln der Patienten mit *TP53*-Aberrationen ergeben sich folgende Gruppen: Patienten mit *TP53*-Mutation ohne 17p13-Deletion werden als Patienten mit alleiniger *TP53*-Mutation bezeichnet ($n = 11$). Patienten mit 17p13-Deletion ohne *TP53*-Mutation bilden die Gruppe mit alleiniger 17p13-Deletion ($n = 7$). Im Vergleich dazu werden Patienten ohne eine der beiden Aberrationen betrachtet ($n = 41$). Im paarweisen Logrank-Test sind nur die Gruppen „alleinige *TP53*-Mutation“ vs. „keine *TP53*-Aberration“ signifikant unterschiedlich ($p = 0,001$, s. Abbildung 11). Obwohl die Überlebenskurve der Patienten mit alleiniger 17p13-Deletion derjenigen mit alleiniger *TP53*-Mutation ähnelt, besitzen erstere kein signifikant kürzeres Überleben als Patienten ohne Aberration. Dies könnte durch die relativ kleine Fallzahl bedingt sein. Die Gruppe *TP53*-Mutation mit 17p13-Deletion ($n = 8$) ist im paarweisen Logrank-Test nicht signifikant unterschiedlich zu Patienten mit alleiniger *TP53*-Mutation ($p = 0,42$).

3.4 Prognostische Bedeutung chromosomaler Aberrationen

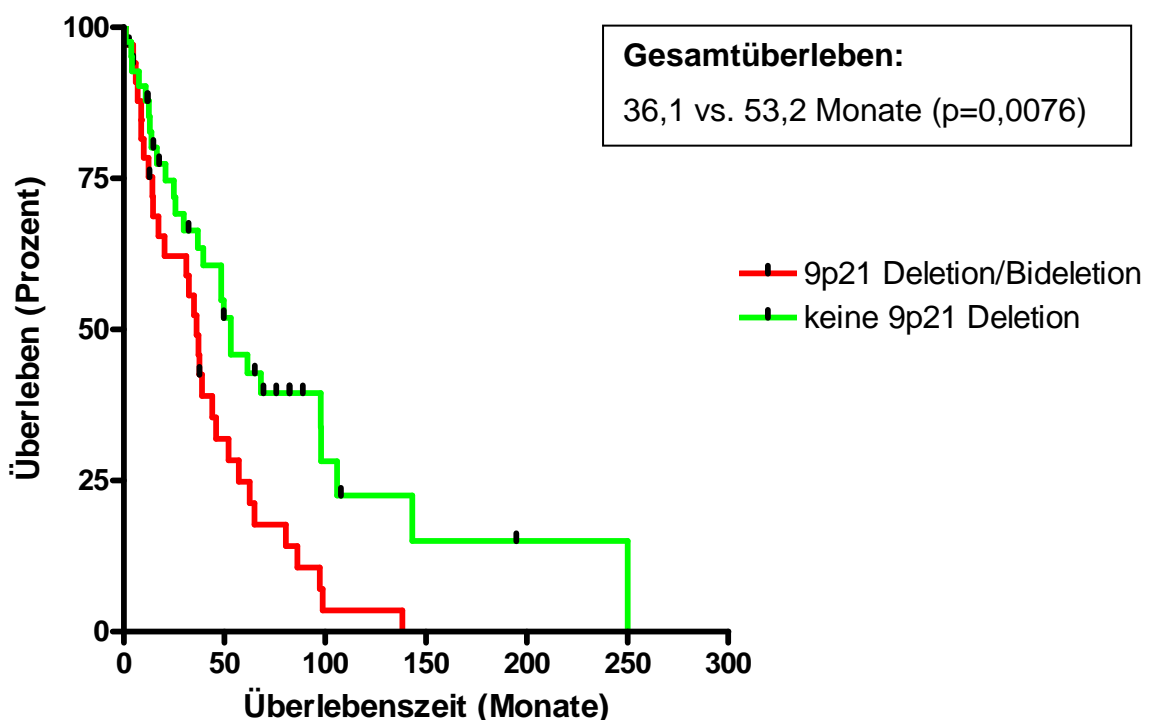


Abbildung 12: Gesamtüberleben mit und ohne 9p21-Deletion/Bideletion

Kaplan-Meier-Kurven des Gesamtüberlebens von MCL-Patienten mit vs. ohne 9p21-Deletion/Bideletion. Das Gesamtüberleben ist bei Patienten mit 9p21-Deletion/Bideletion signifikant verkürzt.

Um die Auswirkung chromosomaler Aberrationen beim MCL zu beurteilen, wird das Gesamtüberleben in Bezug auf das Vorhandensein einer chromosomalen Aberration betrachtet. Dabei sind zwei Aberrationen signifikant mit kürzerem Überleben verbunden. Patienten mit 9p21-Deletion oder biallelischer 9p21-Deletion zeigen ein Gesamtüberleben von 36,1 Monaten ($n = 34$), bei Patienten ohne 9p21-Deletion sind es 53,2 Monate ($n = 41$; $p = 0,0076$, s. Abbildung 12). Patienten mit 13q14-Deletion oder 13q14-Bideletion überleben signifikant kürzer (37,1 Monate; $n = 38$) als Patienten ohne diese Deletion (61,4 Monate; $n = 41$; $p = 0,0202$, s. Abbildung 13).

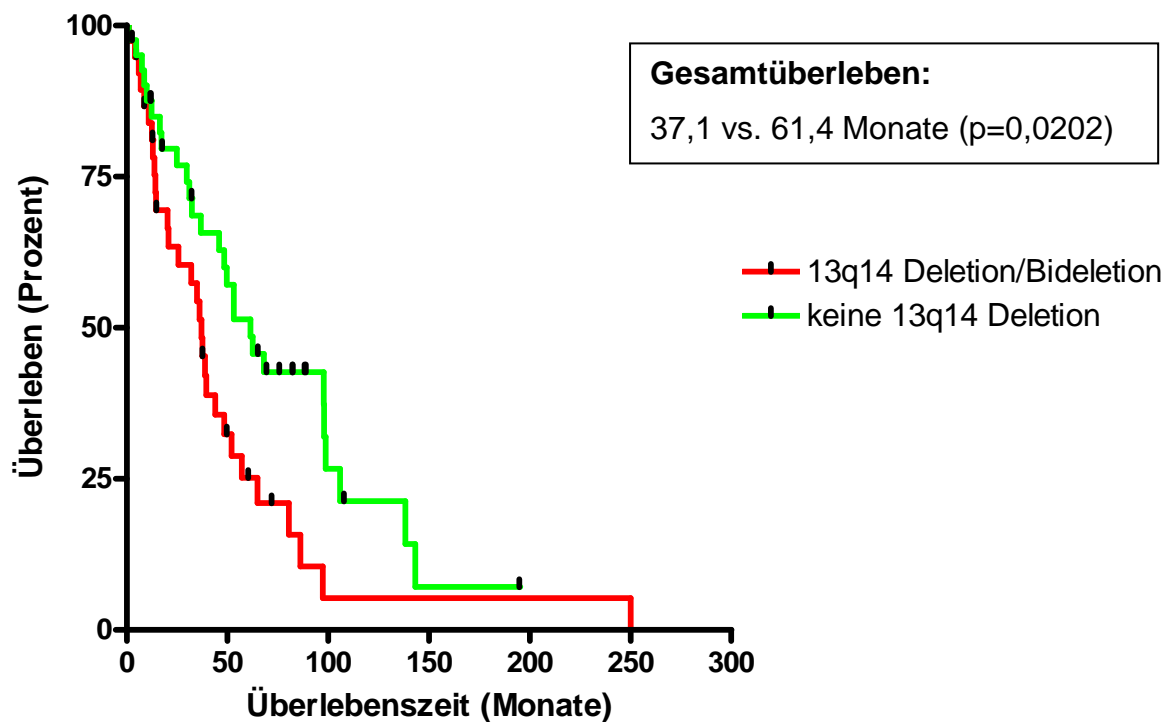


Abbildung 13: Gesamtüberleben mit und ohne 13q14-Deletion/Bideletion

Kaplan-Meier-Kurven des Gesamtüberlebens von MCL-Patienten mit vs. ohne 13q14-Deletion/Bideletion. Das Gesamtüberleben ist bei Patienten mit 13q14-Deletion/Bideletion signifikant verkürzt.

3.5 Assoziation von *TP53*-Aberrationen mit chromosomalen Aberrationen

Um Unterschiede zwischen Patienten mit *TP53*-Mutationen und Patienten mit 17p13-Deletion zu finden und um mögliche Einflüsse auf das signifikant geringere Überleben von Patienten mit *TP53*-Mutation, 9p21-Deletion und 13q14-Deletion

aufzudecken, werden die Korrelationen zwischen *TP53*-Mutationen und Deletionen in 9p21, 13q14 und 17p13 mit dem exakten Test nach Fisher untersucht.

TP53-Mutationen sind signifikant mit 17p13-Deletionen assoziiert. *TP53*-Mutationen besitzen zusätzlich eine signifikante Assoziation zu 13q14-Deletionen sowie 9p21-Deletionen (s. Abbildung 14), 17p13-Deletionen zeigen diese Assoziation nicht ($p = 0,3062$ sowie $p = 0,7889$).

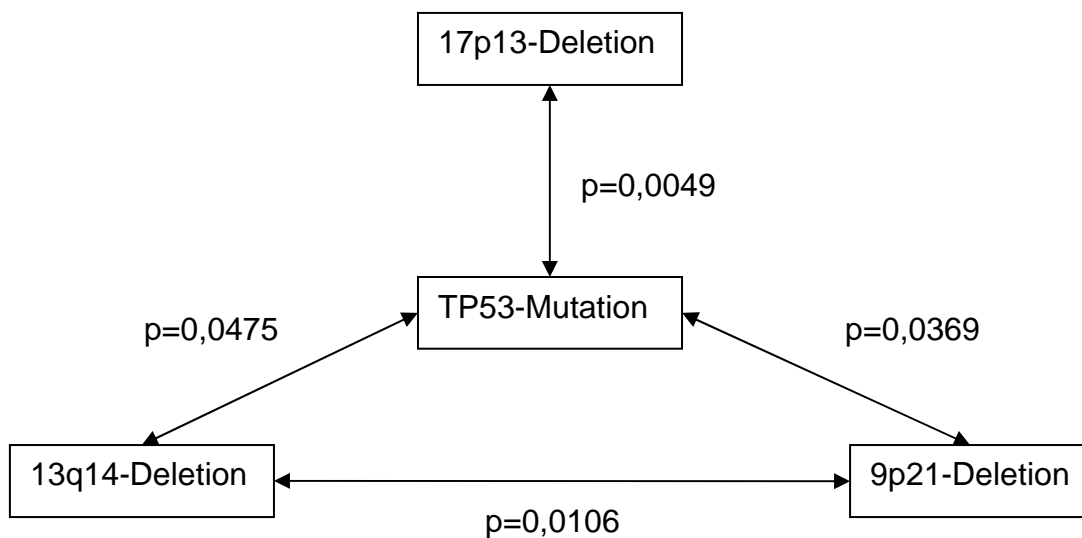


Abbildung 14: Korrelationen zwischen *TP53*-Aberrationen und chromosomalen Aberrationen

Es wird der exakte Test nach Fisher angewendet. Bideletionen werden auch als Deletionen gewertet. Verbindungen mit $p > 0,05$ werden nicht eingezeichnet.

Abkürzungen: p = p -Wert = Signifikanzwert

3.6 Bedeutung anderer prognostischer Faktoren

Es werden folgende, in früheren Untersuchungen unabhängige prognostische Faktoren im Hinblick auf das Gesamtüberleben untersucht: Ki-67 Wert, IPI und MIPI. Alle drei sind signifikant mit dem Gesamtüberleben verknüpft.

Patienten mit einem Ki-67 Wert über 40% zeigen ein Gesamtüberleben von 20,2 Monaten ($n = 15$), Patienten mit einem kleineren Wert überleben durchschnittlich 62,5 Monate ($n = 30$; $p = 0,0004$). Der MIPI sowie der IPI sind stark mit dem Gesamtüberleben assoziiert ($p = 0,004$ und $p = 0,005$ im Trend-Logrank-Test). Patienten mit hohem MIPI-Risiko überleben durchschnittlich 16,4 Monate ($n = 18$), mit mittlerem Risiko 36,8 Monate ($n = 16$) und mit niedrigem Risiko 53,2 Monate (n

= 13; s. Abbildung 15). Der MIPIb kann noch genauere Risikogruppen bezüglich des Überlebens bilden (26,9 (n = 18) vs. 58,7 (n = 12) vs. 151,6 (n = 4) Monate), gruppiert aber mehr als 50% der Patienten in die hohe Risikogruppe. Keiner der untersuchten Faktoren korreliert signifikant mit *TP53*-Mutationen.

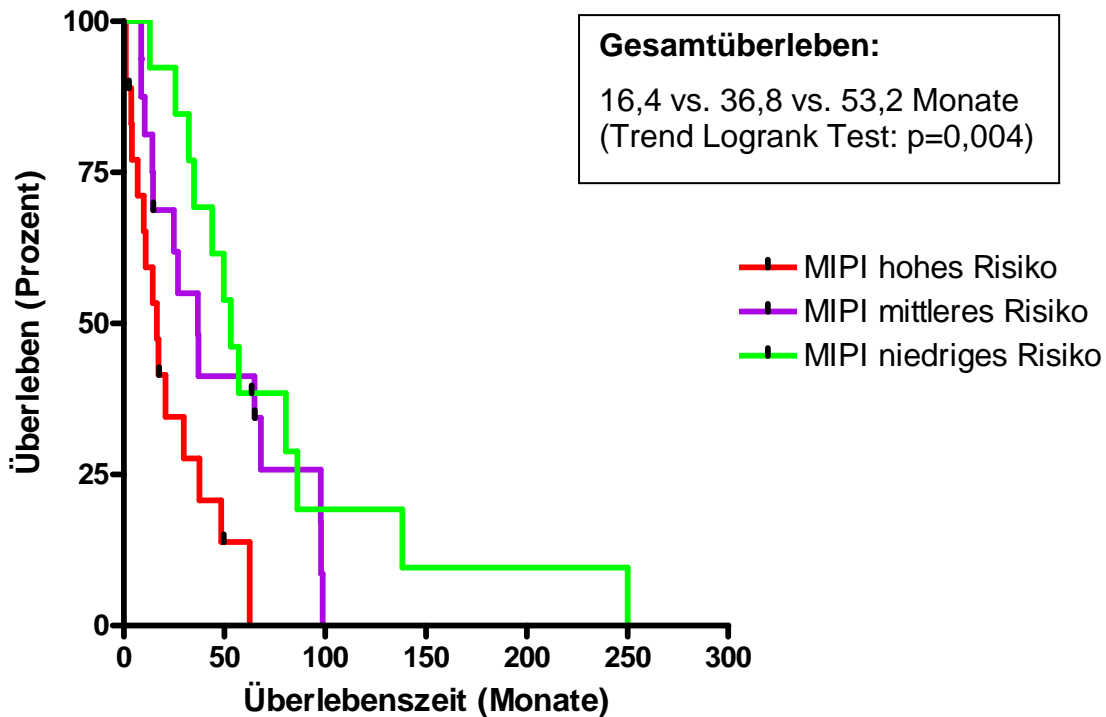


Abbildung 15: Gesamtüberleben bezüglich des MIPI-Risikos

Kaplan-Meier-Kurven des Gesamtüberlebens von MCL-Patienten mit hohem vs. mittlerem vs. niedrigem MIPI-Risiko. Das Gesamtüberleben ist signifikant mit der MIPI-Risikogruppe assoziiert. Abkürzung (engl.): *MIPI = Mantle Cell Lymphoma International Prognostic Index*

3.7 Multivariates Modell

Zur Bestätigung eines unabhängigen prognostischen Einflusses der *TP53*-Mutation wird eine multivariate Analyse mit dem Modell der Cox-Regression hinsichtlich des Gesamtüberlebens durchgeführt. In diesem Modell, das *TP53*-Mutationen, 17p13-Deletionen, 9p21-Deletionen und 13q14-Deletionen berücksichtigt, erscheint nur die *TP53*-Mutation als möglicher unabhängiger Marker (p = 0,061; s. Tabelle 17).

Sucht man durch Rückwärtsselektion der Variablen nach einem besseren Prognosemodell, erhält man ein Modell mit den Markern *TP53*-Mutation und 9p21-Deletion. Das Modell mit den Variablen *TP53*-Mutation und 9p21-Deletion ist besser als eines ohne die Variable 9p21-Deletion (s. Tabelle 18). Es besteht also

ein Zugewinn für die Prognoseaussage bei der Verwendung des Markers 9p21-Deletion zusätzlich zur *TP53*-Mutation.

Tabelle 17: Multivariates Modell

Die Variablen *TP53*-Mutation, 17p13-Deletion, 9p21-Deletion und 13q14-Deletion sind im multivariaten Modell nicht mehr signifikant mit dem Gesamtüberleben assoziiert. Für *TP53*-Mutationen zeigt sich mit einem p-Wert von 0,061 ein Trend.

Abkürzungen: *coef* = Koeffizient, *exp(coef)* = Hazard ratio, *p-Wert* = Signifikanzwert

	coef	exp(coef)	p-Wert
<i>TP53</i> -Mutation	0,6615	1,94	0,061
17p13-Deletion	0,0282	1,03	0,950
9p21-Deletion	0,5317	1,70	0,120
13q14-Deletion	0,3833	1,47	0,270

Tabelle 18: Multivariates Modell nach Rückwärtsselektion

Die Variablen *TP53*-Mutation und 9p21-Deletion korrelieren in diesem Modell signifikant mit dem Überleben.

Abkürzungen: *coef* = Koeffizient, *exp(coef)* = Hazard ratio, *p-Wert* = Signifikanzwert

	coef	exp(coef)	p-Wert
<i>TP53</i> -Mutation	0,708	2,03	0,033
9p21-Deletion	0,700	2,01	0,020

4 Diskussion

Durch die Identifikation von biologischen Prognoseparametern können Pathomechanismen und damit das unterschiedliche Therapieansprechen besser verstanden werden. Beim MCL konnten bereits wichtige unabhängige Prognoseparameter, wie der Ki-67 Wert, chromosomale Aberrationen (3q-/9q-Deletionen), klinische Indices (MIPI, IPI) oder die Proliferationssignatur bestimmt werden (s. Kapitel 1.1.8.). Bezüglich der *TP53*-Mutation als Prognoseparameter finden sich einige Veröffentlichungen, aber keine Bestätigung durch ein multivariates Modell, die 17p13-Deletion als Prognoseparameter ist umstritten (s. Kapitel 1.1.8.). Zur genaueren Differenzierung beider Aberrationen bezogen auf das Überleben (z.B. alleinige *TP53*-Mutationen) sowie auf Assoziationen mit anderen chromosomalen Aberrationen liegen kaum Arbeiten vor (s. Kapitel 4.1., 4.3. und 4.5.).

4.1 Inzidenz von *TP53*-Mutationen, 17p13-Deletionen, 9p21-Deletionen und 13q14-Deletionen

Die Inzidenz der *TP53*-Mutationen von 25% bei den hier untersuchten Patienten liegt über der bisher in der Literatur beschriebenen von ca. 15% bis 19,5% (Greiner et al. 2006: Exon 5-8, Halldórsdóttir et al. 2011: Exon 4-8). Tabelle 19 vergleicht die Inzidenzen verschiedener *TP53*-Aberrationen der untersuchten Patienten mit anderen Studien. Die relativ großen Unterschiede zwischen den Untersuchungen könnten durch die allseits kleine Fallzahl sowie durch die verschiedene Anzahl untersuchter Exons zustande kommen.

Tabelle 19: Inzidenzvergleich der *TP53*-Aberrationen mit anderen Studien

	Alleinige <i>TP53</i> -Mutation	Alleinige <i>TP53</i> -Deletion	<i>TP53</i> -Mutation und -Deletion
Greiner et al. 2006 (Exon 5-8)	15,9% (13/82)	6,1% (5/82)	3,7% (3/82)
Beà et al. 2009 (Exon 4-11)	7,1% (2/28)	0% (0/28)	7,1% (2/28)
Halldórsdóttir et al. 2011 (Exon 4-8)	7,6% (9/119)	24,4% (29/119)	7,6% (9/119)
Vorliegende Arbeit (Exon 4-10)	12,8% (11/86)	10,5% (9/86)	10,5% (9/86)

Die Inzidenzen der für die Arbeit relevanten chromosomalen Aberrationen sind in Tabelle 20 zusammengefasst. Sie sind mit früheren Ergebnissen vergleichbar.

Tabelle 20: Inzidenzvergleich relevanter chromosomaler Aberrationen mit anderen Studien

Die Inzidenzen sind mit den aufgelisteten Arbeiten vergleichbar.

Abkürzungen: *Del* = *Deletion*

	9p21 Del	13q14 Del	17p13 Del
Swerdlow et al. 2008	18-31%	43-51% ¹	21-45% ²
Jares und Campo 2008	18-41% ³	25-70% ¹	13-45% ²
Vorliegende Arbeit	40% (38/95)	45% (45/100)	19% (19/100)

4.2 Verteilung und Art der *TP53*-Aberrationen

Missense-Mutationen sind im Einklang mit früheren Ergebnissen die häufigsten Mutationen (Greiner et al. 2006). Die Häufigkeit der Mutation p.Y220C mit 7% ist vor dem Hintergrund einer spezifischen Medikamentenentwicklung für diese Mutation interessant (Boeckler et al. 2008).

Im Unterschied zu vielen anderen Studien wird nicht nur die DNA-Bindungs-Domäne bei der Mutationsanalyse betrachtet, sondern Exon 4 bis 10. Dabei treten vier von 30 Mutationen (13%) in Regionen außerhalb der DNA-Bindungs-Domäne sowie außerhalb der Exons 5 bis 8 auf. Dies stimmt mit einer Untersuchung von Hjortsberg et al. überein, nach der bei einer ausschließlichen Berücksichtigung der Exons 5 bis 8 mindestens 10% der *TP53*-Mutationen nicht entdeckt werden (Hjortsberg et al. 2008).

Bei den untersuchten Patienten mit alleiniger *TP53*-Mutation überwiegen in zehn von elf Fällen die mutierten Allele (Wildtyp < 50%). Dieses Phänomen lässt sich durch eine pUPD erklären (s. Kapitel 1.2.4.). Regionen mit häufig auftretenden Deletionen, z. B. 11q, 13q oder 17p13.1 (*TP53*-Locus) sind beim MCL oft von einer pUPD betroffen (Vater et al. 2008). Der kurze Arm des Chromosoms 17 gehört zu den Regionen, die am häufigsten von einer pUPD betroffen sind (6%), oft mit einer *TP53*-Mutation zusammen (Hartmann et al. 2010). Bei einer Studie an 28 MCL-Patienten trat in zwei von vier Fällen mit *TP53*-Mutation ohne 17p13-Deletion eine pUPD auf (Beà et al. 2009). In diesen Fällen war das *TP53*-Gen inaktiv. Die Häufigkeit des pUPD-Phänomens (das auf einem Chromosomenbruch beruht) könnte die erhöhte genomische Instabilität des MCL im Vergleich zu anderen hämatologischen Neoplasmen reflektieren (Beà et al. 2009).

¹ 13q14-13q34 Del

² 17p13-17pter Del

³ 9p21-9p22 Del

Das gehäufte Auftreten von *TP53*-Mutationen bei Patienten mit 17p13-Deletionen spricht dafür, dass die Inaktivierung von p53 für den klinischen Verlauf der Fälle mit 17p13-Deletion mitverantwortlich sein könnte. Eine Kombination von Mutation des einen und Deletion des anderen Allels führt zur kompletten Inaktivierung der p53-Funktion. Eine signifikante Korrelation zwischen p53-Alterationen (p53-Expressionsalteration oder p53-Mutation) und 17p13.1-Deletionen beim MCL wurde bereits beschrieben (Hutter et al. 2009). Die Assoziationsrate der vorliegenden Arbeit zwischen 17p13-Deletionen und *TP53*-Mutationen ist mit 50% aber niedriger als bei der CLL, bei der bis zu 94% (17/18) der Patienten mit 17p-Deletion eine *TP53*-Mutation aufweisen (Dicker et al. 2009). Dies könnte darauf hinweisen, dass beim MCL kein vergleichbar großer selektiver Druck für Verluste der p53-Funktion in beiden Allelen besteht wie bei der CLL.

4.3 Prognostische Bedeutung von *TP53*-Aberrationen

Eine Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse zu *TP53*-Aberrationen sowie 9p21- und 13q14-Deletionen als univariate Prognoseparameter zeigt Tabelle 21. In der vorliegenden Arbeit kann eine *TP53*-Mutation als Prognosefaktor bestätigt werden. Im univariaten Modell ist die *TP53*-Mutation mit dem Gesamtüberleben vergesellschaftet, in einem multivariaten Modell mit anderen chromosomalen Abberationen zeigt sich ein Trend ($p = 0,061$). Damit kann eine Studie an einer kleinen Anzahl von MCL-Patienten ($n = 62$, Exon 5-8) bekräftigt werden, in der ebenfalls ein Trend ($p = 0,098$) für *TP53*-Alterationen (p53-Überexpression und / oder *TP53*-Mutation) in einer multivariaten Analyse festgestellt wurde (Slotta-Huspenina et al. 2012). Beide Studien weisen darauf hin, dass *TP53*-Mutationen ein unabhängiger Prognoseparameter sind. Hier würde eine noch größere Studie mit entsprechender Fallzahl Klarheit schaffen. 17p13-Deletionen sind bei dem untersuchten Patientenkollektiv nicht signifikant mit dem Gesamtüberleben assoziiert. Es kann damit ein weiterer wichtiger Hinweis für die umstrittene Bedeutung der 17p13-Deletion als Prognosefaktor beim MCL erbracht werden (s. Tabelle 21).

Interessanterweise ist auch die Gesamtansprechrate (komplette und partielle Remission) bei Patienten mit *TP53*-Mutation im Vergleich zu Patienten ohne diese Mutation erniedrigt. Bezüglich einer 17p13-Deletion kann ein solcher Unterschied

nicht festgestellt werden. Es soll aber betont werden, dass es sich um verschiedene Therapieregime handelt, was die Interpretation dieses Ergebnisses erschwert.

Tabelle 21: Zusammenfassung der bisherigen und in dieser Arbeit gewonnenen Daten zur Korrelation zwischen Gesamtüberleben und Aberrationen in 17p13, 9p21 und 13q14 beim Mantelzell-Lymphom

Eine positive Korrelation wird bei einem p-Wert < 0,05 angenommen.

Abkürzungen: *ARF* = alternative reading frame (engl.), *BMI1* = B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog (engl.), *Del* = Deletion, *INK4A* = inhibitor of kinase 4 (engl.), *Mut* = Mutation, *n* = Anzahl der untersuchten Patienten, *OS* = overall survival (engl.), *p* = p-Wert

Prognosefaktor der mit dem Gesamtüberleben korreliert	<i>TP53</i> Mut	17p13 Del	9p21 Del	13q14 Del
Halldórsdóttir et al. 2011 (n = 119)	ja	nein ⁴	n.a.	n.a.
Espinet et al. 2010 (n = 145)	n.a.	ja ⁵	n.a.	ja ⁶
Hartmann et al. 2010 (n = 77)	ja	n.a.	ja ⁷	n.a.
Jares und Campo 2008 (review)	ja ⁸	ja ⁹	ja ¹⁰	n.a.
Katzenberger et al. 2008 (n = 223)	Trend ¹¹	n.a.	ja	ja
Greiner et al. 2006 (n = 92)	ja	Trend ¹²	n.a.	n.a.
Rubio-Moscardo et al 2005 (n = 68)	n.a.	ja ¹³	ja ¹⁴	n.a.
Kohlhammer et al. 2004 (n = 36)	n.a.	nein	Trend ¹⁵	ja
Rosenwald et al. 2003 (n = 101)	n.a.	nein	ja	n.a.
Allen et al. 2002 (n = 30)	n.a.	ja ¹⁶	n.a.	n.a.
Greiner et al. 1996 (n = 53)	ja	n.a.	n.a.	n.a.
Vorliegende Arbeit (n = 122)	ja	nein	ja	ja

Um die Patienten mit *TP53*-Aberrationen genauer aufzuschlüsseln, wird die Überlebenszeit von Patienten mit alleiniger *TP53*-Mutation und Patienten mit alleiniger 17p13-Deletion im Vergleich zu Patienten ohne *TP53*-Aberration

⁴ 17p-Deletionen haben keinen Einfluss auf das OS ($p = 0,7$).

⁵ 17p-Deletionen korrelieren signifikant mit dem OS in einer multivariaten Analyse.

⁶ 13q-Deletionen korrelieren signifikant mit dem OS in einer univariaten Analyse.

⁷ Homozygote Verluste von 9p21.3 oder Verluste von 9p korrelieren signifikant mit dem OS.

⁸ *TP53*-Aberrationen korrelieren signifikant mit dem OS.

⁹ 17p-Deletionen korrelieren signifikant mit dem OS.

¹⁰ 9p-Deletionen korrelieren signifikant mit dem OS.

¹¹ Eine p53-Expression von mindestens 20% korreliert mit dem OS ($p = 0,07$).

¹² $p = 0,08$

¹³ 17p13.1-Deletionen korrelieren signifikant mit dem OS in einer multivariaten Analyse.

¹⁴ 9p21.3-Deletionen korrelieren signifikant mit dem OS.

¹⁵ Proben mit *INK4A/ARF*-Deletionen oder *BMI1*-Zugewinnen korrelieren mit dem OS ($p = 0,052$).

¹⁶ 17p-Deletionen korrelieren signifikant mit dem OS.

betrachtet. Im Einklang mit den übrigen Ergebnissen unterscheidet sich die Gruppe der alleinigen *TP53*-Mutationen bezüglich des Überlebens signifikant von Patienten ohne *TP53*-Aberration. Bei Patienten mit alleiniger 17p13-Deletion ist kein solcher Unterschied festzustellen, obwohl die Überlebenskurve derjenigen der alleinigen *TP53*-Mutationspatienten ähnelt. Des Weiteren können Ergebnisse von Halldórsdóttir et al. bestätigt werden, die keinen signifikanten Überlebenszeitunterschied zwischen Patienten mit alleiniger *TP53*-Mutation und solchen mit einer Kombination aus *TP53*-Mutation und 17p13-Deletion feststellen konnten (Halldórsdóttir et al. 2011). Es muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass die Fallzahlen der hier analysierten Untergruppen gering sind und deshalb eine vorsichtige Ergebnisinterpretation nötig ist.

Die hier erzielten Ergebnisse weisen zum einen darauf hin, dass sich eine *TP53*-Mutation beim MCL negativ auf die Prognose auswirkt und zum anderen, dass sie prognostisch relevanter sein könnte als eine 17p13-Deletion.

Eine Erklärungsmöglichkeit für diese Ergebnisinterpretation kann die Betrachtung von Genexpressionsanalysen geben. Es konnte gezeigt werden, dass MCL-Patienten mit *TP53*-Punktmutationen im Vergleich zu Patienten mit zwei Wildtypallelen 20 Gene verändert exprimieren (Greiner et al. 2006). 27 Gene waren bei Patienten mit einer genomischen *TP53*-Deletion anders exprimiert als bei Patienten mit zwei Wildtypallelen, wovon nur drei Gene mit den bei einer Punktmutation veränderten übereinstimmten (Greiner et al. 2006). Darunter ist *XPC*, ein p53-reguliertes Gen, das durch Fludarabin-Therapie bei der CLL induziert wird und somit ein gemeinsames, potentiell Zielgen bei *TP53*-Aberrationen darstellt (Greiner et al. 2006). Das Gen *ASPM* (*abnormal spindle-like microcephaly-associated*) dagegen ist nur bei Patienten mit *TP53*-Punktmutationen hochreguliert, im Gegensatz zu Patienten mit einer *TP53*-Deletion (Greiner et al. 2006). *ASPM* ist Teil der Proliferationssignatur nach Rosenwald (Rosenwald et al. 2003, s. Kapitel 1.1.8.) und die *ASPM*-Expression gilt als unabhängiger Prognoseparameter beim MCL (Kienle et al. 2007). Die unterschiedliche Regulierung von *ASPM* bei Patienten mit *TP53*-Mutation und solchen mit *TP53*-Deletion könnte damit zur Erklärung eines möglichen Prognoseunterschieds der Aberrationen beitragen. Die Expression von p53 selbst war in einer Studie von Greiner et al. bei keiner der *TP53*-Aberrationen beim MCL verändert (Greiner et al. 2006). In einer anderen Untersuchung dagegen waren

genomische Verluste der Loci *TP53* und *RB1* signifikant mit einem reduzierten Transkriptionslevel und damit einer reduzierten Genexpression assoziiert (Kienle et al. 2007). Dies deutet auf einen Gen-dosierten transkriptionischen Effekt der 17p13-Deletion beim MCL hin (Kienle et al. 2007).

Einen weiteren Unterschied zwischen 17p13-Deletionen und *TP53*-Mutationen könnte ein Verlust der Region 17p13.3 darstellen, der bei ca. 50% der MCL-Fälle vorkommen soll (Hutter et al. 2009) und grenzwertig mit einem Verlust in 17p13.1 korreliert ($p = 0,052$, Scheubner 2009). In der Region 17p13.3 befindet sich u.a. *HIC1* (Hypermethylated in cancer 1), ein Tumorsuppressorgen, das in einer „Feedback“-Regulation mit p53 beteiligt ist (Hutter et al. 2009). *HIC1* behindert dabei die Histondeacetylase SIRT1, die wiederum p53 behindert (Chen et al. 2005). Wird *HIC1* inaktiviert (z.B. durch eine Deletion), so wird p53 inaktiviert.

Der auffällige Unterschied zur CLL, bei der auch 17p13-Deletionen ein wichtiger Prognoseparameter sind, könnte durch die besonders große genetische Instabilität des MCL erklärt werden: 17p13-Deletionen könnten sozusagen durch andere chromosomale Aberrationen in ihrer Bedeutung „überschattet“ werden (Halldórsdóttir et al. 2011). Eine weitere Begründung für die eventuell geringere Relevanz der 17p13-Deletion könnte sein, dass das zweite Allel dabei häufiger funktionsfähig bleibt. *TP53*-Mutationen dagegen sind beim MCL häufig mit einer pUPD im Bereich des 17p13-Locus assoziiert, wodurch das zweite Allel ebenfalls die Mutation trägt (s. Kapitel 1.2.4. und 1.2.5.).

4.4 Prognostische Bedeutung chromosomaler Aberrationen

In der vorliegenden Arbeit kann gezeigt werden, dass Deletionen in 9p21 und 13q14 signifikant mit dem Überleben assoziiert sind. Dies stimmt mit früheren Ergebnissen überein (s. Kapitel 4.3.). In einem multivariaten Modell zusammen mit *TP53*-Mutationen und 17p13-Deletionen sind jedoch beide Parameter nicht mehr signifikant. Bei Rückwärtsselektion der Variablen bringt die Verwendung des Markers 9p21-Deletion zusätzlich zur *TP53*-Mutation einen Zugewinn für die Voraussage der Prognose. Auch hier ist allerdings die geringe Fallzahl der untersuchten Patienten zu beachten.

Für die Bedeutung von 9p21-Deletionen für die Prognose gibt es einige Erklärungsmöglichkeiten. Zum einen ist eine 9p21.3-Deletion beim MCL mit einer

verminderten Expression des *CDKN2A*-Gens und damit einer erniedrigten p53-Funktion sowie einer G1-S-Phasentransition verbunden (Hartmann et al. 2010). Zum anderen ist eine 9p-Deletion mit einer starken Hemmung von MOBKL2B assoziiert (Gen-Lokalisation in 9p21.2) (Hartmann et al. 2010). MOBKL2B ist Teil des Hippo-Signalwegs, der bei der Krebsentstehung eine Rolle spielt (Zeng und Hong 2008). Eine niedrige Expression von MOBKL2B ist mit einem kürzeren Überleben beim MCL assoziiert ($p < 0,05$) (Hartmann et al. 2010). Des Weiteren können 9p21.3-Deletionen zu einer Downregulation von MTAP (Methylthioadenosinphosphorylase) führen (Hartmann et al. 2010). Das Enzym MTAP ist essentiell für den „salvage“-Signalweg der Adenin- und Methionin-Synthese. Eine *MTAP*-Deletion sowie eine reduzierte Protein-Expression der MTAP sind beim MCL signifikant mit kürzerem Überleben assoziiert (Marcé et al. 2006).

Durch eine 13q14-Deletion im Rahmen einer „minimal deletion region“ (MDR) könnten die Gene *DLEU2* (*deleted in lymphocytic leukemia 2*), *miR-15a* und *miR-16-1* (*micro-RNA*) betroffen sein (Klein et al. 2010). Bei der CLL sind *miR-15a* und *miR-16-1* in der Mehrheit der Fälle herunterreguliert oder deletiert (Calin et al. 2002). Beide microRNAs führen potentiell über eine Regulation von BCL2 zur Apoptose in einem Zelllinien-Modell (Cimmino et al. 2005). Ob dieser Mechanismus auch beim MCL eine Rolle spielt, ist noch unklar. Ein weiteres Zielgen der Region 13q14 ist *RB1* (13q14.1-q14.2). Beim MCL konnte bei Deletionen in 13q14 eine *RB1*-Unterexpression festgestellt werden (Kienle et al. 2007), wodurch wahrscheinlich eine Bindung mit E2F verhindert und eine G1-S-Phasentransition beschleunigt wird. Auf 13q14.3 ist das Gen *CKAP2* (*cytoskeleton associated protein 2*) lokalisiert (Schraders et al. 2005). Es wird angenommen, dass *CKAP2* mit p53 einen positiven „Feedback“-Mechanismus bildet (Tsuchihara et al. 2005). Durch DNA-Schäden aktiviertes p53 induziert die Transkription von *CKAP2*, das wiederum p53 aktiviert (Tsuchihara et al. 2005). In Zellen ohne p53 induziert eine erhöhte *CKAP2*-Expression Tetraploidie (Tsuchihara et al. 2005).

Eine Übersicht über mögliche Wirkungen der relevanten chromosomalen Aberrationen in Bezug auf den p53-Signalweg gibt Abbildung 16.

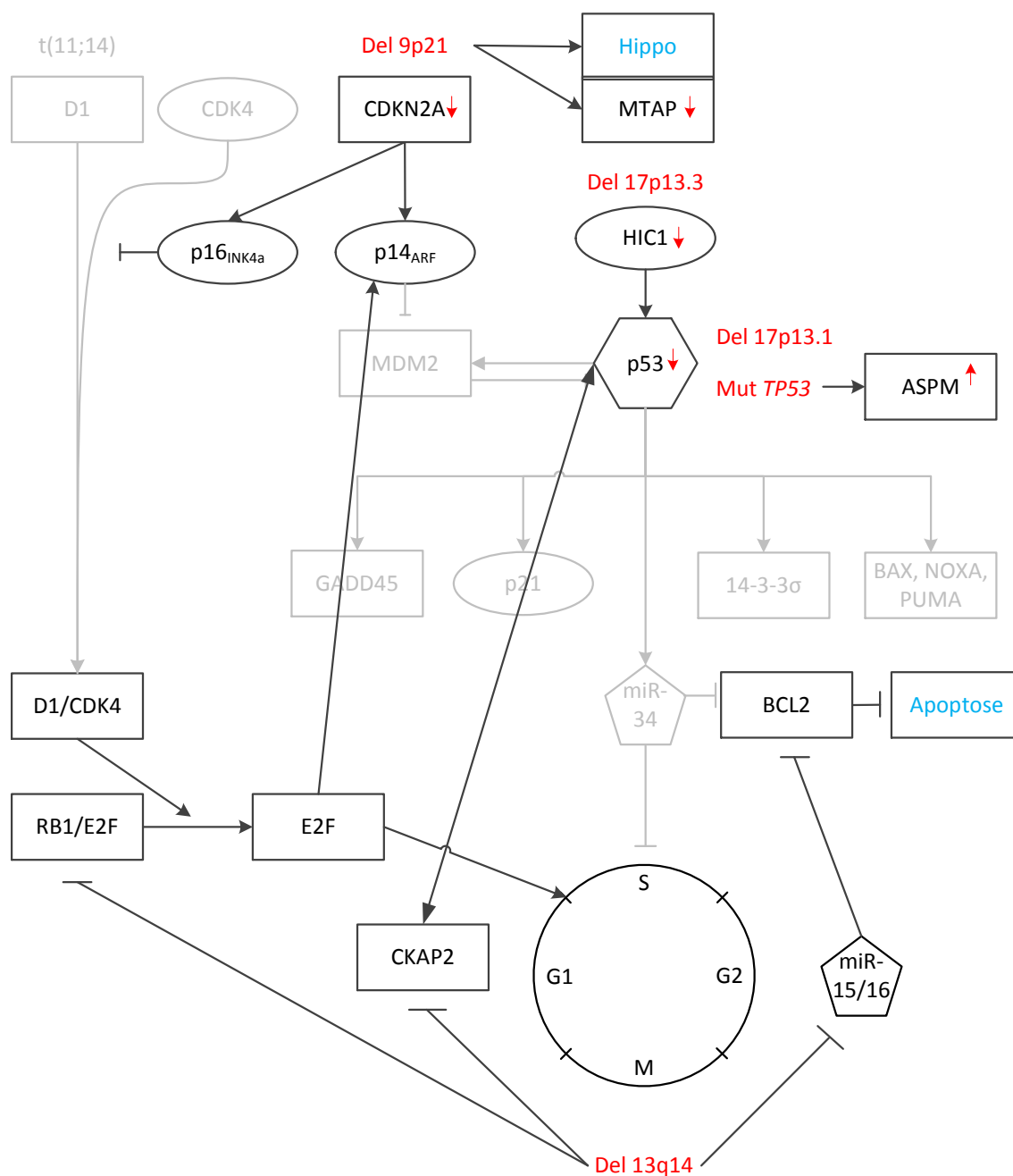


Abbildung 16: Zusammenfassung der möglichen Einwirkungen der prognostisch relevanten chromosomalen Aberrationen beim MCL

Die relevanten chromosomalen Aberrationen und deren potentielle Folgen sind rot eingezeichnet. Blau sind Reaktionen, die kein einzelnes Protein darstellen (Hippo-Signalweg, Apoptose). Kinasen sind eingekreist. Nicht direkt betroffene Teile des p53-Signalwegs sind grau eingezeichnet; diese werden mit Abkürzungen in Abbildung 1 in Kapitel 1.1.6. sowie in Abbildung 4 in Kapitel 1.2.3. genauer beschrieben.

Abkürzungen (engl): ASPM = *abnormal spindle-like microcephaly-associated*, BCL2 = *B-cell CLL/lymphoma 2*, CDK = *cyclin-dependent kinase*, CDKN2A = *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*, CKAP2 = *cytoskeleton associated protein 2*, D1 = *Cyclin D1 (deutsch)*, Del = *deletion*, E2F = *proper name of a transcription factor*, HIC1 = *Hypermethylated in cancer 1*, Hippo = *Hippo-pathway*, miR = *microRNA*, MTAP = *Methylthioadenosinphosphorylase*, p14_{ARF} = *proper name of a CDK inhibitor*, p16_{INK4a} = *proper name of a CDK inhibitor*, RB1 = *retinoblastoma 1*, G1, S, G2, M = *stages of the cell cycle*

Angelehnt an Abbildungen nach Bullock und Fersht 2001, He et al. 2007, Jares et al. 2007, Swerdlow et al. 2008 und Huber 2012.

4.5 Assoziation von *TP53*-Aberrationen mit chromosomalen Aberrationen

In dem hier untersuchten Patientenkollektiv korrelieren *TP53*-Mutationen signifikant mit 9p21-Deletionen und 13q14-Deletionen. 17p13-Deletionen dagegen korrelieren mit keiner der beiden Aberrationen. Dieser Unterschied wurde in früheren Studien nicht beschrieben und könnte darauf hinweisen, dass die Kombination von *TP53*-Mutation, 13q14-Deletion und 9p21-Deletion einen nicht redundanten Vorteil für das MCL darstellt. In der Rückwärtsselektion des multivariaten Modells können *TP53*-Mutationen und 9p21-Deletionen zum prognostischen Modell beitragen. In einer früheren Untersuchung konnte eine signifikante Korrelation zwischen Deletionen in 9p13-21 und Deletionen in 17p13.1 beim MCL festgestellt werden (Hutter et al. 2009). Bei einem Mausmodell zeigte sich, dass *p16^{INK4a}*^{-/-} Mäuse mit einer *p53*-Mutation signifikant früher Tumore entwickelten als Mäuse mit alleiniger *p53*-Mutation (Terzian et al. 2008).

Die Korrelation von *TP53*-Mutationen und 9p21-Deletionen könnte darauf hindeuten, dass Veränderungen von mehr als einem Mitglied eines Signalweges einen weiteren Vorteil für den Tumor bringen. Dies wäre ein wichtiger Hinweis zu diesem noch nicht abschließend geklärten Thema. Dafür spricht, dass Deletionen des *INK4a/ARF*-Locus und die Expression der Cyclin D1 codierenden Region unabhängig voneinander zu einem kombinierten, statistischen Überlebensmodell beitragen (Rosenwald et al. 2003). Dagegen spricht, dass Inaktivierungen von *RB1* in einer Studie bei Fällen mit einem Wildtyp *CDKN2A*-Locus auftraten (Pinyol et al. 2007). Es besteht darüber hinaus die Möglichkeit, dass die 9p21-Deletion nicht über den *p53*-Signalweg eingreift, sondern über andere Wirkmechanismen (z.B. den Hippo-Signalweg) zu einem zusätzlichen Vorteil des Tumors führt.

4.6 Schlussfolgerung und Ausblick

Die *TP53*-Mutation sollte als wichtiger Parameter für die Prognose des MCL angesehen werden. Insbesondere vor dem Hintergrund der neuen Möglichkeiten individueller Genanalytik durch Hochdurchsatzsequenzierung und damit auch der individualisierten Therapie sind diese Ergebnisse relevant. Durch die Analyse des *TP53*-Status vor einer Therapie könnte eine Patientengruppe identifiziert werden,

die eine besonders schlechte Prognose und eine signifikant niedrigere Ansprechrate auf konventionelle Therapien besitzt. Diesen Patienten könnten in Zukunft innerhalb von Studien p53-unabhängige Therapien angeboten werden. Es könnte beispielsweise auf CDK-Inhibitoren (Flavopiridol), mTOR-Inhibitoren, immunmodulierende Medikamente (Lenalidomid) oder eine allogene Stammzelltransplantation ausgewichen werden (s. Tabelle 3 in Kapitel 1.1.5.).

Zu beachten ist, dass durch die hohe Anzahl an pUPD beim MCL sowie dem möglichen dominant-negativen oder „gain of function“-Effekt der *TP53*-Mutationen oft kein Wildtyp-p53 mehr zur Verfügung steht. Daher wäre bei p53-stabilisierenden und p53-reaktivierenden Medikamenten, die ein Wildtyp-p53 voraussetzen, Vorsicht geboten. Es gibt jedoch Ansätze p53 durch Vektoren, wie Adenoviren, in Tumorzellen zu reinstallieren oder durch kleine Moleküle die Struktur mutierter p53-Proteine zu normalisieren, damit sie ihre Wildtyp-Funktionen wieder ausüben können (Vousden und Prives 2009). Es wird angenommen, dass eine fehlende p53-Funktion Tumorzellen besonders sensitiv auf zytotoxische Medikamente macht, die während der S-Phase oder der G2/M-Phase des Zellzyklus wirken (Vousden und Prives 2009). Diese Medikamente wären weniger toxisch für normale Zellen, die p53 exprimieren (Vousden und Prives 2009). In Erweiterung dieser Idee könnte man p53 durch Medikamente aktivieren, um normale Zellen vor den Effekten einer Therapie der p53-mutationstragenden Tumorzellen zu schützen (Vousden und Prives 2009).

Vor dem Hintergrund dieser neuen diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten wäre es wünschenswert, die prognostische Bedeutung der *TP53*-Mutation als unabhängigen Parameter in einer noch größeren, eventuell prospektiven Studie zu bestätigen.

5 Zusammenfassung

Das Mantelzell-Lymphom ist eine klinisch heterogene Erkrankung. Zur Entwicklung risikoadaptiver Therapiestrategien wurden bereits aussagekräftige prognostische Faktoren wie der MIPI (Mantle Cell Lymphoma International Prognostic Index) und der proliferationsabhängige Ki-67 Wert (Eigenname) beschrieben. Bezüglich der *TP53*-Mutation als Prognoseparameter finden sich einige Veröffentlichungen, aber keine Bestätigung durch ein multivariates Modell. Die Auswirkung der 17p13-Deletion auf das Gesamtüberleben ist umstritten. In der vorliegenden Dissertation wird die prognostische Bedeutung von *TP53*-Mutationen und 17p13-Deletionen beim MCL ermittelt und differenziert.

Bei 108 der insgesamt 122 Patienten wurden durch DHPLC-Analyse (denaturing high performance liquid chromatography) die codierenden Exons 4 bis 10 des *TP53*-Gens auf Mutationen untersucht und diese durch direkte Sequenzierung bestätigt. Chromosomale Aberrationen wurden mittels FISH- (Fluoreszenz in situ Hybridisierung) oder MCGH-Analyse (Matrix Comparative Genomic Hybridization) untersucht.

Eine *TP53*-Mutation zeigen 27 der 108 Patienten (Inzidenz 25%), 17p13-Deletionen treten in 19% (19/100) auf. Mit 63% (19/30) bilden Missense-Mutationen, unter denen auch bekannte „hotspots“ vertreten sind, die Mehrheit. Die *TP53*-Mutation kann als Prognosefaktor bestätigt werden: Das mittlere Gesamtüberleben sowie das Ansprechen auf Therapie (komplette sowie partielle Remission) sind in der Gruppe mit *TP53*-Mutation signifikant erniedrigt (32 vs. 61,4 Monate; $p < 0,001$ und 39,1% vs. 77,4%; $p = 0,0031$). In einem multivariaten Modell mit anderen chromosomalen Abberationen zeigt sich ein Trend für die *TP53*-Mutation als unabhängiger Prognosefaktor ($p = 0,061$). 17p13-Deletionen sind bei dem untersuchten Patientenkollektiv weder univariat noch multivariat signifikant mit dem Gesamtüberleben assoziiert, allerdings ist die Fallzahl begrenzt (16/79 mit Überlebensdaten). Auch die Differenzierung der *TP53*-Aberrationen in alleinige *TP53*-Mutationen ($n = 11$) und alleinige 17p13-Deletionen ($n = 7$) zeigt nur für erstere ein signifikant erniedrigtes Gesamtüberleben im Vergleich zu Patienten ohne *TP53*-Aberrationen ($n = 41$; $p = 0,001$). Weitere chromosomale Aberrationen, die das Gesamtüberleben verkürzen, sind eine 9p21-Deletion und eine 13q14-Deletion (36,1 vs. 53,2 Monate; $p = 0,0076$ und

37,1 vs. 61,4 Monate; $p = 0,0202$). Interessant ist, dass diese beiden Aberrationen untereinander sowie mit *TP53*-Mutationen signifikant korrelieren (jeweils $p < 0,05$), nicht aber mit 17p13-Deletionen.

Insgesamt kann durch die vorliegende Arbeit die *TP53*-Mutation als Prognosefaktor bestätigt werden und zur 17p13-Deletion bezüglich der Prognoserelevanz sowie der Assoziation mit anderen chromosomalen Aberrationen differenziert werden. Im multivariaten Modell zeigt sich ein eindeutiger Trend für die *TP53*-Mutation als unabhängiger Prognoseparameter. Insbesondere vor dem Hintergrund der zukünftigen diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten wäre es wünschenswert diesen Trend in einem noch größeren Kollektiv zu bestätigen.

6 Literaturverzeichnis

1. Allen JE, Hough RE, Goepel JR, Bottomley S, Wilson GA, Alcock HE, Baird M, Lorigan PC, Vandenberghe EA, Hancock BW, Hammond DW: Identification of novel regions of amplification and deletion within mantle cell lymphoma DNA by comparative genomic hybridization. *Br J Haematol* 116: 291-298 (2002)
2. Banks PM, Chan J, Cleary ML, Delsol G, De Wolf-Peeters C, Gatter K, Grogan TM, Harris NL, Isaacson PG, Jaffe ES, Mason D, Pileri S, Ralfkiaer E, Stein H, Warnke RA: Mantle cell lymphoma: A proposal for unification of morphologic, immunologic and molecular data. *Am J Surg Pathol* 16: 637-640 (1992)
3. Beà S, Salaverria I, Armengol L, Pinyol M, Fernández V, Hartmann EM, Jares P, Amador V, Hernández L, Navarro A, Ott G, Rosenwald A, Estivill X, Campo E: Uniparental disomies, homozygous deletions, amplifications and target genes in mantle cell lymphoma revealed by integrative high-resolution whole-genome profiling. *Blood* 113: 3059-3069 (2009)
4. Bioinformatics institute: p53 knowledgebase. <http://p53.bii.a-star.edu.sg/aboutp53/protseq/index.php> (03.12.2012)
5. Boeckler FM, Joerger AC, Jaggi G, Rutherford TJ, Veprintsev DB, Fersht AR: Targeted rescue of a destabilized mutant of p53 by an *in silico* screened drug. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 10360-10365 (2008)
6. Boyum A: Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand J Immunol* 5 (Suppl 5): 9-15 (1976)
7. Brosh R und Rotter V: When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat Rev Cancer* 9: 701-713 (2009)
8. Bullock AN und Fersht AR: Rescuing the function of mutant p53. *Nat Rev Cancer* 1: 68-76 (2001)
9. Bush JA und Li G: Cancer chemoresistance: the relationship between p53 and multidrug transporters. *Int J Cancer* 98: 323-330 (2002)
10. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM: Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 15524-15529 (2002)
11. Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, Smithers DW, Tubiana M: Report of the committee on Hodgkin's disease staging classification. *Cancer Res* 31: 1860-1861 (1971)
12. Chen WY, Wang DH, Yen RC, Luo J, Gu W, Baylin SB: Tumor suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-dependent DNA-damage responses. *Cell* 123: 437-448 (2005)
13. Cheung K-JJ, Horsman DE, Gascoyne RD: The significance of *TP53* in lymphoid malignancies: mutation prevalence, regulation, prognostic impact and potential as a therapeutic target. *Br J Haematol* 146: 257-269 (2009)
14. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu C-G, Kipps TJ,

- Negrini M, Croce CM: miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 13944-13949 (2005)
15. DeLeo AB, Jay G, Appella E, Dubois GC, Law LW, Old LJ: Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 2420-2424 (1979)
16. Denzel T: Prognostische Bedeutung von TP53 Mutationen bei der CLL: Analyse im Rahmen der prospektiven CLL4-Studie (F vs. FC) der GCLLSG. Med Dissertation, Universität Ulm (2010)
17. Dicker F, Herholz H, Schnittger S, Nakao A, Patten N, Wu L, Kern W, Haferlach T, Haferlach C: The detection of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia independently predicts rapid disease progression and is highly correlated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia* 23: 117-124 (2009)
18. Dono M, Cerruti G, Zupo S: The CD5+ B-cell. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 2105-2111 (2004)
19. Dreyling M, Hiddemann W, European MCL Network: Current treatment standards and emerging strategies in mantle cell lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 542-551 (2009)
20. Espinet B, Salaverria I, Beà S, Ruiz-Xivillé N, Balagué O, Salido M, Costa D, Carreras J, Rodríguez-Vicente AE, García JL, Hernández-Rivas JM, Calasanz MJ, Siebert R, Ferrer A, Salar A, Carrió A, Polo N, García-Marco JA, Domingo A, González-Barca E, Romagosa V, Marugán I, López-Guillermo A, Millá F, Mate JL, Luño E, Sanzo C, Collado R, Oliver I, Monzó S, Palacín A, González T, Sant F, Salinas R, Ardanaz MT, Font L, Escoda L, Florensa L, Serrano S, Campo E, Solé F: Incidence and prognostic impact of secondary cytogenetic aberrations in a series of 145 patients with mantle cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 49: 439-451 (2010)
21. Fernández V, Hartmann E, Ott G, Campo E, Rosenwald A: Pathogenesis of mantle-cell lymphoma: all oncogenic roads lead to dysregulation of cell cycle and DNA damage response pathways. *J Clin Oncol* 23: 6364-6369 (2005)
22. Fernández V, Salameró O, Espinet B, Solé F, Royo C, Navarro A, Camacho F, Beà S, Hartmann E, Amador V, Hernández L, Agostinelli C, Sargent RL, Rozman M, Aymerich M, Colomer D, Villamor N, Swerdlow SH, Pileri SA, Bosch F, Piris MA, Montserrat E, Ott G, Rosenwald A, López-Guillermo A, Jares P, Serrano S, Campo E: Genomic and gene expression profiling defines indolent forms of mantle cell lymphoma. *Cancer Res* 70: 1408-1418 (2010)
23. Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ: The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 57: 1083-1093 (1989)
24. Geisler CH: Front-line treatment of mantle cell lymphoma. *Haematologica* 95: 1241-1243 (2010)
25. Geisler CH, Kolstad A, Laurell A, Rätty R, Jerkeman M, Eriksson M, Nordström M, Kimby E, Boesen AM, Nilsson-Ehle H, Kuitinen O, Lauritzsen GF, Ralfkiaer E, Ehinger M, Sundström C, Delabie J, Karjalainen-Lindsberg M-L, Brown P, Elonen E: The Mantle Cell Lymphoma International Prognostic Index (MIPI) is superior to the International Prognostic Index (IPI) in predicting survival

- following intensive first-line immunochemotherapy and autologous stem cell transplantation (ASCT). *Blood* 115: 1530-1533 (2010)
26. Gerard-Marchant R, Hamlin I, Lennert K, Rilke F, Stansfeld AG, van Unnik JAM: Classification of Non-Hodgkin's lymphomas. *Lancet* 2: 406-408 (1974)
27. Gladden AB, Woolery R, Aggarwal P, Wasik MA, Diehl JA: Expression of constitutively nuclear cyclin D1 in murine lymphocytes induces B-cell lymphoma. *Oncogene* 25: 998-1007 (2006)
28. Greiner TC, Moynihan MJ, Chan WC, Lytle DM, Pedersen A, Anderson JR, Weisenburger DD: p53 mutations in mantle cell lymphoma are associated with variant cytology and predict a poor prognosis. *Blood* 87: 4302-4310 (1996)
29. Greiner TC, Dasgupta C, Ho VV, Weisenburger DD, Smith LM, Lynch JC, Vose JM, Fu K, Armitage JO, Brazier RM, Campo E, Delabie J, Gascoyne RD, Jaffe ES, Muller-Hermelink HK, Ott G, Rosenwald A, Staudt LM, Im MY, Karaman MW, Pike BL, Chan WC, Hacia JG: Mutation and genomic deletion status of ataxia telangiectasia mutated (ATM) and p53 confer specific gene expression profiles in mantle cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 2352-2357 (2006)
30. Gross E, Kiechle M and Arnold N: Mutation analysis of p53 in ovarian tumors by DHPLC. *J Biochem Biophys Methods* 47: 73-81 (2001)
31. Häbe S: *TP53-Mutationsanalyse bei Fludarabin-refraktärer Chronischer Lymphatischer Leukämie*. Med Dissertation, Universität Ulm (2009)
32. Halldórsdóttir AM, Lundin A, Murray F, Mansouri L, Knuutila S, Sundström C, Laurell A, Ehrencrona H, Sander B, Rosenquist R: Impact of *TP53* mutation and 17p deletion in mantle cell lymphoma. *Leukemia* 25: 1904-1908 (2011)
33. Hartmann EM, Campo E, Wright G, Lenz G, Salaverria I, Jares P, Xiao W, Brazier RM, Rimsza LM, Chan WC, Weisenburger DD, Delabie J, Jaffe ES, Gascoyne RD, Dave SS, Mueller-Hermelink HK, Staudt LM, Ott G, Beà S, Rosenwald A: Pathway discovery in mantle cell lymphoma by integrated analysis of high resolution gene expression and copy number profiling. *Blood* 116: 953-961 (2010)
34. He X, He L, Hannon GJ: The guardian's little helper: microRNAs in the p53 tumor suppressor network. *Cancer Res* 67: 11099-11101 (2007)
35. Hernández L, Beà S, Pinyol M, Ott G, Katzenberger T, Rosenwald A, Bosch F, López-Guillermo A, Delabie J, Colomer D, Montserrat E, Campo E: *CDK4* and *MDM2* gene alterations mainly occur in highly proliferative and aggressive mantle cell lymphomas with wild-type *INK4a/ARF* locus. *Cancer Res* 65: 2199-2206 (2005)
36. Herold G und Mitarbeiter: *Innere Medizin, Eine vorlesungsorientierte Darstellung*. Verlag Gert Herold Köln, S. 69-73 (2012)
37. Hirama T und Koeffler HP: Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer. *Blood* 86: 841-854 (1995)
38. Hirt C, Schüler F, Dölken L, Schmidt CA, Dölken G: Low prevalence of circulating t(11;14)(q13;q32)-positive cells in the peripheral blood of healthy individuals as detected by real-time quantitative PCR. *Blood* 104: 904-905 (2004)

39. Hjortsberg L, Rubio-Nevedo JM, Hamroun D, Bérout C, Claustre M, Soussi T: The p53 Mutation handbook 2.0, available online. http://p53.free.fr/Database/p53_UMD_export/p53_Hanbook_2.0.pdf.zip (31.10.2012)
40. Hoster E, Dreyling M, Klapper W, Gisselbrecht C, van Hoof A, Kluin-Nelemans HC, Pfreundschuh M, Reiser M, Metzner B, Einsele H, Peter N, Jung W, Wörmann B, Ludwig W-D, Dührsen U, Eimermacher H, Wandt H, Hasford J, Hiddemann W, Unterhalt M: A new prognostic index (MIPI) for patients with advanced-stage mantle cell lymphoma. *Blood* 111: 558-565 (2008)
41. Huber H: Korrelation von Zellzyklusproteinexpression und klinischem Verlauf bei der chronischen lymphatischen Leukämie. Med Dissertation, Universität Ulm (2011)
42. Hutter G, Scheubner M, Ott G, Zimmermann Y, Hübler K, Roth S, Stilgenbauer S, Kalla J, Stöcklein H, Hiddemann W, Dreyling M: Allelic genotyping reveals a hierarchy of genomic alterations in mantle cell lymphoma associated to cell proliferation. *Ann Hematol* 88: 821-828 (2009)
43. Ichikawa A, Kinoshita T, Watanabe T, Kato H, Nagai H, Tsushita K, Saito H, Hotta T: Mutations of the p53 gene as a prognostic factor in aggressive B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 337: 529-534 (1997)
44. Jares P, Colomer D, Campo E: Genetic and molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: perspectives for new targeted therapeutics. *Nat Rev Cancer* 7: 750-762 (2007)
45. Jares P und Campo E: Advances in the understanding of mantle cell lymphoma. *Br J Haematol* 142: 149-165 (2008)
46. Joerger AC und Fersht AR: Structural biology of the tumor suppressor p53. *Annu Rev Biochem* 77: 557-582 (2008)
47. Katzenberger T, Kienle D, Stilgenbauer S, Höller S, Schilling C, Mäder U, Puppe B, Petzoldt C, Sander S, Bullinger L, Stöcklein H, Kalla J, Hartmann E, Adam P, Ott MM, Müller-Hermelink H-K, Rosenwald A, Ott G: Delineation of distinct tumour profiles in mantle cell lymphoma by detailed cytogenetic, interphase genetic and morphological analysis. *Br J Haematol* 142: 538-550 (2008)
48. Kienle D, Katzenberger T, Ott G, Saupe D, Benner A, Kohlhammer H, Barth TFE, Höller S, Kalla J, Rosenwald A, Müller-Hermelink HK, Möller P, Lichter P, Döhner H, Stilgenbauer S: Quantitative gene expression deregulation in mantle-cell lymphoma: correlation with clinical and biologic factors. *J Clin Oncol* 25: 2770-2777 (2007)
49. Klein U, Lia M, Crespo M, Siegel R, Shen Q, Mo T, Ambesi-Impiombato A, Califano A, Migliazza A, Bhagat G, Dalla-Favera R: The *DLEU2/miR-15a/16-1* cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell* 17: 28-40 (2010)
50. Kohlhammer H, Schwaenen C, Wessendorf S, Holzmann K, Kestler HA, Kienle D, Barth TFE, Möller P, Ott G, Kalla J, Radlwimmer B, Pscherer A, Stilgenbauer S, Döhner H, Lichter P, Bentz M: Genomic DNA-chip hybridization in t(11;14)-positive mantle cell lymphomas shows a high

- frequency of aberrations and allows a refined characterization of consensus regions. *Blood* 104: 795-801 (2004)
51. Lane DP und Crawford LV: T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278: 261-263 (1979)
52. Lane DP: Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358: 15-16 (1992)
53. Lennert K, Stein H, Kaiserling E: Cytological and functional criteria for the classification of malignant lymphomata. *Br J Cancer* 31 (Suppl 2): 29-43 (1975)
54. Levine AJ: p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88: 323-331 (1997)
55. Levine AJ, Hu W, Feng Z: The p53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell Death Differ* 13: 1027-1036 (2006)
56. Levine AJ und Oren M: The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer* 9: 749-758 (2009)
57. Li Y und Prives C: Are interactions with p63 and p73 involved in mutant p53 gain of oncogenic function? *Oncogene* 26: 2220-2225 (2007)
58. Linzer DIH und Levine AJ: Characterization of a 54k dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17: 43-52 (1979)
59. Lovec H, Grzeschiczek A, Kowalski M-B, Möröy T: Cyclin D1/*bcl-1* cooperates with *myc* genes in the generation of B-cell lymphoma in transgenic mice. *EMBO J* 13: 3487-3495 (1994)
60. Malkin D: The role of p53 in human cancer. *J Neurooncol* 51: 231-243 (2001)
61. Marcé S, Balagué O, Colomo L, Martinez A, Höller S, Villamor N, Bosch F, Ott G, Rosenwald A, Leoni L, Esteller M, Fraga MF, Montserrat E, Colomer D, Campo E: Lack of methylthioadenosine phosphorylase expression in mantle cell lymphoma is associated with shorter survival: implications for a potential targeted therapy. *Clin Cancer Res* 12: 3754-3761 (2006)
62. Melero JA, Stitt DT, Mangel WF, Carroll RB: Identification of new polypeptide species (48-55k) immunoprecipitable by antiserum to purified large T antigen and present in SV40-infected and -transformed cells. *Virology* 93: 466-480 (1979)
63. Momand J, Wu HH, Dasgupta G: MDM2 – master regulator of the p53 tumor suppressor protein. *Gene* 242: 15-29 (2000)
64. Mozos A, Royo C, Hartmann E, De Jong D, Baró C, Valera A, Fu K, Weisenburger DD, Delabie J, Chuang S-S, Jaffe ES, Ruiz-Marcellan C, Dave S, Rimsza L, Braziel R, Gascoyne RD, Solé F, López-Guillermo A, Colomer D, Staudt LM, Rosenwald A, Ott G, Jares P, Campo E: SOX11 expression is highly specific for mantle cell lymphoma and identifies the cyclin D1-negative subtype. *Haematologica* 94: 1555-1562 (2009)
65. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H: Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51: 263-273 (1986)
66. National Center of Biotechnology Information: BLAST. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> (04.12.2012)

67. Oefner PJ und Underhill PA: Comparative DNA sequencing by denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) (poster). *Am J Hum Genet* 57 (Suppl): A266 (1995)
68. Olive KP, Tuveson DA, Ruhe ZC, Yin B, Willis NA, Bronson RT, Crowley D, Jacks T: Mutant p53 gain of function in two mouse models of Li-Fraumeni syndrome. *Cell* 119: 847-860 (2004)
69. Pérez-Galán P, Dreyling M, Wiestner A: Mantle cell lymphoma: biology, pathogenesis and molecular basis of treatment in the genomic era. *Blood* 117: 26-38 (2011)
70. Pinyol M, Bea S, Plà L, Ribrag V, Bosq J, Rosenwald A, Campo E, Jares P: Inactivation of *RB1* in mantle-cell lymphoma detected by nonsense-mediated mRNA decay pathway inhibition and microarray analysis. *Blood* 109: 5422-5429 (2007)
71. Rosenwald A, Wright G, Wiestner A, Chan WC, Connors JM, Campo E, Gascoyne RD, Grogan TM, Muller-Hermelink HK, Smeland EB, Chiorazzi M, Giltane JM, Hurt EM, Zhao H, Averett L, Henrickson S, Yang L, Powell J, Wilson WH, Jaffe ES, Simon R, Klausner RD, Montserrat E, Bosch F, Greiner TC, Weisenburger DD, Sanger WG, Dave BJ, Lynch JC, Vose J, Armitage JO, Fisher RI, Miller TP, LeBlanc M, Ott G, Kvaloy S, Holte H, Delabie J, Staudt LM: The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma. *Cancer Cell* 3: 185-197 (2003)
72. Rubio-Moscardo F, Climent J, Siebert R, Piris MA, Martin-Subero JI, Nieländer I, Garcia-Conde J, Dyer MJS, Terol MJ, Pinkel D, Martinez-Climent JA: Mantle-cell lymphoma genotypes identified with CGH to BAC micorarrays define a leukemic subgroup of disease and predict patient outcome. *Blood* 105: 4445-4454 (2005)
73. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491 (1988).
74. Salaverria I, Zettl A, Beà S, Moreno V, Valls J, Hartmann E, Ott G, Wright G, Lopez-Guillermo A, Chan WC, Weisenburger DD, Gascoyne RD, Grogan TM, Delabie J, Jaffe ES, Montserrat E, Muller-Hermelink HK, Staudt LM, Rosenwald A, Campo E: Specific secondary genetic alterations in mantle cell lymphoma provide prognostic information independent of the gene expression-based proliferation signature. *J Clin Oncol* 25: 1216-1222 (2007)
75. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-5467 (1977)
76. Scheubner M: Hierarchie proliferationsassoziierter sekundärer genomischer Alterationen im Mantelzell-Lymphom – eine Analyse mittels PCR-gestützter Genotypisierung. Med Dissertation, Ludwigs-Maximilians-Universität München (2009)
77. Schraders M, Pfundt R, Straatman HMP, Janssen IM, van Kessel AG, Schoenmakers EFPM, van Krieken JHJM, Groenen PJTA: Novel chromosomal imbalances in mantle cell lymphoma detected by genome-wide array-based comparative genomic hybridization. *Blood* 105: 1686-1693 (2005)

78. Sherr CJ: Cancer cell cycles. *Science* 274: 1672-1677 (1996)
79. Slotta-Huspenina J, Koch I, de Leval L, Keller G, Klier M, Bink K, Kremer M, Raffeld M, Fend F, Quintanilla-Martinez L: The impact of cyclin D1 mRNA isoforms, morphology and p53 in mantle cell lymphoma: p53 alterations and blastoid morphology are strong predictors of a high proliferation index. *Haematologica* 97: 1422-1430 (2012)
80. Smith G, Carey FA, Beattie J, Wilkie MJV, Lightfoot TJ, Coxhead J, Garner RC, Steele RJ, Wolf CR: Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53-alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 9433-9438 (2002)
81. Song H, Hollstein M, Xu Y: p53 gain-of-function cancer mutants induce genetic instability by inactivating ATM. *Nature Cell Biol* 9: 573-580 (2007)
82. Soussi T: p53 alterations in human cancer: more questions than answers. *Oncogene* 26: 2145-2156 (2007)
83. Swerdlow SH und Williams ME: From centrocytic to mantle cell lymphoma: a clinicopathologic and molecular review of 3 decades. *Hum Pathol* 33: 7-20 (2002)
84. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (Eds.): WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. *IARC*: Lyon 2008
85. Terzian T, Suh Y-A, Iwakuma T, Post SM, Neumann M, Lang GA, Van Pelt CS, Lozano G: The inherent instability of mutant p53 is alleviated by Mdm2 or p16^{INK4a} loss. *Genes Dev* 22: 1337-1344 (2008)
86. The international Non-Hodgkin's lymphoma prognostic factors project: A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 329:987-994 (1993)
87. Tsuchihara K, Lapin V, Bakal C, Okada H, Brown L, Hirota-Tsuchihara M, Zaugg K, Ho A, Itie-YouTen A, Harris-Brandts M, Rottapel R, Richardson CD, Benchimol S, Mak TW: CKAP2 regulates aneuploidy, cell cycling and cell death in a p53-dependent manner. *Cancer Res* 65: 6685-6691 (2005)
88. Vater I, Wagner F, Kreuz M, Berger H, Martín-Subero JI, Pott C, Martinez-Climont JA, Klapper W, Krause K, Dyer MJS, Gesk S, Harder L, Zamo A, Dreyling M, Hasenclever D, Arnold N, Siebert R: GeneChip analyses point to novel pathogenetic mechanisms in mantle cell lymphoma. *Br J Haematol* 144: 317-331 (2008)
89. Vousden KH und Prives C: Blinded by the light: the growing complexity of p53. *Cell* 137: 413-431 (2009)
90. Weiß C: Basiswissen Medizinische Statistik, 4. Auflage, Springer, S. 242-246, S. 303, S. 307-310 (2008)
91. Williams ME, Connors JM, Dreyling MH, Gascoyne RD, Kahl BS, Leonard JP, Press OW, Wilson WH: Mantle cell lymphoma: report of the 2010 mantle cell lymphoma consortium workshop. *Leuk Lymphoma* 52: 24-33 (2011)
92. Zeng Q und Hong W: The emerging role of the hippo pathway in cell contact inhibition, organ size control and cancer development in mammals. *Cancer Cell* 13: 188-192 (2008)

93. 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)
94. Zhao R, Gish K, Murphy M, Yin Y, Notterman D, Hoffman WH, Tom E, Mack DH, Levine AJ: Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays. *Genes Dev* 14: 981-993 (2000)

Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Dysregulation des Zellzyklus beim Mantelzell-Lymphom	6
Abbildung 2: Modell für die molekulare Pathogenese und Progression des MCL ...	7
Abbildung 3: Struktur des Tumorsuppressorproteins p53	11
Abbildung 4: Aktivierung und Funktion des p53-Proteins	12
Abbildung 5: Verteilung von <i>TP53</i> -Mutationen in humanen Malignomen nach Daten der „IARC <i>TP53</i> Mutation Database“	14
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Funktionsausfalls des <i>TP53</i> -Gens...	15
Abbildung 7: Homo- und Heteroduplex-Bildung	24
Abbildung 8: Molekulargenetische Veränderungen, unterteilt in Patienten mit <i>TP53</i> -Mutation (n = 19) und Patienten ohne <i>TP53</i> -Mutation (n = 64)	30
Abbildung 9: Grafische Darstellung der Verteilung der <i>TP53</i> -Mutationen	31
Abbildung 10: Gesamtüberleben mit und ohne <i>TP53</i> -Mutation	33
Abbildung 11: Gesamtüberleben mit alleiniger <i>TP53</i> -Mutation, alleiniger 17p13- Deletion und ohne <i>TP53</i> -Aberration	34
Abbildung 12: Gesamtüberleben mit und ohne 9p21-Deletion/Bideletion	35
Abbildung 13: Gesamtüberleben mit und ohne 13q14-Deletion/Bideletion	36
Abbildung 14: Korrelationen zwischen <i>TP53</i> -Aberrationen und chromosomalen Aberrationen	37
Abbildung 15: Gesamtüberleben bezüglich des MIPI-Risikos	38
Abbildung 16: Zusammenfassung der möglichen Einwirkungen der prognostisch relevanten chromosomalen Aberrationen beim MCL	47

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadieneinteilung für maligne Lymphome nach Ann Arbor.....	3
Tabelle 2: Therapie des Mantelzell-Lymphoms.....	4
Tabelle 3: Neue Therapieansätze (molekulare Therapie) in klinischer Entwicklung beim Mantelzell-Lymphom	4
Tabelle 4: Unabhängige Prognosefaktoren beim Mantelzell-Lymphom	9
Tabelle 5: Geräte.....	18
Tabelle 6: Reagenzien und sonstige Materialien.....	18
Tabelle 7: Häufig verwendeter Puffer	19
Tabelle 8: Primersequenzen der Exons des <i>TP53</i> -Gens	21
Tabelle 9: PCR-Ansatz exemplarisch für einen Patienten.....	22
Tabelle 10: PCR-Programm zur DNA-Amplifikation	22
Tabelle 11: PCR-Programm zur Heteroduplex-Formierung	25
Tabelle 12: PCR- und DHPLC-Bedingungen für die untersuchten Exons	26
Tabelle 13: Ansatz für die Sequenzreaktion exemplarisch für einen Patienten.....	27
Tabelle 14: PCR-Programm zur Sequenzierung	28
Tabelle 15: Prognoseindizes für das Mantelzell-Lymphom	29
Tabelle 16: Ergebnisse der Sequenzanalyse	32
Tabelle 17: Multivariates Modell.....	39
Tabelle 18: Multivariates Modell nach Rückwärtsselektion	39
Tabelle 19: Inzidenzvergleich der <i>TP53</i> -Aberrationen mit anderen Studien.....	40
Tabelle 20: Inzidenzvergleich relevanter chromosomaler Aberrationen mit anderen Studien.....	41
Tabelle 21: Zusammenfassung der bisherigen und in dieser Arbeit gewonnenen Daten zur Korrelation zwischen Gesamtüberleben und Aberrationen in 17p13, 9p21 und 13q14 beim Mantelzell-Lymphom.....	43

Veröffentlichungen

Arbeiten zur vorliegenden Dissertation fanden Eingang in folgende Veröffentlichungen:

Zenz T, Mohr J, Edelmann J, Sarno A, Hoth P, Heuberger M, Helfrich H, Mertens D, Döhner H, Stilgenbauer S: Treatment resistance in chronic lymphocytic leukemia: the role of the p53 pathway. *Leuk Lymphoma* 50: 510-513 (2009)

Zenz T, Vollmer D, Trbusek M, Smardova J, Benner A, Soussi T, Helfrich H, Heuberger M, Hoth P, Fuge M, Denzel T, Häbe S, Malcikova J, Kuglik P, Truong S, Patten N, Wu L, Oscier D, Ibbotson R, Gardiner A, Tracy I, Lin K, Pettitt A, Pospisilova S, Mayer J, Hallek M, Döhner H, Stilgenbauer S: *TP53* mutation profile in chronic lymphocytic leukemia: evidence for a disease specific profile from a comprehensive analysis of 268 mutations. *Leukemia* 24: 2072-2079 (2010)

Jebaraj BMC, Kienle D, Lechel A, Mertens D, Heuberger M, Ott G, Rosenwald A, Barth TFE, Möller P, Zenz T, Döhner H, Stilgenbauer S: Telomere length in mantle cell lymphoma. *Blood*: manuscript accepted for publication

Vielen Dank

Bei allen, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben, möchte ich mich herzlich bedanken.

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Stephan Stilgenbauer, der mir ermöglicht hat meine Dissertation in seiner Abteilung durchzuführen. Ebenso gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Hartmut Döhner.

Mein ganz besonderer Dank geht an meinen Betreuer und Doktorvater Prof. Dr. med. Thorsten Zenz für die Bereitstellung des Themas. Er war jederzeit für alle Fragen offen und stand mir mit Rat und Tat zur Seite.

Allen Mitarbeitern des Labors, insbesondere Petra Konrad, Dr. rer. nat. Julia Mohr und Doris Winter gilt mein Dank für die gute Zusammenarbeit und Motivationshilfe. Dr. med. Tina Denzel danke ich für die Einarbeitung im Labor.

Ganz herzlich danke ich meinen Eltern, meiner Schwester und meinem Freund, die stets für mich da waren.

Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.