

TP53-Mutationen und komplexe chromosomale Aberrationen bei Patienten
mit chronischer lymphatischer Leukämie

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Hannes Gustav Herholz
aus Hamburg
2009

Angefertigt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Reinhard Büttner
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Alexander von Rücker

Tag der Mündlichen Prüfung: 20.08.2009

Aus dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Bonn
Direktor: Prof. Dr. med. Reinhard Büttner

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
1.1	Epidemiologie der CLL	8
1.2	Biologie der CLL-Zellen	8
1.3	Klinik der CLL	9
1.4	Diagnostik	10
1.5	Stadieneinteilung	11
1.6	Prognose	12
1.6.1	Lymphozytenverdoppelungszeit und Serum-Thymidinkinase	12
1.6.2	Mutationsstatus der IGVH-Gene	12
1.6.3	CD38 und ZAP-70 Expression	13
1.6.4	Zytogenetik	14
1.7	Das Tumorsuppressorgen TP53	16
1.8	Der komplex aberrante Karyotyp	18
1.9	Zielsetzung dieser Studie	19
2	Material und Methoden	20
2.1	Patienten	20
2.2	Molekulargenetische Untersuchungen	21
2.2.1	Isolierung mononukleärer Zellen	21
2.2.2	Automatisierte DNA Extraktion mittels MagNa Pure LC	21
2.2.3	Messung der DNA-Konzentration	22
2.2.4	Amplifikation des TP53-Gens	22
2.2.5	Gel-Analyse	26
2.2.6	TP53-Mutationsscreening mittels DHPLC-Analyse	28

2.2.7	Sequenzierung	31
2.2.8	P53Amplichip	33
2.3	Zytogenetische Befunde	39
2.3.1	Chromosomenanalyse an Metaphasen	39
2.3.2	Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)	39
2.4	Statistik	41
3	Ergebnisse	42
3.1	Ergebnisse der DHPLC-Analyse und der direkten Sequenzierung	46
3.1.1	Polymorphismen	47
3.1.2	Mutationen	49
3.2	Ergebnisse der P53Amplichip-Analyse	52
3.3	Gesamtinzidenz der TP53-Mutationen	52
3.4	Vergleich beider Screeningverfahren	54
3.5	Molekulare Charakterisierung der TP53-Mutationen	58
3.5.1	Vergleich beider Screeningmethoden bezüglich des Mutationsspektrums	59
3.6	FISH und klassische Chromosomenanalyse	60
3.6.1	Ergebnisse der FISH-Untersuchung	60
3.6.2	Ergebnisse der Chromosomenanalyse	60
3.7	Verteilung der TP53-Mutationen auf zytogenetische Subgruppen	64
3.7.1	TP53-Mutationen bei Patienten ohne 17p-Deletion im FISH	64
3.7.2	TP53-Mutationen bei Patienten mit 17p-Deletion im FISH	65
3.7.3	TP53-Mutationen bei Patienten mit komplex aberrantem Karyotyp	66
3.7.4	TP53-Mutationen bei Patienten mit Translokationen	67
3.8	Klinische Verläufe	68
3.8.1	Kontrolle der erhobenen klinischen Daten	69
3.8.2	„Time to Progression“ bei Patienten mit 17p-Deletion und 11q-Deletion	70
3.8.3	„Time to Progression“ bei Patienten mit TP53-Aberration	71
3.8.4	„Time to Progression“ bei Patienten mit isolierter TP53-Mutation	72

3.8.5	„Time to Progression“ bei Patienten mit komplex aberrantem Karyotyp	73
3.8.6	„Time to Progression“ bei Patienten mit unbalancierten Translokationen	74
3.8.7	Ergebnisse der Multivariat-Analyse	75
3.8.8	Inzidenz der TP53-Aberration bei Patienten mit Vortherapie	78
4	Diskussion	79
4.1	Mutationsscreening	83
4.2	TP53-Mutationen	85
4.3	TP53-Mutationen und 17p-Deletion	88
4.4	Chromosomale Veränderungen	89
4.5	Korrelation zum klinischen Verlauf	91
5	Zusammenfassung	94
6	Literaturverzeichnis	96
7	Danksagung	104

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie der CLL

Die chronische lymphatische Leukämie (CLL) gehört zur Gruppe der lymphoproliferativen Erkrankungen und tritt in der westlichen Welt bei älteren Menschen als häufigste Form der Leukämie auf. Ihren Häufigkeitsgipfel erreicht die CLL im Alter zwischen 60 und 80 Jahren, ungefähr 20-30% der Patienten sind jedoch jünger als 60 Jahre alt (Rozman et al., 1995; Seiler et al., 2006). Männer haben ein 1,6-mal höheres Risiko an einer CLL zu erkranken als Frauen. Die Ätiologie der CLL ist bisher weitgehend ungeklärt. Phänotypisch sind die CLL-Zellen in 95% der Fälle relativ reife B-Lymphozyten. Die T-CLL, die aufgrund der Kriterien der Weltgesundheitsorganisation (WHO) als Prolymphozytenleukämie vom T-Zelltyp (T-PLL) gewertet wird, ist mit einem Anteil von 2-5% aller CLL-Fälle äußerst selten (Binet et al., 2006).

1.2 Biologie der CLL-Zellen

CLL-Zellen lassen sich anhand der Anzahl somatischer Hypermutationen in der variablen Region der Immunglobulin-Schwerkettengene (IGVH) in zwei Gruppen einteilen (Fais et al., 1998). Man geht davon aus, dass CLL-Zellen mit unmutierten IGVH-Genen von naiven B-Lymphozyten abstammen, die das Keimzentrum der Lymphfollikel, der Ort an dem die Affinitätsreifung der Immunglobuline stattfindet, noch nicht passiert haben. B-Zellen mit mutierten IGVH-Genen hingegen, entstammen größtenteils der Keimzentrumsreaktion, das heißt, eine Affinitätsreifung der Immunglobuline hat höchstwahrscheinlich stattgefunden. Neben dem T-Zell-abhängigen Weg der B-Zell-Reifung im Keimzentrum existiert möglicherweise auch ein T-Zell-unabhängiger Reifungsvorgang, bei welchem es ebenfalls zur Induktion von somatischen Mutationen in den IGVH-Genen kommen kann (Chiorazzi et al., 2005). Ungeachtet dieser Erkenntnis bleibt es weiterhin kontrovers, ob CLL-Zellen mit mutiertem (IGVH-M) oder unmutiertem (IGVH-UM) IGVH-Status, tatsächlich in diese beiden Reifungsstadien eingeteilt werden können (Klein et al., 2001; Rosenwald et al., 2001).

Im Rahmen der Pathogenese der CLL wird von einer Akkumulation der CLL-Zellen, durch Umgehung des programmierten Zelltodes (Apoptose), ausgegangen. Eine hohe Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 der CLL-Zellen unterstützt diese These (Reed, 1998). Neuere Erkenntnisse zur Biologie der CLL-Zellen postulieren, dass eine bestimmte Subgruppe der CLL-Zellen die Apoptose durch externe Stimulation möglicherweise umgeht (Chiorazzi et al., 2005). Diese Stimulation kann durch Aktivierung verschiedener Rezeptoren, wie Chemokin- oder Zytokinrezeptoren, den B-Zell-Rezeptor (BCR) selbst, oder durch Interaktion mit Stromalen Zellen und so genannten „nurse-like cells“, ausgelöst werden (Chiorazzi et al., 2005; Tsukada et al., 2002). Darüber hinaus besteht eventuell eine höhere Proliferationsrate, und auch eine höhere „turn-over“ Rate der CLL-Zellen, als bisher angenommen (Messmer et al., 2005). Es ist zu vermuten, dass die Tumorzellen durch Vermittlung externer Signale proliferieren, beispielsweise durch die Stimulation von CD38 durch seinen Liganden CD31 (Deaglio et al., 2003).

Wenn auch das Verständnis der Biologie der CLL-Zellen immer größer wird, bleibt dennoch unklar, woher diese Zellen stammen. Ein die Erkrankung auslösender Faktor wurde bisher nicht identifiziert.

1.3 Klinik der CLL

Klinisch äußern sich die Eigenschaften der CLL-Zellen in einer Akkumulation reif erscheinender, aber immunologisch inkompetenter Lymphozyten im peripheren Blut, Knochenmark und in den sekundär lymphatischen Organen. Dort führt die Infiltration von Tumorzellen im Verlauf der Erkrankung zu Organomegalie und Knochenmarkinsuffizienz durch Verdrängung der normalen Hämatopoese. Begleitsymptome wie Müdigkeit, Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsverlust (so genannte B-Symptome) können auftreten. Bei der körperlichen Untersuchung beobachtet man meist generalisierte oder lokalisierte Lymphknotenschwellungen. In fortgeschrittenen Stadien imponiert eine Spleno- und/oder Hepatomegalie, sowie Zeichen der Knochenmarkinfiltration mit Anämie und Thrombozytopenie. Oft leiden CLL-Patienten zusätzlich an Infektionen, die durch Verdrängung immunkompetenter B-Lymphozyten und Hypogammaglobulinämie

(60% der Fälle) begünstigt werden. Weiterhin treten autoimmunhämolytische Anämien in 10-25% der Fälle auf (Dighiero, 2003).

Der klinische Verlauf der CLL ist dennoch sehr heterogen. Ein Drittel der Erkrankten erfährt einen indolenten Krankheitsverlauf und weist, im Vergleich zur Normalbevölkerung, keine erhöhte Mortalität auf. Ein weiteres Drittel bleibt über lange Zeit asymptomatisch, bis schließlich eine Progression der Krankheit, meist in Form der oben beschriebenen Symptomatik, auftritt. Der Rest der Patienten erleidet, ähnlich einer akuten Leukämie, einen raschen Progress der Erkrankung (Dighiero, 2003; Dighiero, 2005; Rai et al., 2003).

1.4 Diagnostik

Immer mehr CLL-Patienten erhalten heute die Diagnose eher zufällig bei regelmäßigen Routineuntersuchungen durch eine erhöhte Lymphozytenzahl im peripheren Blut. Dies bedingt auch eine Tendenz zum jüngeren Diagnosealter.

Als diagnostischer Goldstandard hat sich in den letzten Jahren die zytomorphologische Untersuchung des peripheren Blutes zusammen mit der immunphänotypischen Charakterisierung des entarteten Zellklons etabliert (Hallek et al., 2004).

Zur klinischen Diagnose einer CLL wird eine anhaltende Lymphozytose (>4 Wochen) im peripheren Blut vorausgesetzt (Binet et al., 2006). Kleine, monomorphe Lymphozyten mit schmalem, basophilem Zytoplasmasaum und dichter scholliger Kernstruktur sind typisch für die CLL. Gumprecht'sche Kernschatten finden sich gehäuft, sind aber nicht ausschließlich bei der CLL zu finden, sondern auch bei anderen lymphoproliferativen Erkrankungen der B-Zellreihe mit leukämischer Ausschwemmung.

Die Immunphänotypisierung ist von entscheidender Bedeutung für die Abgrenzung der CLL zu anderen Erkrankungen der B-Zell-Reihe (B-Zell Non-Hodgkin-Lymphome (B-NHL)), wie der Prolymphozytenleukämie (PLL), Mantelzell- und follikulärem Lymphom sowie der Haarzell-Leukämie. Die Expression der B-Zell-Marker CD79a (Iga), CD19 und CD20 lässt eine Abgrenzung zur seltenen T-PLL zu. Eine klare Differenzierung

zwischen der CLL und anderen NHL wird durch das Matutes-Scoring erreicht (Matutes et al., 1994). Hierbei wird das Expressionsmuster der Antigene sIgM(+), CD5+, CD23+, CD22(+), FMC7- und CD79b(+) für die Beurteilung herangezogen. Typisch für die B-CLL ist die Koexpression von CD23 und CD5, ebenso wie die schwache (+) Oberflächenexpression von CD22, sowie die niedrige Expression der membrangebundenen Immunglobuline IgM und IgD (sIgM, sIgD). Monoklonalität wird durch den Nachweis einer Leichtkettenrestriktion κ oder λ bestätigt. FMC7 und CD79b (Ig β) werden niedrig oder gar nicht exprimiert. Einen Matutes-Score von 4 oder 5 wiesen in einer größeren Studie 87% der Fälle mit CLL auf, aber nur 0.3% der übrigen NHL. Konträr verhielt es sich bei einem Matutes-Score von 0 oder 1, den nur 0.4% aller CLL aufwiesen, jedoch 72% aller anderen untersuchten NHL (Matutes et al., 1994). Eine Knochenmark- beziehungsweise Lymphknotenhistologie wird zur Diagnosestellung heute nicht mehr zwingend benötigt.

1.5 Stadieneinteilung

Die Einteilung in klinische Stadien basiert auf der körperlichen Untersuchung und der Beurteilung des peripheren Blutes und richtet sich nach den von Rai und Binet beschriebenen Kriterien (Binet et al., 1981; Rai et al., 1975). Die Beschreibung des Ausmaßes der Erkrankung des einzelnen Patienten erfolgt anhand der Ausprägung der Lymphadenopathie, Splenomegalie, Hepatomegalie, Thrombozytopenie sowie Anämie. Somit erlauben die Stadieneinteilungen eine schnelle Einordnung der Patienten in Risikogruppen (z.B. die Stadieneinteilung nach Binet: Stadium A: niedriges Risiko, medianes Überleben: >10 Jahre, Stadium B: intermediäres Risiko, medianes Überleben: 5 Jahre, Stadium C: hohes Risiko, medianes Überleben: 2 Jahre) zum Status quo und erweisen sich darüber hinaus als hilfreich für die Festlegung des Therapiebeginns, wie auch zur Beurteilung des Therapieerfolgs. Zur Prognoseabschätzung eignen sich die beiden Systeme jedoch nur bedingt, da sie in den frühen Stadien der Erkrankung (Rai 0, I, II und Binet A, B) keine genauen Aussagen über den Verlauf zulassen.

Stadium	Lymphozytose*	Anzahl der Lymphknotenregionen	Hämoglobin*	Thrombozyten*
A	+	<3	≥10g/dL	≥100g/L
B	+	≥3	≥10g/dL	≥100g/L
C	+	≥3	<10g/dL	<100g/L

Tabelle 1: Die Stadieneinteilung der CLL nach Binet (1981). *Bestimmung im peripheren Blut

1.6 Prognose

Einige Patienten, die bei Diagnosestellung dem klinischen Stadium Binet A zugeordnet werden, erleben dann kurzfristig doch einen fulminanten Krankheitsverlauf (Dighiero, 2003; Dighiero, 2005). Aufgrund der Variabilität des Krankheitsverlaufs gibt es deshalb vielfältige Bemühungen Marker zu identifizieren, die eine präzisere Verlaufseinschätzung ermöglichen. Zahlreiche Parameter wurden infolgedessen auf ihre prognostische Aussagekraft und unabhängigen Voraussagewert geprüft. Im Folgenden sollen nur die wichtigsten prognostischen Parameter beschrieben werden.

1.6.1 Lymphozytenverdoppelungszeit und Serum-Thymidinkinase

Kinetische Parameter wie die Lymphozytenverdoppelungszeit (LVZ) ebenso wie der Serumparameter Thymidinkinase sind leicht und reproduzierbar zu bestimmen. Eine LVZ von weniger als einem Jahr oder auch erhöhte Serum-Thymidinkinase-Werte (>7U/L) können bei Patienten im Stadium Binet A eine rasche Progression der CLL und ein kürzeres Überleben voraussagen. Eine LVZ von mehr als 12 Monaten ist mit einem indolenten Verlauf assoziiert (Hallek et al., 1999; Montserrat et al., 1986).

1.6.2 Mutationsstatus der IGVH-Gene

Die deutlich aufwendigere Analyse des Mutationsstatus der variablen Immunglobulin Schwerketten Genregion (IGVH-Gene) durch Sequenzierung hat starke, unabhängige

prognostische Aussagekraft. Ein unmutierter Mutationsstatus, bei welchem die IGVH-Gene eine Homologie zur ursprünglichen Keimbahnsequenz der IGVH-Gene von $\geq 98\%$ aufweisen, geht mit einer schlechteren Prognose einher als ein mutierter Mutationsstatus (Damle et al., 1999; Hamblin et al., 1999). In einer Untersuchung von Hamblin et al. überlebten Binet A Patienten mit unmutiertem IGVH-Status im Median 95 Monate (ca. 8 Jahre). Anders verhielt es sich bei den Patienten mit mutierten IGVH-Genen ($>2\%$ somatische Mutationen detektiert). Diese Patienten hatten eine mediane Überlebenszeit von 293 Monaten (ca. 24 Jahre) (Hamblin et al., 1999). Eine Ausnahme konnte für Fälle gezeigt werden, die zwar mehr als 2% somatische Mutationen aufwiesen, aber dabei das IGVH-Gen 3-21 betroffen war. Der Verlauf der Erkrankung bei diesen Patienten ähnelte dem der unmutierten Fälle (Tobin et al., 2002).

1.6.3 CD38 und ZAP-70 Expression

Von prognostischer Bedeutung sind auch die durchflußzytometrisch gemessenen Expressionswerte von CD38 und des Zeta-assoziierten Proteins 70 (ZAP-70) (Damle et al., 1999; Orchard et al., 2004). ZAP-70 ist eine zytoplasmatische Tyrosinkinase, die physiologischerweise mit der Zeta-Kette des Korezeptors CD3 des T-Zellrezeptors assoziiert ist, aber in unterschiedlichem Ausmaß auch bei B-CLL-Zellen exprimiert wird (Wiestner et al., 2003). Die CD38- und ZAP-70-Expression kann durch Immunphänotypisierung mit spezifischen Antikörpern bestimmt werden.

Patienten, deren CD38-Expressionsrate einen Schwellenwert von 30% übersteigt, neigen zu einer ungünstigen Prognose (Damle et al., 1999; Ibrahim et al., 2001). Die CD38-Expression unterliegt jedoch einer gewissen Dynamik und kann sich während des Krankheitsverlaufs ändern (Hamblin et al., 2002). Außerdem werden je nach Studie unterschiedliche Schwellenwerte für die prognostisch ungünstige CD38-Expression definiert (Krober et al., 2002).

Ähnlich verhält es sich bei Patienten, deren ZAP-70-Expression durchflußzytometrisch eine Schwelle von 20% überschreitet. Auch in diesen Fällen schreitet die Erkrankung meist schneller voran. Studien zeigen eine enge Korrelation zwischen dem Expressionswert von ZAP-70 und dem Mutationsstatus der IGVH-Gene (Crespo et al.,

2003; Orchard et al., 2004). Da aber in 10-20% der Fälle keine klare Korrelation zwischen dem Mutationsstatus und der ZAP-70-Expression besteht, gibt es bereits Studien, die die nicht übereinstimmenden Fälle (IGVH-M/ZAP70+ bzw. IGVH-UM/ZAP70-) bezüglich des klinischen Verlaufs untersuchten (Rassenti et al., 2004). Dabei scheint, unabhängig vom IGVH-Mutationsstatus, ein positiver ZAP70-Status (>20%) auf einen schlechteren klinischen Verlauf hinzudeuten (Rassenti et al., 2004). Aufgrund der bisher fehlenden Standardisierung bei der Bestimmung der ZAP70-Expression in der Immunphänotypisierung wird in der Routinediagnostik momentan der IGVH-Mutationsstatus als der prognostische Goldstandard betrachtet.

1.6.4 Zytogenetik

Bereits in den 70er und 80er Jahren des letzten Jahrhunderts wurde versucht, mithilfe der Chromosomenbänderungsanalyse regelmäßig wiederkehrende zytogenetische Aberrationen bei der CLL zu identifizieren, und genauer zu charakterisieren. Aufgrund der schlechten Teilungsfähigkeit der CLL-Zellen ergab sich in diesen frühen Studien noch kein vollständiges Bild über das Ausmaß der Veränderungen (Gahrton et al., 1980b; Gahrton et al., 1987; Robert et al., 1982). Neben dem Zusatz von Phytohämagglutinin (PHA) war auch durch neuere B-Zell-Mitogene wie Tetradekanoyl-Phorbolacetat (TPA), Lipopolysaccharid (LPS) und Epstein-Barr-Virus (EBV) die Ausbeute und Qualität an Metaphasen gering und die klassische Zytogenetik zur Untersuchung klonaler chromosomaler Aberrationen eher ungeeignet (Gahrton et al., 1982).

Die am häufigsten identifizierte klonale Veränderung war eine Trisomie des Chromosoms 12, gefolgt von einer Deletion 13q (Gahrton et al., 1980a; Gahrton et al., 1980b; Juliusson et al., 1990a). Eine eher sporadisch, aber dennoch regelmäßig auftretende Anomalie war eine Deletion auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 (Juliusson et al., 1990b). Auch mithilfe der klassischen Chromosomenanalyse an Metaphasen ließen sich Aussagen über den Progress, beziehungsweise die Schwere der Erkrankung machen (Han et al., 1984; Juliusson et al., 1985). Patienten mit normalem Chromosomensatz zeigten bessere Überlebenschancen als Patienten mit chromosomalen Aberrationen. Die schlechtesten Prognosen wiesen

Patienten mit komplex aberrantem Karyotyp (s. unten) auf (Juliusson et al., 1985; Juliusson et al., 1990b).

Durch die Comparative Genomische Hybridisierung (CGH) wurden weitere Verluste oder Zugewinne chromosomalen Materials entdeckt (Bentz et al., 1995). Die Identifizierung häufig wiederkehrender Aberrationen führte in den 90er Jahren zur Etablierung eines Sets fluoreszenzmarkierter Sonden. Mithilfe der so genannten Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) an Interphasekernen, werden heute bei etwa 80% der CLL-Patienten rekurrente chromosomale Aberrationen nachgewiesen (Bentz et al., 1995; Dohner et al., 2000; Pinkel et al., 1986).

Da sich die klassische Chromosomenanalyse an Metaphasen aufgrund der schlechten in vitro Mitoserate der Tumorzellen bis vor kurzem nicht zur Routinediagnostik von genetischen Aberrationen bei der CLL bewährt hat, wurde die FISH-Technik zur Methode der Wahl in der Diagnostik bekannter struktureller und numerischer chromosomaler Aberrationen. Die häufigsten Aberrationen sind Deletionen auf den Chromosomen 13q, 11q, 6q und 17p sowie eine Trisomie des Chromosoms 12 (Dohner et al., 2000).

Eine monoallelische (heterozygote) Deletion 13q wird durch FISH-Analysen in 55% aller Fälle detektiert. Davon weisen ca. 10% eine biallelische (homozygote) Deletion 13q auf. Bei 18% aller CLL-Fälle wird keine chromosomale Aberration nachgewiesen und bei 16% besteht eine Trisomie des Chromosoms 12. Patienten mit Deletion 13q als einziger Aberration (36%), einem normalen Karyotyp (keine detektierbare Aberration) oder einer Trisomie 12, haben nicht nur eine relativ gute Prognose mit medianen Überlebenszeiten von 133, 111 und 114 Monaten (ca. 11,8, 9,3 und 9,5 Jahre), sondern zeigen meist auch ein gutes Ansprechen auf eine Immun- und/oder Chemotherapie (Byrd et al., 2006a; Dohner et al., 2000). Das Auftreten dieser drei häufigen Aberrationen korreliert gut mit dem Vorhandensein mutierter IGVH-Gene (Oscier et al., 2002). Anders verhält es sich bei Patienten, bei welchen eine Deletion 11q mittels FISH-Technik nachgewiesen wird. Bei einer Inzidenz von 18% beträgt das mediane Überleben dieser Subgruppe ungefähr 79 Monate (ca. 6,6 Jahre) (Dohner et al., 2000). Die Deletion 11q steht auch in engem

Zusammenhang mit unmutierten IGVH-Genen und zeigt häufig ausgeprägte Lymphknotenschwellungen (Dohner et al., 1997; Oscier et al., 2002).

Die seltenste, mit dem Standard FISH-Panel detektierbare und prognostisch ungünstigste Aberration, ist die Deletion 17p (Dohner et al., 2000).

Meist ist diese das Resultat aus der Entstehung eines Isochromosoms 17q, oder einer unbalancierten Translokation mit Verlust des kurzen Arms von Chromosom 17 (Fink et al., 2006). Eine 17p-Deletion hat den monoallelischen Verlust des Tumorsuppressorgens TP53 zur Folge. Die Inzidenz der 17p-Deletion, auch als TP53-Deletion bezeichnet, liegt bei ungefähr 7% (Dohner et al., 1995; Dohner et al., 2000). Bei einem medianen Überleben von 32 Monaten (ca. 2,7 Jahre) ist der Verlust von TP53 der ungünstigste prognostische Parameter bei der CLL (Dohner et al., 2000). Zusammen mit dem Mutationsstatus der IGVH-Gene hat die 17p-Deletion den größten unabhängigen Voraussagewert für das Überleben bei der CLL (Oscier et al., 2002). Wie von Byrd et al. gezeigt werden konnte, sprechen Patienten der Hochrisikogruppe (Rai III, Binet C) partiell auf eine Chemotherapie und/oder Immuntherapie mit Fludarabin und Rituximab (ein therapeutisch verwendeter Anti-CD20 Antikörper) an, solche mit TP53-Deletion jedoch nur sehr kurz. Eine komplette Remission wurde bei keinem dieser Patienten erreicht. (Byrd et al., 2003; Byrd et al., 2006a) Neuere Studien zeigen Therapieerfolge bei Behandlung mit dem Anti-CD52 Antikörper Alemtuzumab (Campath-H1) (Byrd et al., 2006b; Osuji et al., 2005; Stilgenbauer et al., 2002). Die Frage, ob sich eine solche, dann frühzeitig eingesetzte Therapie, bei Hochrisikopatienten günstig auf das Überleben auswirkt, wird derzeit in klinischen Studien untersucht.

1.7 Das Tumorsuppressorgen TP53

Tumorsuppressorgene sind normale zelluläre Gene, deren Genprodukte eine entscheidende Rolle in Wachstum und Differenzierung von Zellen spielen. Unter anderem können sie eine unterdrückende Wirkung auf das Wachstum bestimmter Zellen ausüben. Der Verlust dieser Funktionen („loss of function“) kann zu einer deregulierten Proliferation betroffener Zellen führen. Tumorsuppressorgene verhalten sich rezessiv, das heißt, dass meist beide Allele verändert sein müssen, um einen Funktionsverlust zu

bewirken (Knudson, Jr., 1971; Knudson, 2001). TP53 gilt als das prominenteste Tumorsuppressorgen und weist in nahezu 50% aller Tumorentitäten Anomalien auf. Der Verlust des kurzen Armes von Chromosom 17 bei der CLL, führt zum Verlust eines TP53-Allels (TP53-Deletion).

Das TP53-Gen besteht aus 11 Exons, die in der chromosomalen Bande 17p13 lokalisiert sind und codiert für den nukleären Transkriptionsfaktor TP53, der unter normalen Bedingungen in der Zelle eine geringe Halbwertszeit hat (Isobe et al., 1986; Lamb et al., 1986). Zellulärer Stress, unter anderem in Form von DNA-Schäden, induziert eine Hochregulation und verstärkt die Aktivität von TP53. Die Phosphorylierung von Mouse Double Minute 2 (MDM2) durch Kinasen wie Ataxia-teleangiectasia-mutated (ATM) und Checkpoint Kinase 2 (CHK2), veranlasst die Dissoziation des physiologischen MDM2/TP53-Komplexes und infolgedessen die Aktivierung von TP53 (Soussi et al., 2001). Dies äußert sich in der Arretierung der Zelle im G1/S- oder G2/M-Kontrollpunkt des Zellzyklus und der Aktivierung von DNA-Reparaturmechanismen. Bei Behebung des ursprünglichen Defekts wird TP53 über Wechselwirkung mit der Ubiquitin-Ligase MDM2 außerhalb des Zellkerns durch das Proteasom abgebaut. Besteht der Schaden fort, führt TP53 über Anschalten unterschiedlicher Signalwege zur erneuten DNA-Reparatur, zum Zellzyklusarrest oder zum programmierten Zelltod (Soussi et al., 2001). TP53, auch als „Hüter des Genoms“ bezeichnet, ist ein essentieller Bestandteil der zellulären Integrität und der Verlust der physiologischen TP53-Aktivität durch Alterationen prädisponiert betroffene Zellen zur kanzerogenen Entartung. Die meisten neoplastischen Erkrankungen mit dysfunktionalem TP53 sind mit sehr ungünstiger Prognose vergesellschaftet und sprechen häufig schlecht auf eine Therapie an (Sigal et al., 2000; Soussi et al., 2001).

Die häufigsten Veränderungen im TP53-Gen stellen Punktmutationen, oftmals in Form von Missense-Mutationen dar. Diese finden sich zum Großteil in dem für die DNA-Bindungsdomäne (Aminosäuren 102-292) codierenden Genbereich (Sigal et al., 2000). Solche Missense-Mutationen können zu einem „loss of function“ mit nukleärer Akkumulation des mutierten TP53-Proteins führen (Buschmann et al., 2000; Haupt et al., 1997; Midgley et al., 1997).

Die Häufigkeit von TP53-Aberrationen (TP53-Mutation/TP53-Deletion) bei der CLL wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen untersucht. Durch Single-Strand-Conformation-Polymorphism-Analyse (SSCP-Analyse), aber auch mittels immunhistochemischer Färbung, sowie mithilfe der Durchflusszytometrie, wurde auf eine Inzidenz der TP53-Mutation von 10-15% rückgeschlossen (el Rouby et al., 1993; Fenaux et al., 1992; Gaidano et al., 1991; Thornton et al., 2004; Wattel et al., 1994).

1.8 Der komplex aberrante Karyotyp

Die Akkumulation chromosomaler Veränderungen in Form von numerischen und/oder strukturellen Aberrationen, ist ein Zeichen genomischer Instabilität. Diese wiederum kann beispielsweise durch partielle Ausfälle der DNA-Reparaturmechanismen oder auch durch eine fehlerhafte Überwachung der Zellzyklusfunktion entstehen. Tumorzellen, die bestimmte Selektionsvorteile gegenüber anderen Tumorzellen besitzen, häufen in ihrer weiteren Entwicklung die unterschiedlichsten Aberrationen an. Man spricht von einem komplex aberranten Karyotyp, wenn 3 oder mehr chromosomale Veränderungen vorliegen (Schoch et al., 2005).

Bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) ist der komplex aberrante Karyotyp bereits gut untersucht. AML-Patienten mit komplex aberrantem Karyotyp werden der Hochrisikogruppe zugeordnet, da sie ein medianes Überleben von weniger als 6 Monate aufzeigen (Schoch et al., 2001). Die AML mit komplex aberrantem Karyotyp wird als eigenständige biologische Entität diskutiert und betrifft circa 10-20% der Fälle. Deletionen durch unbalancierte Translokationen auf den Chromosomen 5q, 7q und 17p sind charakteristisch für „typische“ komplex aberrante Karyotypen. Eine Untersuchung dieser zytogenetischen Subgruppe bei AML-Patienten, ergab eine Inzidenz der TP53-Mutation von bis zu 80% (Haferlach et al., 2008; Schoch et al., 2005). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Mutationen im Tumorsuppressorgen TP53 bei der AML zur Entstehung chromosomaler Instabilität in Form komplexer struktureller und numerischer Aberrationen beitragen könnten. Des Weiteren könnte eine TP53-Mutation u.a. für die schlechte Prognose und das schlechte Ansprechen auf eine Therapie, in genau dieser Gruppe, verantwortlich sein.

1.9 Zielsetzung dieser Studie

Ein vor kurzem eingeführtes Protokoll zur Stimulation der B-CLL-Zellen in Kurzzeit-Kultur liefert in mehr als 95% der Fälle auswertbare Metaphasen und macht somit die klassische Chromosomenanalyse bei der CLL auch für die Routinediagnostik zugänglich (Dicker et al., 2006). Zytogenetisch detektierbare Aberrationen, welche nicht durch das CLL spezifische FISH-Panel erkannt werden, können nun durch die Bänderungsanalyse aufgedeckt werden.

Angesichts dieser Situation stellt sich die Frage, ob TP53-Aberrationen mit einem bestimmten zytogenetischen Muster innerhalb der CLL in Verbindung stehen? Analog zur AML könnten Aberrationen im Tumorsuppressorgen TP53, auch bei der CLL mit komplex aberranten Karyotypen assoziiert sein.

In der vorliegenden Studie wurden 193 unselektierte CLL-Patienten auf TP53-Aberrationen untersucht. Das Screening nach TP53-Aberrationen umfasste zunächst die Analyse von 17p-Deletionen mittels FISH an Interphasekernen. Kleinere Deletionen/Insertionen und Mutationen innerhalb der codierenden Bereiche des TP53-Gens wurden dann zusätzlich mithilfe der denaturierenden High Performance Liquid Chromatographie (DHPLC) und des P53Amplichips von Roche Molecular Systems untersucht.

Es bestanden folgende Arbeitshypothesen: Erfasst die FISH-Analyse tatsächlich alle Fälle mit einer TP53-Aberration oder könnten durch ein hinzukommendes, modernes TP53-Mutationsscreening zusätzliche Patienten mit TP53-Dysfunktion erkannt werden? Wenn ja, beeinflusst neben einer TP53-Deletion ebenso eine isolierte TP53-Mutation den klinischen Verlauf der betroffenen Patienten?

2 Material und Methoden

2.1 Patienten

Die in dieser Untersuchung analysierten Patientenproben stammen von Patienten, deren Knochenmark oder peripheres Blut im Zeitraum von August 2005 bis April 2006 im Münchner Leukämie Labor (Leitung: Prof. Dr. med. Dr. phil. Torsten Haferlach, PD Dr. med. Wolfgang Kern, PD Dr. med. Claudia Haferlach, PD Dr. rer. nat. Susanne Schnittger) untersucht wurde. Es wurden ausschließlich Proben untersucht, die die morphologischen Kriterien der WHO Klassifikation erfüllten und bei welchen die Diagnose CLL oder CLL/PLL eindeutig mittels Immunphänotypisierung durch Expression von CD5, CD19 und CD23 sowie einer schwachen Expression von Ig und CD22 bestätigt werden konnte (Matutes et al., 1994). Für alle verwendeten Proben der Kohorte liegt eine Einverständniserklärung der Patienten zur erweiterten, anonymisierten, rein wissenschaftlichen Analyse des Untersuchungsmaterials vor. Eine Zustimmung der Ethikkommission der Bayerischen Landesärztekammer liegt ebenfalls vor (Ethikkommission Nr. 05117).

Das in dieser Studie untersuchte, unselektierte Patientenkollektiv umfasst 67 Frauen (35%) und 126 Männer (65%) (Ratio: 1,88). Zur Ermittlung des klinischen Verlaufs der Patienten wurde mit den zuständigen Ärzten kommuniziert. Von den insgesamt 193 Patienten wurde bei 78 Patienten die Erstdiagnose einer CLL im Münchner Leukämie Labor gestellt. Bei den übrigen Patienten erfolgte die Diagnosestellung bereits in einer anderen medizinischen Einrichtung und die Analyse im Münchner Leukämie Labor erfolgte dann im weiteren Verlauf der Erkrankung. Alle Patienten wurden auf TP53-Mutationen und 17p-Deletionen, mittels DHPLC-Analyse und FISH, getestet. Diejenigen Proben, die einen auffälligen Befund in der DHPLC-Analyse zeigten, wurden nachfolgend durch direkte Sequenzierung genauer analysiert. Außerdem wurden alle 193 Patientenproben unter Zuhilfenahme des P53Amplichips (ROCHE Molecular Systems) resequenziert. In dem hier zugrunde gelegten Kollektiv wurde bei 181 Patienten der IGVH-Status und bei 158 Patienten die Expression von CD38 bestimmt.

Bei 159 der 193 bearbeiteten CLL-Proben erfolgte außerdem eine detaillierte Chromosomenanalyse auf Metaphasenebene.

2.2 Molekulargenetische Untersuchungen

2.2.1 Isolierung mononukleärer Zellen

Über eine Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation erfolgt zunächst eine Anreicherung der mononukleären Leukämiezellen. Dabei wird das Probenmaterial im Verhältnis 1:1 mit PBS Puffer verdünnt und anschließend auf die gleiche Menge Ficoll (Bicoll Separation Solution, Biochrom AG, Berlin) geschichtet. Die Trennung und gleichzeitige Anreicherung von mononukleären Zellen des Blutes erfolgt durch die Dichtegradientenzentrifugation (verwendete Zentrifuge: Heraeus Multifuge 3L-R, Thermo Electron Corporation, Langenselbold, 2400 U/min-20min-ohne Bremse-20°C). Nach Abnehmen der Interphase, in der die mononukleären Zellen enthalten sind, und Waschen der Zellen in PBS, wird die Zellzahl mittels automatisierter Zellzählung (Sysmex, KX-21N, Sysmex Corporation, Kobe, Japan) ermittelt. Zur späteren Isolierung von DNA werden 5×10^6 Zellen pro Reaktionsgefäß verteilt. Nach erneuter Zentrifugation (verwendete Zentrifuge: Heraeus Biofuge pico, 2000 U/min-5min-20°C) und Abnahme des Überstands wird das Zellpellet schließlich in 100µl PBS Puffer resuspendiert.

Die isolierten Zellen wurden entweder sofort weiter prozessiert oder bei -80°C eingefroren, um zu einem späteren Zeitpunkt untersucht zu werden.

2.2.2 Automatisierte DNA Extraktion mittels MagNa Pure LC

Die Isolierung der genomischen DNA erfolgte für diese Untersuchung mit dem MagNa Pure LC (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) und dem entsprechenden DNA Extraktions-Kit (MagNa Pure LC DNA Isolation Kit-Large Volume, Roche Diagnostics). Das Prinzip der DNA Extraktion beruht auf der Bindung der genomischen DNA an so genannte Magnetic Beads (MGP's, Magnetic Glass Particles), während ungebundene

Zellbestandteile wie Proteine, Membranen, Zelldedritus etc. durch mehrere Waschschriffe entfernt werden.

Es wurde das Protokoll DNA LV Cells angewendet, welches für Materialien mit bis zu 5×10^6 Zellen konzipiert ist. Im ersten Schritt wird durch Proteinase K eine Auflösung der zellulären Proteinstruktur erreicht. Zugabe von Lyse Puffer führt zur vollständigen Zelllyse. Die DNA bindet im nächsten Schritt an eine Silica Matrix, welche die Magnetic Beads umgibt. Anschließend werden durch Waschpuffer I überschüssige Zellbestandteile wie zerstörte Membranen oder Nukleasen, ebenso wie Heparin oder Hämoglobin ausgewaschen. In zwei weiteren Waschschriffen mit den Waschpuffern II und III werden letzte Verunreinigungen sowie Ethanol, beseitigt. Die gereinigte DNA wird schließlich in 200µl Elutionspuffer aufgenommen.

2.2.3 Messung der DNA-Konzentration

Die Ermittlung der DNA-Konzentration der gereinigten Proben erfolgte photometrisch durch Messung der Extinktion bei 260nm und 280nm mit dem Spektralphotometer NanoDrop ND 1000 (PEQLAB, Biotechnologie GmbH, Erlangen). Die Berechnung der DNA-Konzentration erfolgt automatisch mithilfe der Extinktionswerte über die dazugehörige „Operating Software“.

Für spätere PCR-Amplifikationen wurden von allen Proben Verdünnungen mit einer DNA-Konzentration von 50 ng/µl hergestellt.

2.2.4 Amplifikation des TP53-Gens

Die Amplifikation der Exons 3-4, 5-6, 7 und 8-9 (Aminosäuren 25-331 des TP53-Gens) wurde durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erreicht (Mullis et al., 1992; Saiki et al., 1992).

Mit Hilfe der PCR können Abschnitte des Genoms exponentiell vervielfältigt und somit einer genaueren Untersuchung unterzogen werden. Benötigt wird die aus dem Untersuchungsmaterial isolierte Original-DNA, die den zu amplifizierenden Bereich

enthält, sowie zwei Oligonukleotide (Primer), die auf den denaturierten DNA-Einzelsträngen die Startpunkte der Polymerisation bestimmen. Für die Polymerisation bedarf es sogenannter Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs) und einer thermostabilen DNA-Polymerase. Durch die spezifische Anlagerung der Primer, die eine Länge von 20-25 Nukleotide aufweisen, an einzelsträngige DNA (Template), wird der thermostabilen Taq-Polymerase die Synthese des komplementären Abschnitts ermöglicht. Die Vervielfältigung des DNA-Abschnittes mittels PCR folgt dabei einem sich wiederholenden, mehrstufigem Temperaturzyklus: Durch initiales Schmelzen (Denaturierung, 1. Schritt) bei 94-96°C kommt es zur Trennung des doppelsträngigen DNA-Templates in Einzelstränge. Die Wasserstoffbrückenbindungen, die die beiden DNA-Stränge zusammenhalten, werden aufgebrochen. Initial sollte die DNA für längere Zeit erhitzt werden (ca. 2 Minuten), um eine vollständige Trennung aller doppelsträngigen DNA im Ansatz zu erreichen. Für die Primerhybridisierung (Annealing, 2. Schritt) wird die Temperatur in einen Bereich zwischen 50-65°C (das Temperaturoptimum ist Primer-abhängig) gesenkt. Eine zu niedrige Temperatur kann zu einer unspezifischen Bindung der Primer an die DNA führen. Bei optimaler Einstellung der Annealingtemperatur binden die Primer an die einzelsträngige DNA und ermöglichen innerhalb der Verlängerungsphase (Elongation, 3. Schritt) (Optimum der Taq-Polymerase: zwischen 68°C und 72°C) die Synthese des Komplementärstrangs. Die DNA-Synthese durch die Taq-Polymerase beginnt an den Primer-Startpunkten in 5'-3'-Richtung.

Dieser Zyklus wird in der Regel 30-35 mal wiederholt, wobei es idealerweise in jedem PCR-Zyklus zu einer Verdoppelung der Menge der von den Primern flankierten, genomischen Region kommt.

Für die hier erfolgte Untersuchung wendeten wir ein so genanntes Touchdown-PCR-Protokoll zur Erhöhung der Spezifität an. Hier wird im ersten PCR-Zyklus eine Annealingtemperatur gewählt, die 7°C über der berechneten Temperatur liegt. Innerhalb der folgenden 14 PCR-Zyklen wird die Annealingtemperatur um 0.5°C pro Zyklus verringert, wodurch während der initialen PCR-Zyklen eine unspezifische Bindung der

Primer im Genom verhindert werden soll. Für die folgenden 20 Zyklen wurde eine Annealingtemperatur von 62°C gewählt.

Temp.	Zeit	Schritt	Anmerkung
95°C	2min		
95°C	30s	Denaturierung	} 15 Zyklen (Annealing Temperatur verringert sich pro Zyklus um 0.5°C)
69°C	30s	Annealing	
72°C	30s	Elongation	
95°C	30s	Denaturierung	} 20 Zyklen
62°C	30s	Annealing	
72°C	30s	Elongation	
72°C	10min		
12°C	∞		

Tabelle 2: Touchdown-PCR-Protokoll zur Amplifikation der Exons 3-9 des TP53-Gens. Darstellung der für Denaturierung, Annealing und Elongation gewählten Temperaturen und Zeiten.

In dieser Studie wurden die Exons 3-9 der 11 Exons des TP53-Gens untersucht. Aufgrund ihrer räumlichen Nähe wurden die Exons 3, 4 (485 bp), die Exons 5, 6 (478 bp) und die Exons 8, 9 (393 bp) jeweils zu einem PCR-Produkt zusammengefasst. Exon 7 (211 bp) wurde einzeln amplifiziert.

Zielsequenz	Primersequenz (forward)	Primersequenz (reverse)	Größe*
Exon 3-4	5'-aattcatgggactgactttctgctctgtgc-3'	5'-gggatacggccaggcattgaagtctc-3'	485bp
Exon 5-6	5'-cttgtgccctgactttcaactctgtctc-3'	5'-gccactgacaaccacccttaaccctc-3'	478bp
Exon 7	5'-gccacaggctccccaaaggc-3'	5'-tggggcacagcaggccagtg-3'	211bp
Exon 8-9	5'-gtaggacctgatttcctactgcctctgtgc-3'	5'-aaccttcacttgataagaggtcccaagac-3'	393bp

Tabelle 3: Erwünschtes PCR-Produkt (Zielsequenz) und verwendete Primersequenzen. *Größe der Zielsequenz in Basenpaaren (bp).

Alle PCR-Produkte konnten unter den gleichen PCR-Bedingungen (Protokoll s.o.) amplifiziert werden (verwendete Thermocycler: MJ Research, Peltier Thermal Cycler, Diad Disciple vertrieben durch BIO-RAD Laboratories, München). Das Gesamtvolumen des PCR-Ansatzes betrug 50µl, die eingesetzte Menge an DNA belief sich auf 200ng. Darüber hinaus bestand ein PCR-Ansatz aus 5µl Puffer (Optimase-Polymerase 10X

Reaction Buffer, Transgenomic, Omaha, Nebraska, USA, erwünschte Konzentration im Ansatz: 1X), 1µl dNTPs (erwünschte Konzentration: 0.2µM), jeweils 2µl forward (F)- und reverse (R)-Primer (erwünschte Konzentration: 0.4µM) sowie 1µl Optimase® (Optimase-Polymerase, 2.5U/µl, Transgenomic).

Zusätzlich zu der Amplifizierung der Patientenproben wurde innerhalb jedes Experimentes gleichzeitig die Amplifizierung des jeweiligen Wildtyp-Fragmentes durchgeführt, welches als Kontrolle für die nachfolgende DHPLC-Untersuchung verwendet wurde. Die Wildtyp-DNA stammte aus einem Pool von bereits untersuchten Proben, bei welchen weder durch das DHPLC-System noch durch direkte Sequenzierung Mutationen oder Polymorphismen detektiert werden konnten. Ein Kontrollansatz frei von DNA zum Ausschluss von Kontaminationen wurde bei jeder PCR-Reaktion mitgeführt.

2.2.5 Gel-Analyse

Die Agarose-Gelelektrophorese eignet sich zum Auftrennen von Nukleinsäuren (DNA oder RNA) nach ihrer Größe. Im Vergleich mit Nukleinsäuresträngen bekannter Größe, beispielsweise eines DNA-Molekulargewichtstandards, lässt sich somit die ungefähre Länge von PCR-Produkten ermitteln. Die vernetzten Agarosepolymere im Agarosegel bilden Poren aus, die wie ein Molekularsieb wirken. Je höher die Agarose konzentriert ist, desto kleinere Poren bilden sich im Gel aus. Beim Anlegen einer Spannung an die Elektrophoresekammer, wandern die negativ geladenen Nukleinsäuren im Agarosegel in einem elektrischen Feld in Richtung der Anode. Kleinere Moleküle wandern, im Vergleich zu größeren Molekülen, schneller. Durch Zugabe von DNA-interkalierenden Farbstoffen zum Gel, lassen sich mithilfe der UV-Belichtung, die Nukleinsäuren sichtbar machen, qualitativ auswerten sowie deren Länge bestimmen.

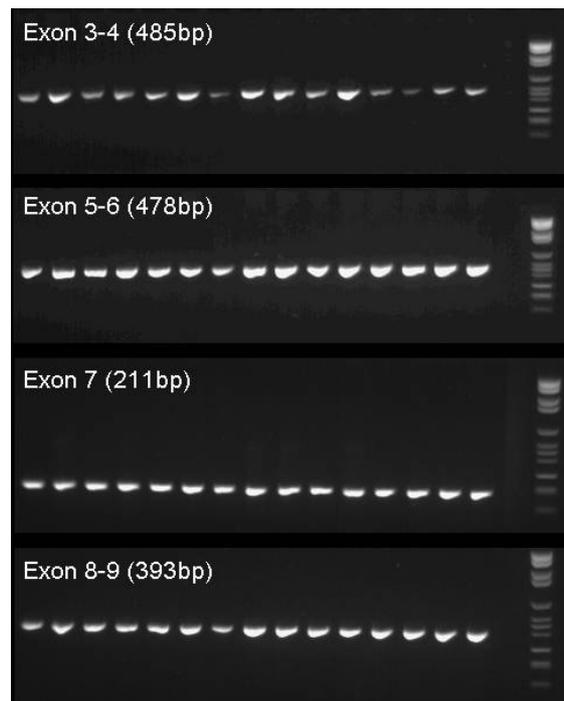


Abbildung 1: Kontrolle der PCR: Im gezeigten Beispiel wurden die Exons 3-9 von 13 Patientenproben sowie von einer Wildtyp-Probe erfolgreich amplifiziert. Die unterschiedlich großen PCR-Produkte werden in Form fluoreszierender Banden sichtbar. Durch das Fehlen einer Bande in der letzten Spur (rechts im Bild), kann eine Kontamination des PCR-Ansatzes ausgeschlossen werden. Der DNA-Molekulargewichtsmarker (Boehringer 6, rechts im Bild) lässt eine grobe Abschätzung der Fragmentgröße zu. bp=Basenpaare

Der Erfolg der PCR-Amplifikation für die vorliegende Untersuchung wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese auf 1.8% Agarosegelen (Agarose: Electrophoresis Grade, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, 1X TBE Puffer, Invitrogen) überprüft. Diese wurden mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff SYBR Safe (SYBR Safe 10.000X, Invitrogen) versetzt. Dabei wurde ein Teil des PCR-Amplifikates (10µl) mit Bromphenolblau-Puffer gemischt, anschließend in die Taschen des Agarosegels pipettiert und dieses bei einer Spannung von 160V, 30-45min in einer mit 1X Trisborat-Puffer (TBE-Puffer) gefüllten Gelkammer, belassen. Bei Belichtung mit dem UV-Transilluminator (Photodokumentationsanlage: Intas, UV-Systeme, Heidelberg) konnte das Gelingen der PCR durch die Anwesenheit der PCR-Produkte in Form der jeweiligen Bande bestätigt werden. Eine Kontamination durch Fehlen eines Produktes, beziehungsweise einer Bande, wurde im Negativ-Kontrollansatz ausgeschlossen.

2.2.6 TP53-Mutationsscreening mittels DHPLC-Analyse

Bei der DHPLC handelt es sich um ein Verfahren, welches sich das unterschiedliche Schmelzverhalten von Homo- und Heteroduplex-DNA zur Detektion von Mutationen zunutze macht (s. Abbildung 2). Über das Reagenz Triethylammoniumacetat (TEAA) wird eine Interaktion zwischen der injizierten DNA-Probe und der Säulenmatrix (Polystyrol-Divinylbenzol, PS-DVB) des Analysegeräts (WAVE Nucleic Acid Fragment Analysis System, Transgenomic, Omaha, Nebraska, USA) hergestellt. Am PS-DVB-Copolymer befinden sich lineare C-18 Kohlenstoffketten, welche C-C-Einfachbindungen ausbilden. Die Säulenmatrix ist ungeladen und hydrophob, was allgemein eine Interaktion mit DNA verhindert. TEAA fungiert als Brückenmolekül zwischen DNA und Säulenmatrix, indem es über hydrophobe Seitenketten mit den C-18-Ketten der Säulenmatrix interagiert und gleichzeitig aufgrund seiner positiven Ladung die negativ geladenen DNA bindet. Diese Interaktion wird durch Acetonitril unterbrochen und führt zur Elution der Nukleinsäure von der Säulematrix. Die Acetonitrilkonzentration wird langsam über die Zeit erhöht, so dass bei niedriger Konzentration eine Interaktion zwischen Säule und Probe möglich ist. Zu einem bestimmten Zeitpunkt, beziehungsweise ab einer bestimmten Acetonitrilkonzentration, wird die Bindung des DNA-Fragments an die Säulenmatrix aufgehoben und das eluierte DNA-Fragment bei einer Wellenlänge von 260nm detektiert. Zur Analyse des betreffenden Fragments wird dessen Kurvenverlauf mithilfe der Navigator Software (Transgenomic) beurteilt.

Die Analyse einer DNA Probe mittels DHPLC erfolgt in vier Phasen, die sich durch unterschiedliche Zusammensetzung der Puffer A (0.1M TEAA Solution in water, pH7) und B (0.1M TEAA Solution in water, pH7, 25% Acetonitril) in der mobilen Phase voneinander unterscheiden. Beide Puffer werden mit einer Fließgeschwindigkeit von 1,5 ml/min über die Säule gepumpt.

Die erste Phase dient zur Injektion des DNA Fragments (Loading) und dauert 30 Sekunden. Der Anteil des Puffers B wird dabei um 5% (1.25% Acetonitril) erhöht. Im nächsten Schritt kommt es zur Lösung der DNA Probe von der Säulenmatrix (Gradient). Innerhalb dieser Phase variiert der Anteil des Puffer B zwischen 48% (12% Acetonitril) und 69% (17.25% Acetonitril). Anschließend wird die Acetonitrilkonzentration für 30

Sekunden auf 25% (100% Puffer B) erhöht, was der vollständigen Reinigung der Säulenmatrix dient (Clean). Abschließend werden die ursprünglichen Pufferkonzentrationen wiederhergestellt (Equilibrate).

2.2.6.1 Bestimmung der Analysetemperatur und des Acetonitrilgradienten

Zu Beginn jeder Analyse sollten die optimale Analysetemperatur und der optimale Acetonitrilgradient bestimmt werden, bei denen das Elutionsverhalten von Homo- und Heteroduplexen von der Säulenmatrix die größten Unterschiede aufweist. Diese Bedingungen werden mit Hilfe der Navigator Software 1.6.4 (Transgenomic) ermittelt, indem die Sequenz des zu analysierenden Fragments in das Programm geladen wird. Anhand des durch die Software wiedergegebenen Schmelzkurvenverlaufs wurden pro Genabschnitt 3 spezifische Temperaturen bestimmt, die ein Aufschmelzen aller Bereiche der Zielsequenz bewirken.

Fragment	Temperatur	Gradient	%A*	%B**
Exon 3-4	61.5°C	Start Gradient	39.6	60.4
		Stop Gradient	29.6	70.4
	62.0°C	Start Gradient	39.6	60.4
		Stop Gradient	29.6	70.4
	65.5°C	Start Gradient	45.6	54.4
		Stop Gradient	35.6	64.4
Exon 5-6	60.4°C	Start Gradient	39.7	60.3
		Stop Gradient	29.7	70.3
	63.9°C	Start Gradient	47.2	52.8
		Stop Gradient	37.2	62.8
	65.8°C	Start Gradient	49.7	50.3
		Stop Gradient	39.7	60.3
Exon 7	61.9°C	Start Gradient	46.7	53.3
		Stop Gradient	36.7	63.3
	63.2°C	Start Gradient	46.7	53.3
		Stop Gradient	36.7	63.3
	63.7°C	Start Gradient	46.7	53.3
		Stop Gradient	36.7	63.3
Exon 8-9	60.0°C	Start Gradient	43.6	56.4
		Stop Gradient	33.6	66.4
	61.7°C	Start Gradient	46.1	53.9
		Stop Gradient	36.1	63.9
	62.9°C	Start Gradient	47.1	52.9
		Stop Gradient	37.1	62.9

Tabelle 4: Überblick über die in DHPLC-Analyse pro Fragment eingesetzten Schmelztemperaturen und Acetonitrilgradienten. *Puffer A, **Puffer B

2.2.6.2 Bildung von Homo- oder Heteroduplices

Bei optimalen Analysebedingungen kann eine homozygote Mutation vom Wildtyp durch eine Verschiebung der Retentionszeit des Peaks unterschieden werden. Um definitiv alle Mutationen zu erfassen, wurde jede zu untersuchende Probe im Verhältnis 1:1 mit dem Wildtyp des entsprechenden Fragments gemischt (jeweils 10µl). Durch anschließende Denaturierung bei 95°C und 5 Minuten andauernder Renaturierung (hier erfolgte eine Abkühlung von -0,1°C pro Sekunde bis auf 4°C) wird die Ausbildung von Homo- und Heteroduplexstrukturen herbeigeführt, und homozygote Mutationen können mit der gleichen Sensitivität erfasst werden.

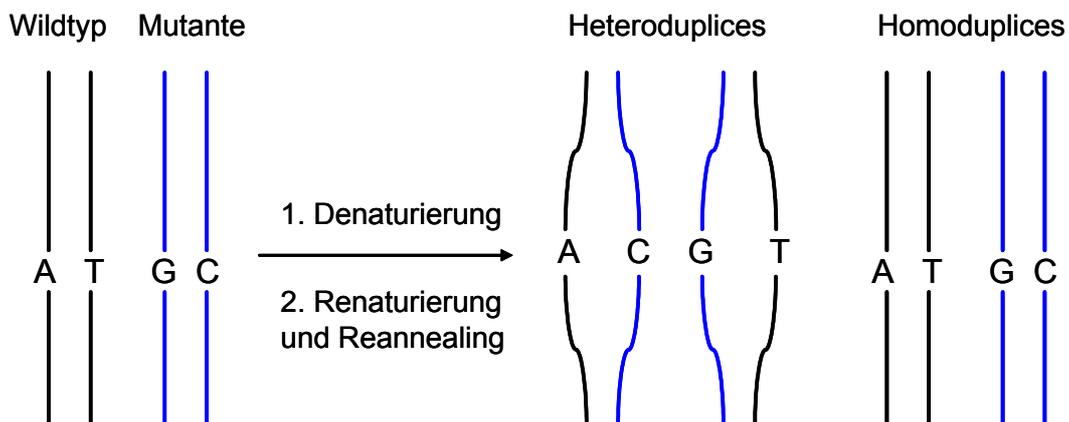


Abbildung 2: Ausbildung von Homo- bzw. Heteroduplices: Durch Denaturierung und anschließendes Reannealing kommt es zur Verschmelzung vom Wildtypfragment und Mutante. Auf diese Weise entstehen Homo- bzw. Heteroduplices.

2.2.7 Sequenzierung

2.2.7.1 Aufreinigung der PCR-Produkte

Proben, deren Elutionsprofil in der DHPLC-Analyse auf Mutationen oder Polymorphismen hinwies, wurden für die nachfolgende Sequenzierung aufgereinigt (ca. 30µl PCR-Produkt). Aufgrund der hohen Inzidenz bestimmter Polymorphismen (s. unten) in Intron 3 und Exon 4 wurde von allen Patienten die Zielsequenz Exon 3-4 für die weitere Untersuchung bearbeitet. Die Reinigung der PCR-Produkte von

überschüssigen Nukleotiden, Enzymen und Salzen ging mittels QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Hilden) vonstatten. Dabei binden Nukleinsäuren an eine Silica-Matrix, während die überzähligen Nebenprodukte infolge mehrerer Waschrunde durch Zentrifugation (verwendete Zentrifuge: Heraeus Biofuge pico) entfernt werden. Schließlich werden die aufgereinigten PCR-Produkte von der Silica-Membran mittels Wasser eluiert.

2.2.7.2 Sequenzreaktion

Die Sequenzierung, d.h. die Bestimmung der DNA-Sequenz, dient der Analyse der Basenabfolge eines DNA-Moleküls. Beim Sequenzierungsverfahren nach Sanger kommt eine spezielle Variante der PCR zum Einsatz, bei der pro Sequenzieransatz nur ein Primer eingesetzt wird. Auf diese Weise entstehen, im jeweiligen Ansatz nur Amplifikate mit der gewünschten Orientierung (5'-3'-Orientierung oder 3'-5'-Orientierung). Durch Verwendung von fluoreszenz-markierten Didesoxynukleotidtriphosphaten (ddNTPs), zusätzlich zu den normalerweise für die PCR verwendeten Nukleotidtriphosphaten, kommt es während der Elongationsphase der PCR zum basenspezifischen Kettenabbruch, was die Ausbildung aller möglichen Fragmentgrößen als Konsequenz hat (Sanger et al., 1992). Die dabei entstehenden Kettenabbruchprodukte werden mittels Kapillar-Gelelektrophorese vom Sequenziergerät anhand ihrer Größe aufgetrennt. Dabei passiert das kleinste Fragment den Detektor als erstes. Das Chromatogramm entsteht durch Anregung der in die DNA eingebauten, fluoreszenz-markierten Farbstoffmoleküle mittels eines Lasers, bei einer Anregungswellenlänge von 488nm. Dabei wird die Emission der Fluoreszenzmoleküle beim Durchwandern der Kapillare detektiert und die Basenabfolge anhand der unterschiedlichen Emissionsspektren der unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffe bestimmt.

Proben, die ein abnormes Verlaufsprofil in der DHPLC-Analyse erkennen ließen, wurden zur Bestätigung der Mutation oder des Polymorphismus einer Untersuchung durch Sequenzierung unterworfen. Darüber hinaus wurde der Genabschnitt Exon 3-4 von allen Patienten sequenziert. Die infrage kommenden Proben wurden infolgedessen in einer Sequenzierreaktion mit den fluoreszierenden Didesoxynukleotiden (BigDye Terminator

v1.1, AB Applied Biosystems, Darmstadt) markiert und mithilfe des 3130 Genetic Analyzers (AB Applied Biosystems/ Hitachi, Darmstadt) (Polymer: Pop 7) ausgewertet. Die genaue Analyse der Basenabfolge der 4 Zielbereiche erfolgte mittels der Software Mutation Surveyor Version 3.00. Sofern Veränderungen anwesend waren, wurden sie anhand der IARC Datenbank (<http://www.iarc.fr/TP53/>) genauer analysiert, um Mutationen von Polymorphismen zu unterscheiden.

<u>Temp.</u>	<u>Zeit</u>	<u>Anmerkung</u>
95°C	2min	} 25 Zyklen
95°C	10s	
50°C	10s	
60°C	3min	
4°C	∞	

Tabelle 5: Für die Sequenzreaktion eingesetztes Thermocycler-Protokoll

2.2.8 P53Amplichip

Der P53Amplichip stellt eine moderne Möglichkeit zur spezifischen Resequenzierung des TP53-Gens dar. Durch Analyse des kompletten codierenden Bereiches des TP53-Gens (Exons 2-11) und kurzer Abschnitte des intronischen Bereiches zur Erkennung von Splicemutationen (4 Nukleotide vor und nach jedem Exon), ist der GeneChip mittels Microarray-Technologie imstande, einzelne Basenaustausche und Deletionen einzelner Basen im TP53-Gen zu detektieren. Ferner deckt der P53Amplichip die 48 häufigsten Veränderungen ab (2% aller TP53-Mutationen, welche in der IARC Datenbank beschrieben sind), die weder einzelne Basenaustausche noch Deletionen einzelner Basen darstellen, sondern größere Deletionen und Insertionen (>1bp). Dabei werden ungefähr 1300 Basen auf deren korrekte Anordnung überprüft.

2.2.8.1 Chip Design

Die Gesamtfläche des P53Amplichips besteht aus 478 x 478 (228454) „Features“, oder auch „Probe Cells“ genannt. Die quadratischen Probe Cells haben eine Seitenlänge von 11 Mikrometern. Auf der Oberfläche einer Probe Cell befinden sich bis zu 10×10^6 Kopien eines spezifischen Oligonukleotids, dessen Länge zwischen 15, 17, 20, 23 und

25 Nukleotiden variiert. Ein „Probe Set“ besteht aus mindestens 5, höchstens 6 Probe Cells. Hierbei ist grundsätzlich die Wildtypsequenz einmal vertreten. Dazu kommen 3 Probe Cells für die möglichen Nukleotid-Austausche und ein Probe Cell, in welcher die betreffende Nukleotidposition deletiert ist (zum Beispiel: Wildtyp: A; mögliche Substitutionen: T, G, C; einfache Deletion). Manche Probe Sets enthalten zusätzlich auch ein Probe Cell mit einer Zweibasendeletion. Pro Nukleotidposition sind mindestens 24 Probe Sets vorhanden, die über die gesamte Chipfläche verteilt sind. Die einzelnen Probe Sets unterscheiden sich im Aufbau der zugehörigen Probe Cells: es variiert neben der Länge der Oligonukleotide auf den Probe Cells auch die Lokalisation der betreffenden Nukleotidposition selbst. Auf diese Weise werden unspezifische Signale reduziert.

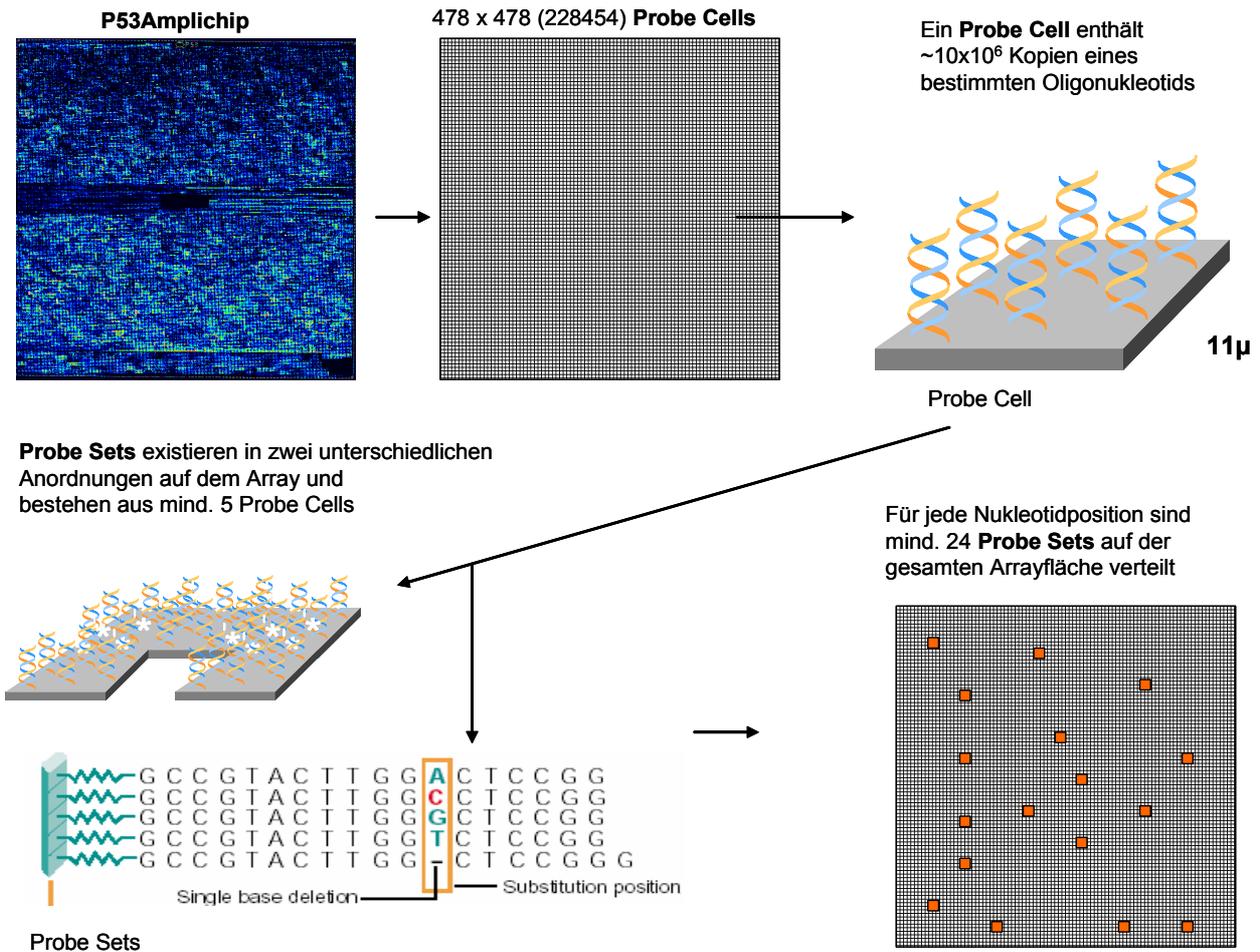


Abbildung 3: Aufbau des P53 Amplichips: Die kleinste Einheit wird durch das „Probe Cell“ repräsentiert, das jeweils einen kurzen TP53-spezifischen Sequenzabschnitt mit/ohne Nukleotidvariation darstellt. Ein „Probe Set“ setzt sich aus mehreren „Probe Cells“ zusammen, welche die Beurteilung einer Nukleotidposition hinsichtlich einer Mutation erlauben und auf der gesamten Oberfläche des Microarrays verteilt sind. Jede Nukleotidposition wird durch mehrere verschiedene „Probe Sets“ analysiert, weshalb der Chip in der Lage ist, bei möglichem Ausfall einzelner „Probe Sets“, beispielsweise durch Verunreinigungen oder Kratzer, ein valides Ergebnis anzuzeigen.

2.2.8.2 Amplifikation der Exons 2-11 des TP53-Gens mittels Multiplex-PCR

Zur Vervielfältigung der 10 codierenden Exons des TP53-Gens wurden pro PCR 50-100ng genomische DNA verwendet. Bei einem Gesamtvolumen von 50 μ l wurden pro Patient, respektive pro Patientenprobe, 2 PCR Ansätze vorbereitet (Primermix A: 6 PCR-Produkte; Primermix B: 7 PCR-Produkte), die bei gleichen PCR Bedingungen

amplifiziert wurden. Das Gleiche galt für die Referenzprobe, welche die TP53-Wildtypsequenz enthielt. Zur Kontrolle der PCR wurde zusätzlich die DNA-Sequenz des Beta Actin amplifiziert.

Primermix A	Fragment (bp)*
Exon 2	164
Exon 4-upstream	149
Exon 5	266
Exon 8	242
Exon 10	240
Beta Actin	117
Primermix B	Fragment (bp)*
Exon 3	84
Exon 4-downstream	245
Exon 6	204
Exon 7	168
Exon 9	146
Exon 11	225
Beta Actin	117

Tabelle 6: Übersicht über die pro Primermix (A, B) flankierten Exons. *Fragmentgröße des zu amplifizierenden Exons in Basenpaaren (bp)

Nukleotide, Puffer, Taq-Polymerase, Magnesiumchlorid sowie die angewendeten Primer und der Referenz-Standard waren Bestandteile des von Roche Molecular Systems zur Verfügung gestellten P53Amplichip-Kits (Roche Molecular Systems, Pleasanton, USA). Die PCR-Reaktionen wurden gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Das Gelingen der PCR wurde anhand 4% Agarose-Gele kontrolliert.

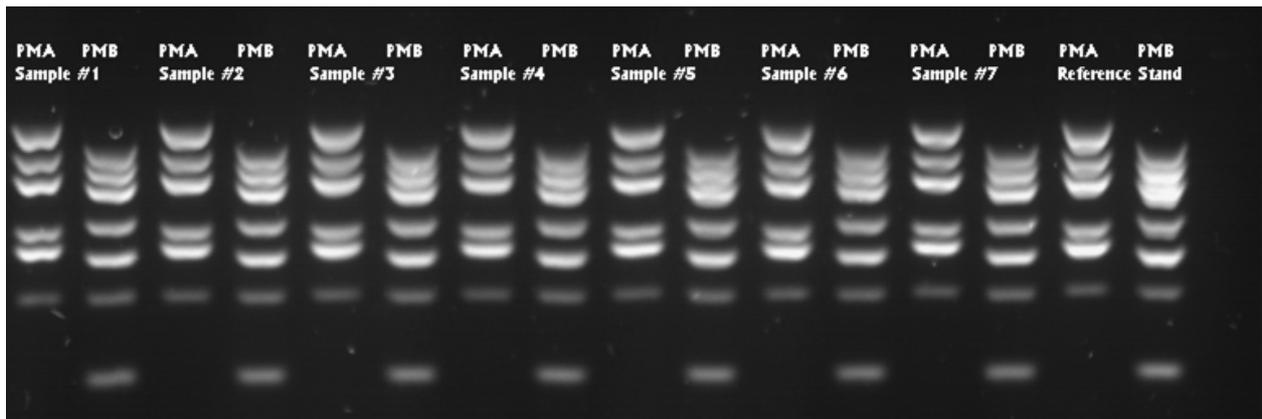


Abbildung 4: Kontrolle der PCR auf 4% Agarose-Gele: Pro Patientenprobe wurde je eine Gelkammer mit dem Multiplexansatz A (PMA) (Fragmente der Größe nach: Exon 5, Exon 8, Exon 10, Exon 2, Exon 4-upstream und Beta Actin) und B (PMB) (Fragmente der Größe nach: Exon 4-downstream, Exon 11, Exon 6, Exon 7, Exon 9, Beta Actin und Exon 3) beladen. Die beiden letzten Positionen entsprachen den PCR-Produkten der Referenz-DNA

2.2.8.3 Fragmentierung und Markierung der Proben-DNA

Nach erfolgreicher Vervielfältigung mithilfe der Multiplex-PCR konnten die PCR-Produkte im nächsten Schritt fragmentiert werden. Die Fragmentierung erfolgte mit einer Endonuklease (rDNase1) und dient der Zerkleinerung der amplifizierten Exons sowie der Freilegung von Hydroxylgruppen an den 3'-Bruchenden. Durch alkalische Phosphatase (AP) wird die Ausbildung erneuter Phosphosäurediesterbrücken zwischen den Fragmenten verhindert. Im nächsten Reaktionsschritt, der Markierung der Fragmente mit Biotin, werden an die freien 3'-OH-Gruppen durch das Enzym TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) biotinmarkierte Nukleotide synthetisiert, an welche später, während des Färbungsprozesses, der Streptavidin-Phycoerythrin-Komplex bindet.

Für die Fragmentierung mussten zunächst die beiden PCR-Ansätze (Multiplexansatz A und B), die pro Patient angesetzt wurden, vereinigt werden (jeweils 10µl). Zu den gepoolten PCR-Produkten (20µl) jedes Patienten wurden schließlich noch 10µl des Fragmentierungsansatzes (Fragmentation Working Mix: 10µl rDNase + 10µl alkalische Phosphatase + 400µl Fragmentierungspuffer, bis zuletzt auf Eis gelagert) hinzu gegeben (Gesamtvolumen 30µl) und anschließend bei folgendem Programm im Thermocycler fragmentiert: 20 Minuten Inkubation bei 25°C, anschließend 10 Minuten Inkubation bei 95°C.

Nach Ablauf des Fragmentierungsprogrammes wurden 15µl des Markierungsansatzes (Labeling Working Mix: 130µl Labeling Puffer+rTdT Enzym, bis zuletzt auf Eis gelagert) zu den bestehenden 30µl jedes Reaktionsgefäßes hinzu pipettiert (Gesamtvolumen 45µl). Folgendes Programm für den Thermocycler wurde ausgewählt: 35 Minuten Inkubation bei 37°C gefolgt von einer fünfminütigen Inkubation bei 95°C.

2.2.8.4 Hybridisierung der Proben-DNA auf den GeneChip und Scannen des Arrays

Nach Zugabe von 35µl des fragmentierten/markierten Ansatzes zu 500µl Hybridisierungspuffer, erfolgte die Hybridisierung der Proben-DNA auf die P53Amplichips mithilfe der Fluidics Station 450 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) nach dem P53-450-V4-Protokoll, gesteuert durch die GCOS Software Version 1.2. Zum Färben wurden 500µl Färbelösung verwendet, welche das Fluorochrom Phycoerythrin beinhaltet, dessen Emission vom Scanner bei einer Wellenlänge von 450nm detektiert wird.

Nach Beendigung der Hybridisierung und Färbung und erfolgtem automatisierten Waschvorgang auf der Fluidics Station 450 folgte das Scannen der Microarrays mit dem GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix). Die Analyse der Arraydaten wurde von der Abteilung für Biostatistik und Bioinformatik von Roche Molecular Systems übernommen (RMS, Pleasanton, USA).

2.3 Zytogenetische Befunde

Zytogenetische Untersuchungen von CLL-Proben bei der Diagnose und auch zur Prognoseabschätzung werden routinemäßig im Münchner Leukämie Labor durchgeführt.

2.3.1 Chromosomenanalyse an Metaphasen

Im peripheren heparinisierten Blut oder im Knochenmark wird zunächst mithilfe automatisierter Zellzählung (Sysmex) die Leukozytenzahl bestimmt. Zur Metaphasen-Induktion für die klassische Chromosomenanalyse bei CLL wurde das von Dicker et al. etablierte Protokoll angewendet (Dicker et al., 2006). Dazu werden 10^7 Zellen in 5 ml RPMI 1640 Medium (Gibco, Gaithersburg, MD) zusammen mit 20% fötalem Kalbsserum (FCS), sowie dem immunstimulatorisch wirkenden CpG-Oligonukleotid DSP30 ($2\mu\text{M}$) und Interleukin 2 (IL-2) (200 U/ml) in einem 15 ml Harre-Rundbodenröhrchen kultiviert. Nach einer 48h währenden Kultivierung erfolgt die Zugabe von Colcemid ($0.15\ \mu\text{g/ml}$) (Sigma, München) für weitere 24h. Die Aufarbeitung und Färbung der Chromosomen erfolgte nach einer standardisierten Methode, ebenso die Klassifikation der untersuchten Karyotypen nach ISCN (Schaffer LG et al., 2005; Schoch et al., 2002). Zur Bestätigung komplizierter Karyotypen, welche Translokationen oder komplexe Aberrationen vorweisen, erfolgte nachfolgend das so genannte „Chromosome Painting“ oder 24-Farben-FISH, bei welchem die einzelnen Chromosomen mit bestimmten Fluoreszenzfarben angefärbt werden.

2.3.2 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

Durch ein Panel an FISH-DNA-Sonden können bei der CLL die häufigsten chromosomalen Alterationen nachgewiesen werden. Für die FISH-Analyse werden Ausstriche von peripherem Blut oder Knochenmark verwendet. Nach Fixierung der Ausstriche werden die Interphasen-Zellkerne mit Sonden hybridisiert. Das CLL spezifische SONDENSET enthält Sonden zur Detektion der Trisomie 12 und IGH-Rearrangements sowie zur Darstellung von Deletionen auf den Chromosomen 6q21, 11q22.3 (ATM), 13q14 (D13S25 und D13S319) und 17p13 (TP53). Zur

differentialdiagnostischen Abklärung eines Mantelzell-Lymphoms wird bei allen Proben, mittels FISH, zusätzlich die Translokation $t(11;14)(q13;q32)$ untersucht, bei der es zum Rearrangement des CCND1 Gens (BCL-1, Zyklin D1) mit dem IGH-Lokus kommt. Karyotypen, welche in der Chromosomenanalyse eine Translokation $t(14;18)(q32;q21)$, das zytogenetische Korrelat des folliculären Lymphoms mit rearrangierten IGH und BCL-2, aufwiesen, wurden in der FISH-Analyse bestätigt und von der Studie ausgeschlossen, wenn immunphänotypisch keine CLL nachgewiesen werden konnte. Klone wurden als positiv für eine Aberration gewertet, wenn mindestens 5 von 100 Interphasen diese Aberration aufzeigten.

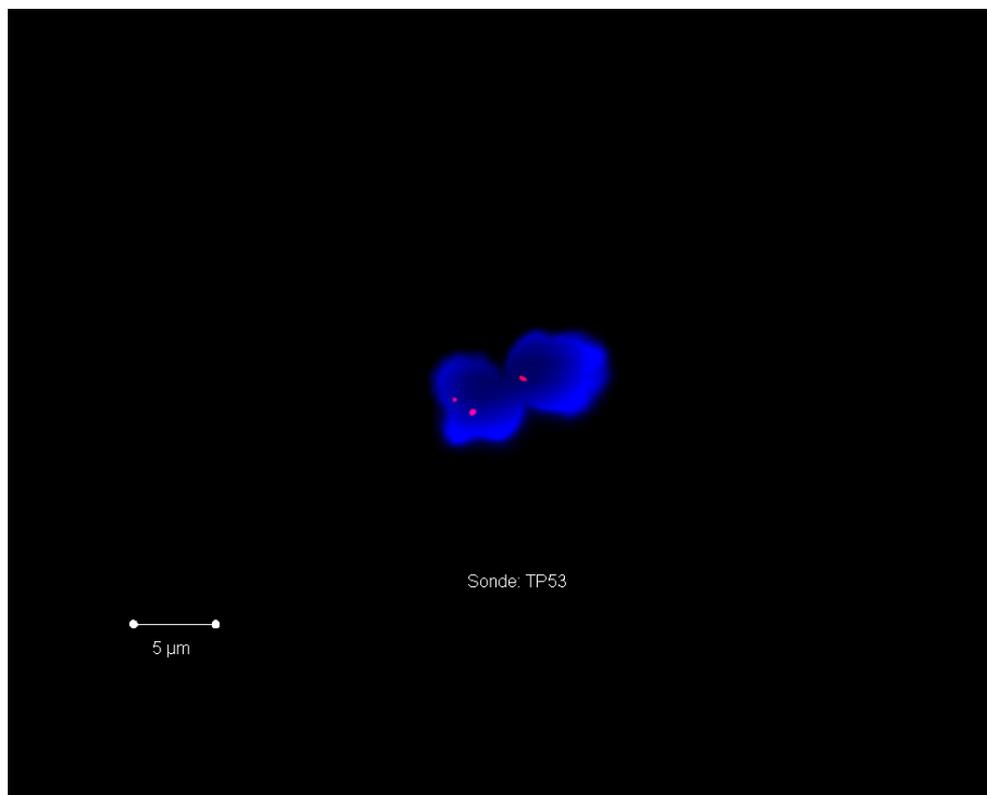


Abbildung 5: Heterozygote Deletion 17q13 (TP53-Deletion), detektiert durch FISH: Zu sehen sind zwei Interphasekerne. Statt 2 roten Signalen ist im Fall des TP53-Allelverlusts (rechte Interphase) nur ein rotes Signal zu erkennen. (Maßstab 5µm)

2.4 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurde die SPSS Version 14.0 (SPSS-Software, Chicago, Illinois, USA) für Microsoft Windows verwendet. Kreuztabellen wurden mit dem Chi-Quadrat-Test ausgewertet und die zweiseitige Irrtumswahrscheinlichkeit nach Fischer ermittelt. Dabei wurden nur p-Werte, die kleiner als 0,05 waren, als signifikant erachtet. Zur Analyse des klinischen Verlaufs hinsichtlich der Zeit bis zur Progression („Time to Progression“ (TTP)) wurden Kaplan-Meier-Schätzer angewendet. Um unabhängige Parameter zu bestimmen, welche die Zeit bis zur Progression beeinflussen, wurde die Multivariat-Analyse mithilfe der Cox-Regression herangezogen. Hierbei wurden ausschließlich Parameter verwendet, welche bereits in der Univariat-Analyse signifikant mit der abhängigen Variable TTP korrelierten.

3 Ergebnisse

Das untersuchte Kollektiv umfasste 193 CLL-Patienten, bei welchen die Diagnose einer CLL durch Immunphänotypisierung und Zytomorphologie (s. oben) gesichert wurde. Insgesamt wurden 67 weibliche Patienten (35%) und 126 männliche Patienten (65%) (Ratio: 1,88) auf eine TP53-Anomalie getestet. Das mediane Alter der untersuchten Patienten betrug zum Untersuchungszeitpunkt 66 Jahre, mit einer Spannweite von 37-86 Jahren. Das Binet Stadium zum Zeitpunkt der Erstdiagnose war bei 131 Patienten verfügbar. Von allen untersuchten Patienten befanden sich bei Diagnosestellung 98 Patienten im Binet Stadium A (75%), 28 Patienten im Binet Stadium B (21%) und 5 Patienten im Binet Stadium C (4%). Die Expression von CD38 wurde in 158 Fällen durch Immunphänotypisierung ermittelt. Als weiterer prognostischer Parameter wurde der IGVH-Status bei 181 Patienten bestimmt.

Patient	CD38-Expression*	IGVH-Status	FISH-Aberration	Binet-Stadium**
1	n. b.	Unmutiert	keine Aberration	A
2	0%	Nicht bestimmbar	del(13q) homo	n.b.
3	n. b.	unmutiert	keine Aberration	A
4	65%	unmutiert	del(11q), del(13q) homo	n.b.
5	0%	unmutiert	del(13q) homo	A
6	n. b.	mutiert	del(13q)	A
7	55%	unmutiert	del(11q)	A
8	48%	unmutiert	keine Aberration	A
9	n. b.	unmutiert	keine Aberration	n.b.
10	0%	mutiert	keine Aberration	B
11	90%	unmutiert	tris 12	n.b.
12	0%	mutiert	keine Aberration	A
13	41%	unmutiert	del(13q)	A
14	0%	mutiert	keine Aberration	A
15	0%	unmutiert	del(13q)	B
16	n. b.	mutiert	del(13q)	A
17	93%	unmutiert	tris 12	A
18	0%	unmutiert	del(11q), del(13q) homo	A
19	n. b.	unmutiert	tris 12, del(13q)	n.b.
20	0%	mutiert	keine Aberration	n.b.
21	22%	unmutiert	del(6q), del(13q)	A
22	35%	mutiert	del(13q)	B
23	n. b.	mutiert	del(6q), del(13q)	A
24	n. b.	mutiert	del(13q)	n.b.
25	0%	mutiert	del(6q), del(13q) homo	A

Patient	CD38-Expression*	IGVH-Status	FISH-Aberration	Binet-Stadium**
26	0%	unmutiert	del(13q)	A
27	16%	unmutiert	del(11q)	n.b.
28	57%	mutiert	keine Aberration	n.b.
29	n. b.	mutiert	keine Aberration	A
30	65%	unmutiert	tris 12	B
31	n. b.	mutiert	del(13q) homo	n.b.
32	0%	mutiert	del(13q)	n.b.
33	74%	unmutiert	del(11q)	B
34	0%	unmutiert	tris 12	A
35	0%	mutiert	del(13q)	A
36	7%	mutiert	del(13q) homo	C
37	0%	mutiert	del(13q)	A
38	n. b.	VH3-21 mutiert	keine Aberration	A
39	96%	unmutiert	keine Aberration	n.b.
40	n. b.	mutiert	del(6q), del(13q)	A
41	40%	VH3-21 mutiert	keine Aberration	n.b.
42	30%	mutiert	tris 12	n.b.
43	97%	unmutiert	del(17p), MCL+, del(13q)	n.b.
44	n. b.	mutiert	IGH+, del (6q)	n.b.
45	0%	VH3-21 mutiert	del(13q) homo	A
46	40%	mutiert	del(11q), del(13q), del(6q)	n.b.
47	0%	mutiert	keine Aberration	n.b.
48	0%	mutiert	del(13q) homo	n.b.
49	45%	unmutiert	del(17p), del(13q)	C
50	42%	mutiert	IGH+	n.b.
51	94%	n. b.	IGH-BCL2+, tris 12	A
52	0%	mutiert	del(13q)	B
53	0%	mutiert	keine Aberration	A
54	0%	unmutiert	del(6q)	A
55	11%	mutiert	keine Aberration	A
56	99%	unmutiert	del(11q), del(13q)	A
57	16%	n. b.	IGH-BCL2+, del(13q)	n.b.
58	99%	mutiert	del(11q)	A
59	n. b.	mutiert	del(6q), del(13q) homo	A
60	6%	mutiert	del(6q)	B
61	10%	unmutiert	del(13q) homo	n.b.
62	28%	unmutiert	del(13q)	n.b.
63	48%	unmutiert	del(11q), del(6q)	B
64	47%	mutiert	del(13q)	B
65	0%	mutiert	del(13q)	A
66	0%	unmutiert	del(13q)	A
67	21%	unmutiert	del(17p)	A
68	0%	mutiert	del(13q)	B
69	n. b.	Nicht bestimmbar	del(17p)	n.b.
70	0%	unmutiert	del(13q) homo	n.b.
71	20%	unmutiert	keine Aberration	B
72	n. b.	mutiert	del(17p), del(13q) homo, del(11q), - 12	n.b.
73	0%	mutiert	del(13q) homo	n.b.

Patient	CD38-Expression*	IGVH-Status	FISH-Aberration	Binet-Stadium**
74	66%	VH3-21 mutiert	del(13q)	n.b.
75	87%	unmutiert	keine Aberration	A
76	n. b.	mutiert	tris 12, del(13q) homo	n.b.
77	10%	unmutiert	del(6q)	A
78	n. b.	unmutiert	del(6q)	n.b.
79	0%	unmutiert	del(13q)	A
80	n. b.	mutiert	del(6q)	A
81	73%	mutiert	tris 12	n.b.
82	n. b.	unmutiert	del(17p), tris 12, del(13q)	C
83	97%	unmutiert	del(17p), tris 12, IGH+	n.b.
84	79%	unmutiert	del(11q)	A
85	88%	unmutiert	tris 12	n.b.
86	n. b.	unmutiert	del(17p)	n.b.
87	79%	unmutiert	del(11q)	A
88	61%	VH3-21 mutiert	del(11q), del(13q)	B
89	52%	unmutiert	del(17p)	B
90	40%	unmutiert	del(13q) homo	A
91	n. b.	unmutiert	del(11q), del(13q)	n.b.
92	43%	mutiert	del(13q)	A
93	8%	mutiert	del(13q) homo	n.b.
94	5%	mutiert	del(13q)	A
95	71%	unmutiert	keine Aberration	A
96	93%	unmutiert	del(11q)	A
97	0%	unmutiert	keine Aberration	n.b.
98	0%	mutiert	del(13q)	A
99	0%	mutiert	del(13q)	A
100	n. b.	unmutiert	del(6q)	n.b.
101	5%	unmutiert	del(6q)	A
102	0%	mutiert	del(13q)	A
103	0%	mutiert	del(13q) homo	A
104	0%	unmutiert	del(13q)	B
105	0%	mutiert	keine Aberration	A
106	76%	unmutiert	del(13q)	A
107	41%	unmutiert	tris 12	B
108	0%	mutiert	del(13q)	A
109	70%	Nicht bestimmbar	tris 12, del(13q)	A
110	0%	mutiert	del(13q)	A
111	0%	unmutiert	del(11q)	n.b.
112	54%	mutiert	del(13q)	A
113	0%	mutiert	del(13q)	A
114	74%	mutiert	keine Aberration	A
115	n. b.	mutiert	del(13q)	n.b.
116	0%	mutiert	del(13q) homo	n.b.
117	0%	mutiert	keine Aberration	A
118	79%	unmutiert	del(11q), del(13q)	A
119	0%	mutiert	del(13q)	A
120	76%	mutiert	tris 12	A
121	n. b.	unmutiert	keine Aberration	n.b.

Patient	CD38-Expression*	IGVH-Status	FISH-Aberration	Binet-Stadium**
122	87%	VH3-21 mutiert	del(13q)	B
123	0%	mutiert	keine Aberration	n.b.
124	0%	mutiert	del(13q)	A
125	0%	mutiert	keine Aberration	n.b.
126	19%	mutiert	tris 12, del(13q)	A
127	28%	unmutiert	del(17p), IGH+, tris 12	A
128	99%	unmutiert	del(11q), del(13q)	B
129	99%	mutiert	tris 12	n.b.
130	0%	mutiert	del(13q)	A
131	74%	unmutiert	del(17p), del(11q), tris 12	A
132	n. b.	mutiert	del(13q)	n.b.
133	99%	unmutiert	del(11q), del(13q) homo	B
134	89%	unmutiert	del(11q)	C
135	n. b.	mutiert	keine Aberration	n.b.
136	0%	mutiert	del(13q)	A
137	58%	mutiert	tris 12, del(13q)	A
138	34%	unmutiert	del(13q)	B
139	0%	mutiert	keine Aberration	A
140	11%	n. b.	del(17p), del(13q)	A
141	n. b.	mutiert	keine Aberration	A
142	54%	unmutiert	del(13q)	B
143	92%	n. b.	del(17p)	B
144	0%	mutiert	del(13q)	A
145	n. b.	mutiert	del(17p)	n.b.
146	5%	mutiert	del(13q)	A
147	25%	unmutiert	del(17p), tris 12, del(13q)	n.b.
148	n. b.	unmutiert	del(17p), del(13q)	B
149	0%	mutiert	del(13q) homo	A
150	n. b.	mutiert	keine Aberration	n.b.
151	0%	VH3-21 mutiert	del(13q)	n.b.
152	70%	VH3-21 mutiert	del(13q)	A
153	0%	mutiert	keine Aberration	n.b.
154	0%	n. b.	keine Aberration	A
155	0%	mutiert	del(17p)	A
156	18%	unmutiert	del(11q), del(13q)	A
157	n. b.	mutiert	del(13q)	n.b.
158	0%	n. b.	keine Aberration	A
159	38%	mutiert	del(13q) homo	A
160	39%	mutiert	del(13q)	A
161	80%	mutiert	tris 12, del(13q)	A
162	28%	VH3-21 mutiert	del(11q), del(13q), del(6q)	A
163	0%	VH3-21 mutiert	del(13q) homo	A
164	12%	mutiert	keine Aberration	A
165	0%	mutiert	del(13q) homo	A
166	0%	mutiert	del(13q)	B
167	52%	mutiert	keine Aberration	C
168	61%	mutiert	keine Aberration	B
169	0%	mutiert	del(13q)	A
170	49%	unmutiert	tris 12	B

Patient	CD38-Expression*	IGVH-Status	FISH-Aberration	Binet-Stadium**
171	0%	mutiert	keine Aberration	A
172	21%	n. b.	del(17p), del(11q), del(13q), IGH+	n.b.
173	49%	unmutiert	tris 12	n.b.
174	97%	unmutiert	del(13q) homo	n.b.
175	28%	unmutiert	del(6q)	n.b.
176	21%	n. b.	del(11q)	B
177	0%	unmutiert	del(13q)	A
178	0%	mutiert	del(13q)	A
179	n. b.	mutiert	del(13q)	n.b.
180	11%	unmutiert	del(11q)	B
181	0%	mutiert	del(13q) homo	n.b.
182	0%	mutiert	del(13q)	A
183	0%	mutiert	keine Aberration	A
184	26%	VH3-21 mutiert	del(13q)	A
185	92%	mutiert	tris 12	A
186	0%	mutiert	del(13q)	A
187	99%	unmutiert	del(13q)	B
188	0%	unmutiert	del(11q), del(13q)	A
189	n. b.	unmutiert	tris 12	n.b.
190	0%	mutiert	keine Aberration	A
191	0%	mutiert	del(13q) homo	A
192	49%	VH3-21 mutiert	del(13q)	n.b.
193	n. b.	Nicht bestimmbar	del(13q)	n.b.

Tabelle 7: Charakterisierung des untersuchten Patientenkollektivs. Darstellung der pro Patient ermittelten CD38-Expression, des IGVH-Status, der FISH-Aberration sowie des Binet Stadiums bei Erstdiagnose. del: Deletion, tris: Trisomie, IGH+: IGH-Rearrangement, n.b.: nicht bestimmt, *Immunphänotypisierung, **bei Erstdiagnose

3.1 Ergebnisse der DHPLC-Analyse und der direkten Sequenzierung

Anhand der DHPLC-Analyse der Aminosäuren-codierenden Exons 3-9 sowie der dabei erfassten intronischen Bereiche Intron 3 (Zielsequenz Exon 3-4), Intron 5 (Zielsequenz Exon 5-6) sowie Intron 8 (Zielsequenz Exon 8-9) des TP53-Gens, wurden alle Fälle mit aberrantem Verlaufsprofil selektiert und zur genaueren Untersuchung sequenziert. Darüber hinaus wurde der Bereich Exon 3-4 von allen 193 Patienten durch Sequenzierung genauer analysiert.

3.1.1 Polymorphismen

Bisher wurden in der Literatur besonders zwei Sequenzvariationen im TP53-Gen kontrovers sowohl bezüglich ihrer prognostischen Relevanz, als auch der möglichen Beteiligung an der Tumorgenese, diskutiert. Der Aminosäure-Polymorphismus R72P (215G>C) (refSNP ID: rs1042522) in Exon 4, der durch Austausch der Base Guanin durch Cytosin zum Austausch der Aminosäure Arginin durch Prolin führt und die Fähigkeit des TP53-Proteins zur Induktion der Apoptose in vitro verändern soll, sowie eine 16bp-Insertion (96+40_96+41ins16) in Intron 3 (Dumont et al., 2003).

Der Aminosäure-Polymorphismus R72P (215G>C) wurde in 82 von 193 Proben detektiert (42%). Des Weiteren wurde eine hohe Inzidenz der bereits charakterisierten 16bp-Insertion in Intron 3 bestätigt (50/193, 26%). In der vorliegenden Arbeit konnte kein Zusammenhang zwischen dem Aminosäure-Polymorphismus R72P, respektive der 16bp-Insertion mit TP53-Mutationen ($p=1,000$; $p=0,479$) oder komplex aberranten Karyotypen ($p=0,492$; $p=0,317$) gezeigt werden. Genauso verhielt es sich bei bereits etablierten prognostischen Parametern wie der 17p-Deletion ($p=1,000$; $p=0,165$), der 11q-Deletion ($p=1,000$; $p=0,631$), unbalancierten Translokationen ($p=0,689$; $p=0,827$), dem IGVH-Mutationsstatus ($p=0,091$; $p=0,163$) und der CD38-Expression ($p=0,190$; $p=1,000$).

Außerdem konnte in 20 Fällen (10%) ein Polymorphismus (97-29C>A) in Intron 3 nachgewiesen werden. Weniger häufig wurden Sequenzvariationen in Exon 5-6 (639A>G (n=13), 672G>A (n=1)) und Exon 7 (673-36G>C (n=5)) gefunden. In diesem Patientenkollektiv konnte im Amplikon Exon 8-9 kein Polymorphismus nachgewiesen werden.

Polymorphismus	Amplikon Exon 3-4 (n)	Amplikon Exon 5-6 (n)	Amplikon Exon 7 (n)	Beschreibung*
R72P	82			215G>C
16bp-Insertion in Intron 3	50			96+40_96+41ins16
Polym. in Intron 3	20			97-29C>A
R213R		13		639A>G
E224E		1		672G>A
Polym. in Intron 6			5	673-36G>C

Tabelle 8: Auflistung der am häufigsten gefundenen Polymorphismen im TP53-Gen sowie Lokalisation und Frequenz. *Die Beschreibung der Polymorphismen erfolgt auf RNA-Level (den Dunnen et al., 2000; den Dunnen et al., 2001)

3.1.2 Mutationen

In 19 von 193 Patientenproben (9.8%) wurden insgesamt 23 TP53-Mutationen mittels DHPLC-Analyse und nachfolgender Sequenzierung nachgewiesen.

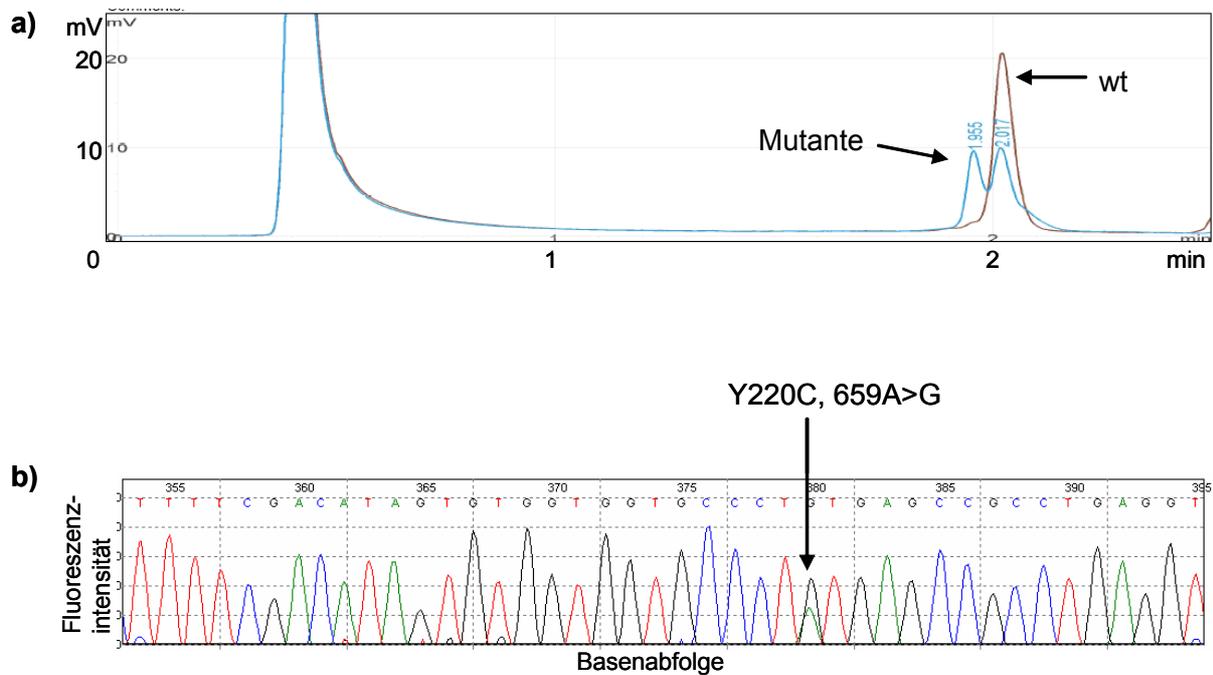


Abbildung 6: Detektion einer Mutation mittels DHPLC-Analyse/Sequenzierung: Die Abbildung veranschaulicht den Kurvenverlauf des Amplikons Exon 5-6 einer Patientenprobe (türkise Kurve) in der DHPLC-Analyse a). Durch Sequenzierung b) des entsprechenden Amplikons konnte eine Mutation in Exon 6 bestätigt werden. wt: Wildtyp

Von den 19 TP53-mutierten Patienten wiesen 4 eine zweite, zusätzliche TP53-Mutation auf. In 2 weiteren Fällen (Patienten Nr.82 und Nr.127) wurde mittels DHPLC-Analyse ein abnormes Verlaufsprofil des Amplikons Exon 8-9 detektiert, jedoch konnten anhand der Sequenzierung keine TP53-Mutationen bestätigt werden.

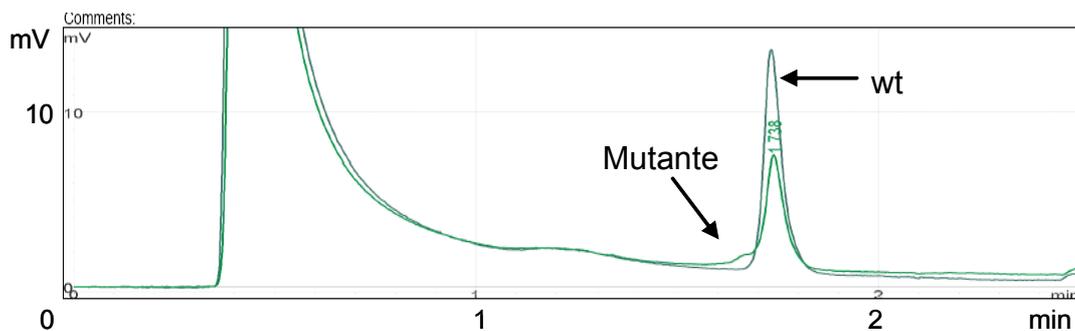


Abbildung 7: Aberrantes Verlaufsprofil in der DHPLC-Analyse: In der DHPLC-Analyse zeigt sich, verglichen mit der Wildtypkurve (graue Kurve), ein leichter Vorpeak im Kurvenverlauf des Amplikons Exon 8-9 der Patientenprobe (Patient Nr.82) (grüne Kurve). Bei der nachfolgenden Sequenzierung konnte jedoch keine Mutation identifiziert werden. wt: Wildtyp

Aufgrund der höheren Sensitivität der DHPLC-Analyse im Vergleich zur Sequenzierung, und der Tatsache, dass in Exon 8-9 ausschließlich Mutationen und keine Polymorphismen gefunden wurden, unterliefen beide Fälle mit auffälligem Kurvenverlauf des Amplikons Exon 8-9 (Patienten Nr.82 und Nr.127), einer erneuten DHPLC-Analyse. Durch den Einsatz des Fragmentkollektors, der an das DHPLC-Gerät gekoppelt ist, wurden die auffälligen Proben wiederholt analysiert. Die Fragmentkollektion ermöglicht das Auffangen der DNA in Lösung nach Elution von der Säule. Durch Bestimmung des genauen Zeitpunkts der Fragmentkollektion anhand des Kurvenverlaufs, lassen sich mutierte (aberranter Vorpeak) und unmutierte (Hauptpeak) Fragmente separieren und in verschiedenen Reaktionsgefäßen sammeln. Aliquots dieser separierten Fraktionen wurden einer erneuten PCR-Amplifikation unterworfen und die gewonnenen PCR-Produkte erneut sequenziert. Durch das Verfahren der Fragmentkollektion konnte eine weitere TP53-Mutation (Patient Nr.127) in Exon 8-9 bestätigt werden.

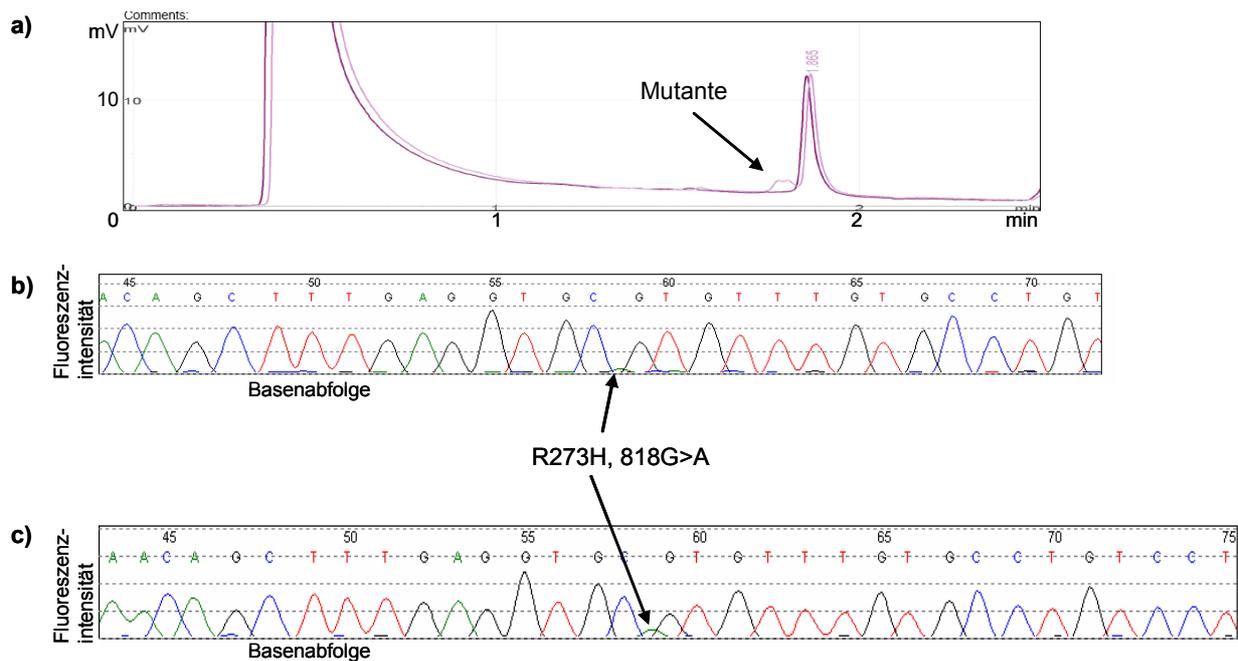


Abbildung 8: Bestätigung einer Mutation nach Fragmentkolektion und erneuter Sequenzierung: In der DHPLC-Analyse a) ist der charakteristische Vorpeak im Verlaufsprofil des Amplikons Exon 8-9 von Patient Nr.127 (rosa Kurve, Wildtypfragment: violett) eindeutig zu erkennen. Der Basenaustausch Guanin (G) zu Adenin (A) an Nukleotidposition 818 ist durch die nachfolgende Sequenzanalyse nur sehr schwer zu erkennen (mittlere Abbildung). Erst durch die Abtrennung des aberranten Vorpeaks mittels Fragmentkolektion und anschließender PCR-Amplifikation, lässt sich der Basenaustausch in einer erneuten Sequenzierung bestätigen (untere Abbildung).

Anhand des Vorscreenings mit DHPLC und darauf folgender direkter Sequenzierung konnten insgesamt 24 Mutationen bei 20 CLL-Patienten erkannt werden. Dadurch erhöhte sich die Inzidenz der TP53-mutierten Patienten auf 10.4% (20/193).

3.2 Ergebnisse der P53Amplichip-Analyse

Alle 193 Patientenproben wurden mithilfe des P53Amplichips resequenziert. Es wurden im Ganzen 30 TP53-Mutationen bei 25 CLL-Patienten detektiert. Davon waren 3 Patienten Träger von 2 und ein Patient Träger von 3 Mutationen. Eine 4bp Deletion in Exon 4 (D61KfsX60, 181_184delGATG), eine 1bp Insertion (Q165LfsX20, 493_494insT) und eine 1bp Deletion (E204SfsX42, 610delG) in Exon 5 wurden nicht detektiert. Die Untersuchung des Kollektivs mithilfe des P53Amplichips ergab eine Inzidenz der TP53-Mutation von 13% (25/193).

3.3 Gesamtinzidenz der TP53-Mutationen

Insgesamt wurden mithilfe beider Untersuchungsverfahren 33 TP53-Mutationen bei 26 Patienten ermittelt. Die Gesamtinzidenz betrug demnach 13,5% (26/193). Träger von 2 Mutationen waren 5 Patienten (Nr.9, Nr.97, Nr.143, Nr.127 und Nr.83). Ein Patient wies 3 Mutationen auf (Nr.145).

Patient	Mutation		Untersuchungsmethode			Exon	Del(17p)+ Interphasen	Komplexer Karyotyp
	Protein- Level	RNA-Level	DHPLC	Seq.	P53Amplichip			
9	P58QfsX64	173delC	positiv	Positiv	Positiv	4	0/100	Nein
	Q165LfsX20	493_494insT	positiv	Positiv	Negativ	5		
67	P75LfsX47	223delC	positiv	Positiv	Positiv	4	54/100	n.b.
155	D61KfsX60	181_184delGATG	positiv	Positiv	Negativ	4	67/100	Ja
86	S96LfsX26	287delC	positiv	Positiv	Positiv	4	92/100	n.b.
97	S183X	548C>G	positiv	Positiv	Positiv	5	0/100	Nein
	R209KfsX5	625_626delAG	positiv	Positiv	Positiv	6		
143	E204SfsX42	610delG	positiv	Positiv	Negativ	5	66/100	n.b.
	Y234C	701A>G	positiv	Negativ	Positiv	7		
172	P151S	451C>T	positiv	Positiv	Positiv	5	70/100	Ja
49	Y220C	659A>G	positiv	Positiv	Positiv	6	74/100	Ja
72	Y220C	659A>G	positiv	Positiv	Positiv	6	50/100	Ja
63	R213X	637C>T	positiv	Positiv	Positiv	6	0/100	Nein
22	Y234C	701A>G	positiv	Negativ	Positiv	7	0/100	Nein
117	Y236C	707A>G	positiv	Negativ	Positiv	7	0/100	Nein
165	R248Q	743G>A	positiv	Positiv	Positiv	7	0/100	Nein
145	R248Q	743G>A	positiv	Positiv	Positiv	7	30/100	Nein
	C275F	824G>T	positiv	Positiv	Positiv	8		
	Y327X	981T>G	Ex8-9 pos.	Negativ	Positiv	9		
159	N239I	716A>T	positiv	Negativ	Positiv	7	0/100	Nein
127	R273H	818G>A	positiv	positiv*	Positiv	8	30/100	n.b.
	R248Q	743G>A	positiv	Negativ	Positiv	7		
43	R273L	818G>T	positiv	Positiv	Positiv	8	83/100	Ja
62	R290C	868C>T	positiv	Positiv	Positiv	8	0/100	Nein
69	C275Y	824G>A	positiv	Positiv	Positiv	8	89/100	Ja
82	G262V	785G>T	positiv	negativ**	Positiv	8	4/100	Ja
83	A276P	826G>C	positiv	Positiv	Positiv	8	78/100	Ja
	R282P	845G>C	positiv	Positiv	Positiv	8		
131	R273C	817C>T	positiv	Positiv	Positiv	8	18/100	Ja
140	R280K	839G>A	positiv	Positiv	Positiv	8	45/100	Nein
176	E286K	856G>A	positiv	Negativ	Positiv	8	0/100	Nein
89	R337C	1009C>T	n.b.	n.b.	Positiv	10	94/100	Ja
147	Y236C	707A>G	positiv	Positiv	Positiv	7	95/100	Ja

Tabelle 9: Ermittelte Patienten mit TP53-Mutationen. Beschreibung der pro Patient detektierten Mutation auf Protein- und RNA-Level sowie Lokalisation (Exon), Untersuchungsmethode und Gegenüberstellung mit zytogenetischen Ergebnissen. *Die Beschreibung der Mutationen auf Protein- und RNA-Level folgt der Nomenklatur von den Dunnen et al. (den Dunnen et al., 2000; den Dunnen et al., 2001), *2. Sequenzierung nach Fragmentkolektion, **Mutation durch Chip-Analyse bestätigt, n.b.: nicht bestimmt

3.4 Vergleich beider Screeningverfahren

Alle 33 Mutationen (100%) konnten nur durch Kombination beider Verfahren ermittelt werden. Durch den Microarray wurden 91% (30 Mutationen bei 25 Patienten), per DHPLC-Analyse/Sequenzierung allerdings nur 73% aller Mutationen observiert (24 Mutationen bei 20 Patienten). Bezüglich aller gefundenen TP53-Mutationen wurden durch den P53Amplichip folglich 20% (n=6) mehr Mutationen als durch DHPLC-Analyse/Sequenzierung ermittelt.

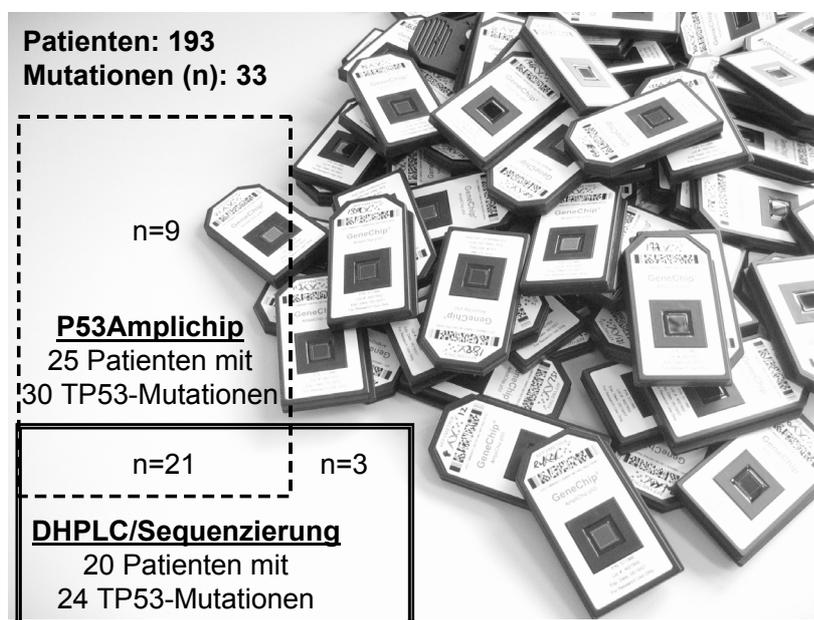


Abbildung 9: Gegenüberstellung der beiden Screeningverfahren bezüglich der Anzahl der gefundenen Mutationen. Im Hintergrund verwendete P53Amplichips.

Mit Ausnahme einer 4bp Deletion in Exon 4 (D61KfsX60, 181_184delGATG), einer 1bp Insertion (Q165LfsX20, 493_494insT) und einer 1bp Deletion (E204SfsX42, 610delG) in Exon 5, die bereits durch die DHPLC-Analyse mit nachfolgender Sequenzierung ermittelt wurden, konnten alle durch die DHPLC-Analyse detektierten Mutationen durch den P53Amplichip bestätigt werden, also 21 von 24 (s. oben).

Der Verdacht auf eine TP53-Mutation bei Patient Nr. 82, ausgelöst durch ein aberrantes Verlaufprofil und ohne Bestätigung der Mutation (siehe oben), selbst nach Fragmentkolektion, konnte ebenfalls durch die Chip-Analyse bestätigt werden.

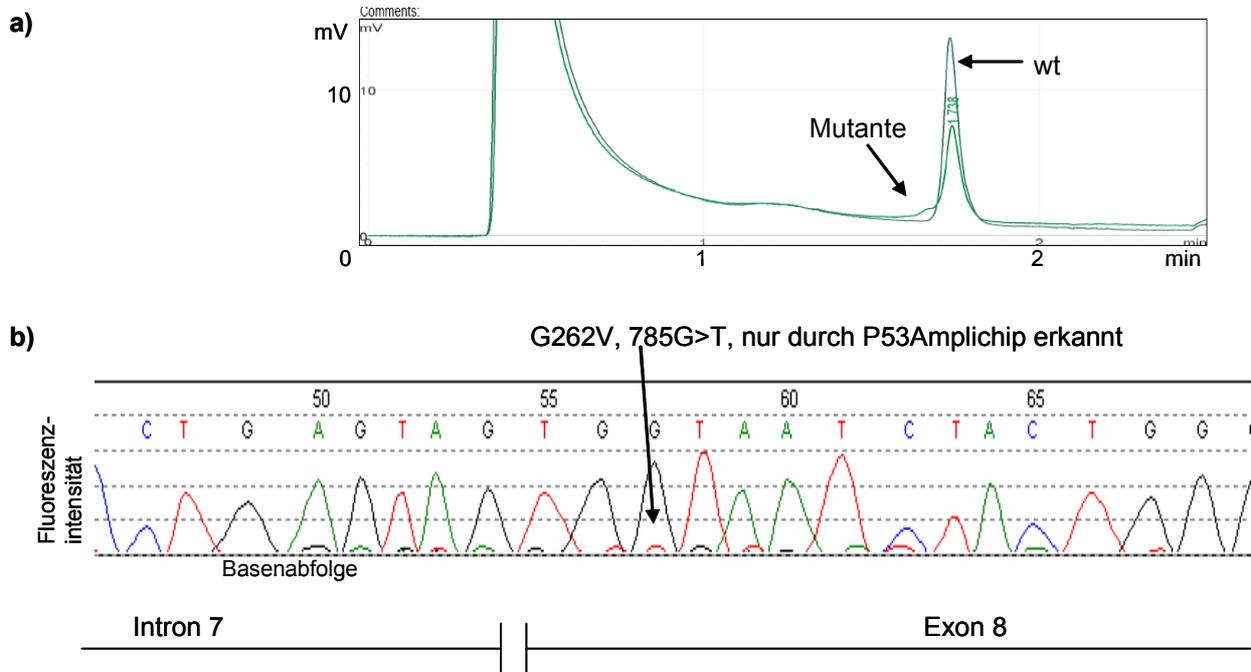


Abbildung 10: Bestätigung einer Mutation durch die Chip-Analyse: In der DHPLC-Analyse a) des Amplikons Exon 8-9 von Patient Nr.82, zeigt sich ein klarer Vorpeak im Kurvenverlauf, der jedoch durch die Sequenzanalyse b) nicht erkannt wurde. Durch Resequenzierung mithilfe des P53Amplichips wurde dennoch ein Basenaustausch an der Intron 7/Exon 8-Grenze (Nukleotidposition 785) detektiert. wt=Wildtyp

Bei 3 weiteren Patienten wurde zudem jeweils eine zusätzliche Mutation durch den Chip entdeckt (Patienten Nr.143, Nr.127 und Nr.145). Ferner erkannte der P53Amplichip 5 Patienten mit einer neuen Mutation, welche durch vorherige konventionelle Sequenzierung unberücksichtigt blieben (Patienten Nr.22, Nr.89, Nr.117, Nr.159 und Nr.176).

Zusätzlich zu den 21 bestätigten Mutationen wurden durch den Microarray demnach 9 zusätzliche TP53-Mutationen identifiziert. Eine davon befand sich in Exon 10, welches nicht durch DHPLC-Analyse und Sequenzuntersuchung getestet wurde. Von den übrigen 8 Mutationen befanden sich 5 in Exon 7, 2 in Exon 8 und eine in Exon 9. Retrospektiv zeigten 7/8 (87.5%) der mittels Microarray neu detektierten Mutationen einen aberranten Kurvenverlauf in der DHPLC-Analyse, der jedoch nicht durch die Sequenzierung bestätigt werden konnte. Dies deutet darauf hin, dass sich der P53Amplichip besonders zur Detektion von sehr kleinen TP53-mutierten Klonen eignet.

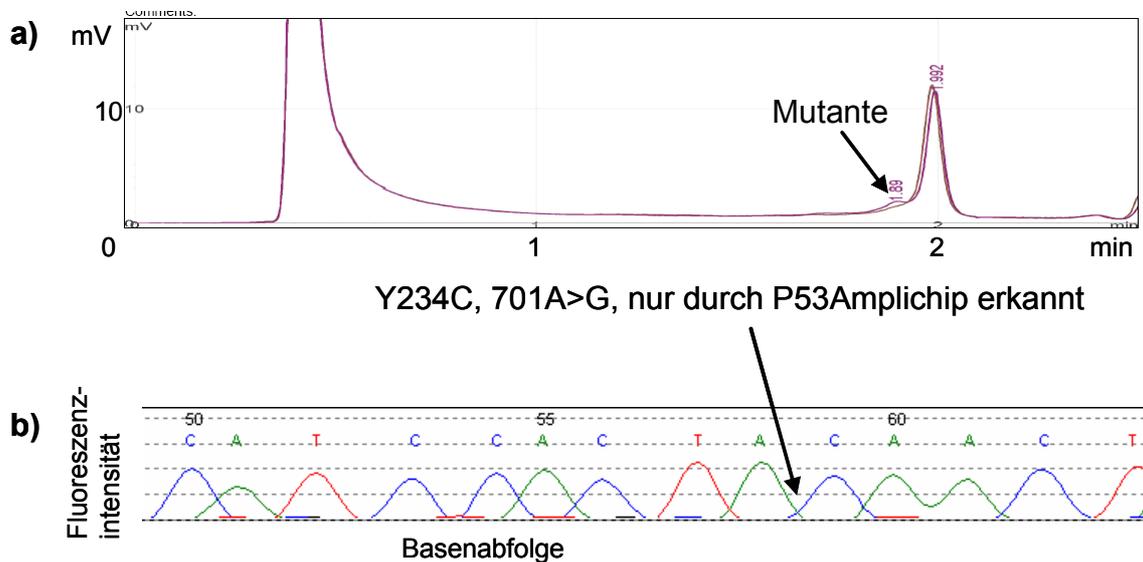


Abbildung 11: Dargestellt ist ein Beispiel für eine Patientenprobe mit einem aberranten Laufverhalten in der DHPLC-Analyse a) im Amplikon Exon 7, die durch die Sequenzanalyse b) nicht als Mutation bestätigt werden konnte. Die Position der Mutation, die erst durch den P53Amplichip identifiziert werden konnte, ist im Elektropherogramm durch einen Pfeil markiert. Diese Konstellation deutet auf eine sehr kleine Tumorphilpopulation mit mutiertem TP53-Gen hin.

Lokalisation	Mutation		Screeningverfahren		Effekt	Verteilung der Mutationen
	Protein-Level ^a	RNA-Level ^a	DHPLC/Seq.	P53Amplichip		
Exon 2	-	-	n.b.	negativ	-	-
Exon 3	-	-	negativ	negativ	-	-
Exon 4	P58Q fs X64	173delC	positiv	Positiv	frameshift	n=4 (12.1%)
	D61K fs X60	181_184delGATG	positiv	negativ	frameshift	
	P75L fs X47	223delC	positiv	Positiv	frameshift	
	S96L fs X26	287delC	positiv	Positiv	frameshift	
Exon 5	P151S	451C>T	positiv	Positiv	missense	n=4 (12.1%)
	Q165L fs X20	493_494insT	positiv	negativ	frameshift	
	S183X	548C>G	positiv	Positiv	nonsense	
	E204S fs X42	610delG	positiv	negativ	frameshift	
Exon 6	R209K fs X5	625_626delAG	positiv	Positiv	frameshift	n=4 (12.1%)
	R213X	637C>T	positiv	Positiv	nonsense	
	Y220C	659A>G	positiv	Positiv	missense	
	Y220C	659A>G	positiv	Positiv	missense	
Exon 7	Y234C	701A>G	negativ	Positiv	missense	n=8 (24.3%)
	Y234C	701A>G	negativ	Positiv	missense	
	Y236C	707A>G	negativ	Positiv	missense	
	Y236C	707A>G	positiv	Positiv	missense	
	N239I	716A>T	negativ	Positiv	missense	
	R248Q	743G>A	negativ	Positiv	missense	
	R248Q	743G>A	positiv	Positiv	missense	
	R248Q	743G>A	positiv	Positiv	missense	
Exon 8	G262V	785G>T	negativ	Positiv	missense	n=11(33.4%)
	R273C	817C>T	positiv	Positiv	missense	
	R273L	818G>T	positiv	Positiv	missense	
	R273H	818G>A	positiv	Positiv	missense	
	C275Y	824G>A	positiv	Positiv	missense	
	C275F	824G>T	positiv	Positiv	missense	
	A276P	826G>C	positiv	Positiv	missense	
	R280K	839G>A	positiv	Positiv	missense	
	R282P	845G>C	positiv	Positiv	missense	
	E286K	856G>A	negativ	Positiv	missense	
	R290C	868C>T	positiv	Positiv	missense	
Exon 9	Y327X	981T>G	negativ	Positiv	nonsense	n=1 (3%)
Exon 10	R337C	1009C>T	n.b.	Positiv	missense	n=1 (3%)
Exon 11	-	-	n.b.	negativ	-	-

Tabelle 10: Darstellung von Lokalisation, Effekt und Verteilung der auf Protein- und RNA-Level beschriebenen TP53-Mutationen. ^aDie Beschreibung der Mutationen auf Protein- und RNA-Level folgt der Nomenklatur von den Dunnen et al. (den Dunnen et al., 2000; den Dunnen et al., 2001), n.b.: nicht bestimmt

3.5 Molekulare Charakterisierung der TP53-Mutationen

Die meisten Mutationen wurden in den Exons 4-8 gefunden (31/33, 94%). Mehr als einmal waren folgende Aminosäuren betroffen: Y220 (n=2, Exon 6), Y234 (n=2, Exon 7), Y236 (n=2, Exon 7), R248 (n=3, Exon 7) und R273 (n=3, Exon 8) sowie C275 (n=2, Exon 8).

Auffällig war, dass alle Mutationen in Exon 4 (4/33, 12,1%) Deletionen darstellten, die zu einer Verschiebung des Leserasters (frameshift) führten. Von insgesamt 4 Mutationen in Exon 5 (4/33, 12,1%) führten ebenfalls 2 Mutationen zu einem frameshift. In Exon 6 verschob von 4 Mutationen (4/33, 12,1%) nur noch eine das Leseraster und der Anteil der Aminosäurenaustausche (missense-Mutationen) nahm zu. Exon 7 enthielt ausnahmslos Mutationen, verursacht durch einzelne Basenaustausche, welche zu missense-Mutationen (8/33, 24,3%) mit Aminosäurenaustausch führten. Am häufigsten wurden Mutationen in Exon 8 gefunden (11/33, 33,4%), die ausschließlich missense-Mutationen ausmachten. Zusätzlich wurde jeweils eine Mutation in Exon 9 (1/33, 3%) und Exon 10 (1/33, 3%) gefunden. Alles in allem lag der Anteil der frameshift-Mutationen bei 21% (7/33), der nonsense-Mutationen bei 9% (3/33) und der Anteil der missense-Mutationen bei 70% (23/33).

In der DNA-Bindungsdomäne des TP53-Gens (Aminosäuren 102-292) lagen 82% (27/33) aller detektierten Mutationen. Davon waren 82% (22/27) der Mutationen missense-Mutationen, 7% (2/27) nonsense-Mutationen und 11% (3/27) frameshift-Mutationen.

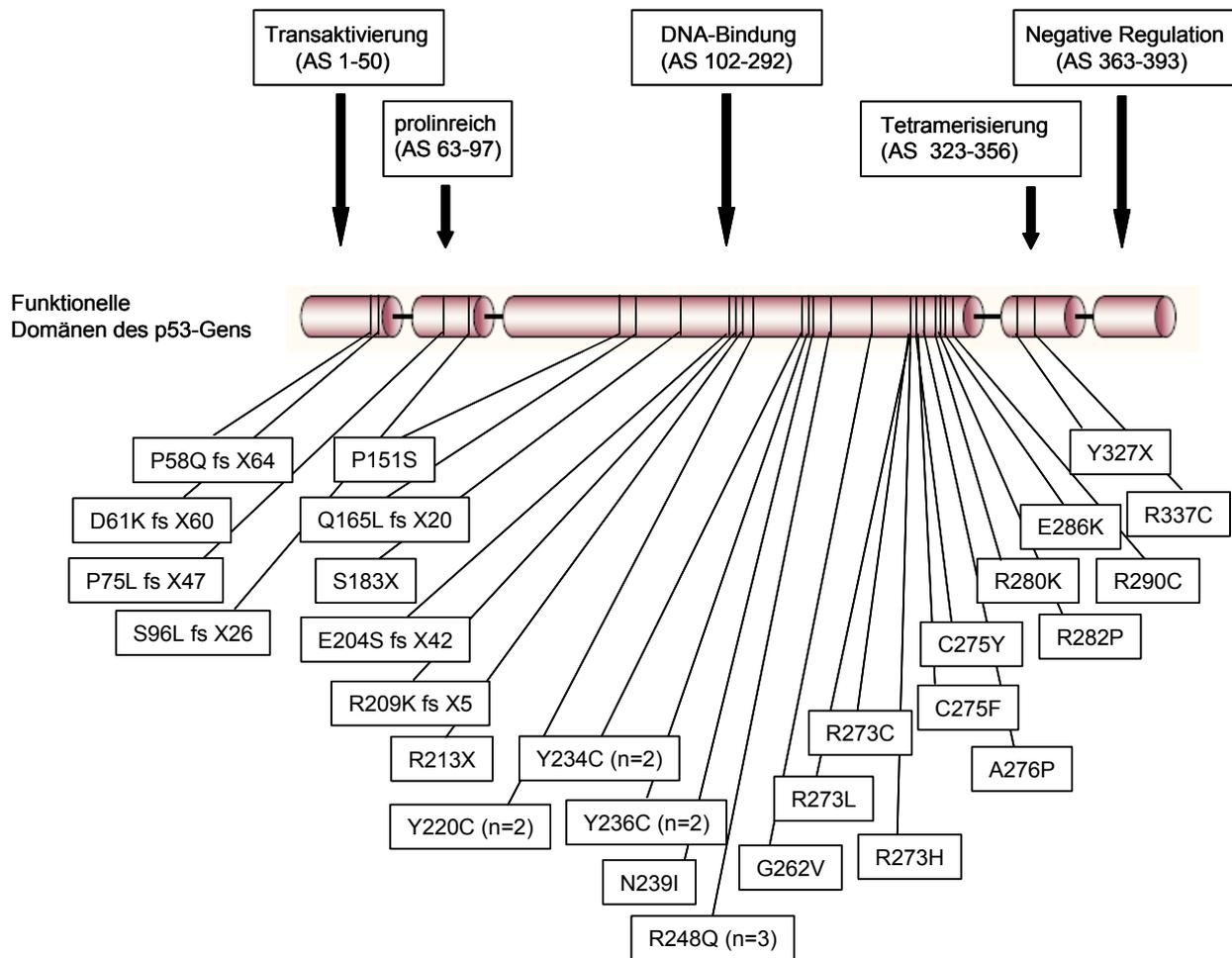


Abbildung 12: Verteilung der TP53-Mutationen auf die funktionellen Domänen des TP53-Gens: 82% der Mutationen liegen in der DNA-Bindungsdomäne. AS: Aminosäure

3.5.1 Vergleich beider Screeningmethoden bezüglich des Mutationsspektrums

Insgesamt wurden 26 missense- und nonsense-Mutationen gefunden. Im Vergleich zur Chip-Analyse, durch die 100% der beiden letztgenannten Mutationen aufgedeckt

wurden, stellten sich in der DHPLC-Analyse mit nachfolgender Sequenzierung nur 17 dieser Mutationen dar (17/26, 65%) (s. Tabelle 10). Damit zeigte sich, dass durch den P53Amplichip 35% mehr Aminosäureaustausche erkannt wurden als mittels DHPLC-Analyse und nachfolgender Sequenzierung.

Gegenteilig verhielt es sich bei den 7 frameshift-Mutationen: hier wurden durch den P53Amplichip nur 4 (57%), per DHPLC-Analyse und Sequenzierung hingegen 100% erkannt.

3.6 FISH und klassische Chromosomenanalyse

3.6.1 Ergebnisse der FISH-Untersuchung

Zur Bestimmung der Inzidenz von TP53-Aberrationen bei Patienten mit CLL wurde neben dem TP53-Mutationsscreening die FISH zur Detektion der 17p-Deletion angewendet. Die FISH-Analyse wurde dazu bei allen 193 Patienten durchgeführt. Mithilfe des allgemein üblichen CLL spezifischen FISH-Panels wurden in 154 der 193 Fälle (80%) Aberrationen detektiert. Der hierarchischen Gliederung von Döhner et al. folgend, wurden 18 Patienten mit 17p-Deletion (9,3%), 24 Patienten mit 11q-Deletion (12%), 20 Patienten mit Trisomie 12 (10%) und 13 Patienten mit 6q-Deletion (7%) identifiziert (Döhner et al., 2000). Eine 13q-Deletion als einzige Veränderung wurde bei 75 (39%) Patienten nachgewiesen. IGH-Rearrangements wurden bei 4 Patienten (3%) nachgewiesen und keine Aberration wurde bei 39 (20%) Patienten gefunden. Der prozentuale Anteil der Zellen mit 17p-Deletion lag zwischen 4% und 95% der ausgewerteten Interphasen.

3.6.2 Ergebnisse der Chromosomenanalyse

Da in dieser Arbeit unter anderem ein möglicher Zusammenhang zwischen TP53-Aberrationen (17p-Deletion/TP53-Mutation) und genetischer Instabilität in Form komplexer zytogenetischer Anomalien untersucht werden soll, wurden die Ergebnisse der klassischen Chromosomenanalyse bei 159 Patienten, mit in die Bewertung einbezogen. Pro Patient wurden mindestens 15 Metaphasen ausgewertet. Nach

internationalem ISCN Standard wurden strukturelle Aberrationen und Zugewinne von Chromosomen als klonale Aberration bezeichnet, wenn sie in mindestens 2 verschiedenen Metaphasen auftraten. Verluste von Chromosomen mussten in mindestens 3 unterschiedlichen Metaphasen nachgewiesen werden, um als klonal bezeichnet werden zu können (Schaffer LG et al., 2005).

Von den 159 untersuchten Patienten wiesen 139 (87%) chromosomale Veränderungen auf Metaphasenebene auf. Davon hatten 22 (14%) einen komplex aberranten Karyotyp.

Da das Auftreten von Translokationen bei CLL mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet sein soll, wurden die 159 Patienten ebenso auf balancierte wie unbalancierte Translokationen untersucht (Mayr et al., 2006; Van Den et al., 2007). Insgesamt fanden wir in 48 Fällen (30%) Translokationen. Innerhalb dieser Gruppe wurden bei 31 Patienten unbalancierte Translokationen festgestellt, von denen wiederum 20 Patienten ausschließlich unbalancierte, 11 Fälle jedoch unbalancierte sowie balancierte Translokationen parallel aufwiesen. In 17 Fällen waren ausschließlich balancierte Translokationen präsent.

Bei genauerer Betrachtung der komplex aberranten Karyotypen konnte in 20 von 22 Fällen (91%) eine Translokation festgestellt werden. Die Hälfte (11/22) der Patienten mit komplexen zytogenetischen Veränderungen wiesen überdies ausschließlich unbalancierte Translokationen auf. Ganz anders verhielt es sich mit balancierten Translokationen: nur 2 Patienten mit komplex aberrantem Karyotyp (2/22, 9%) zeigten ausschließlich balancierte Translokationen.

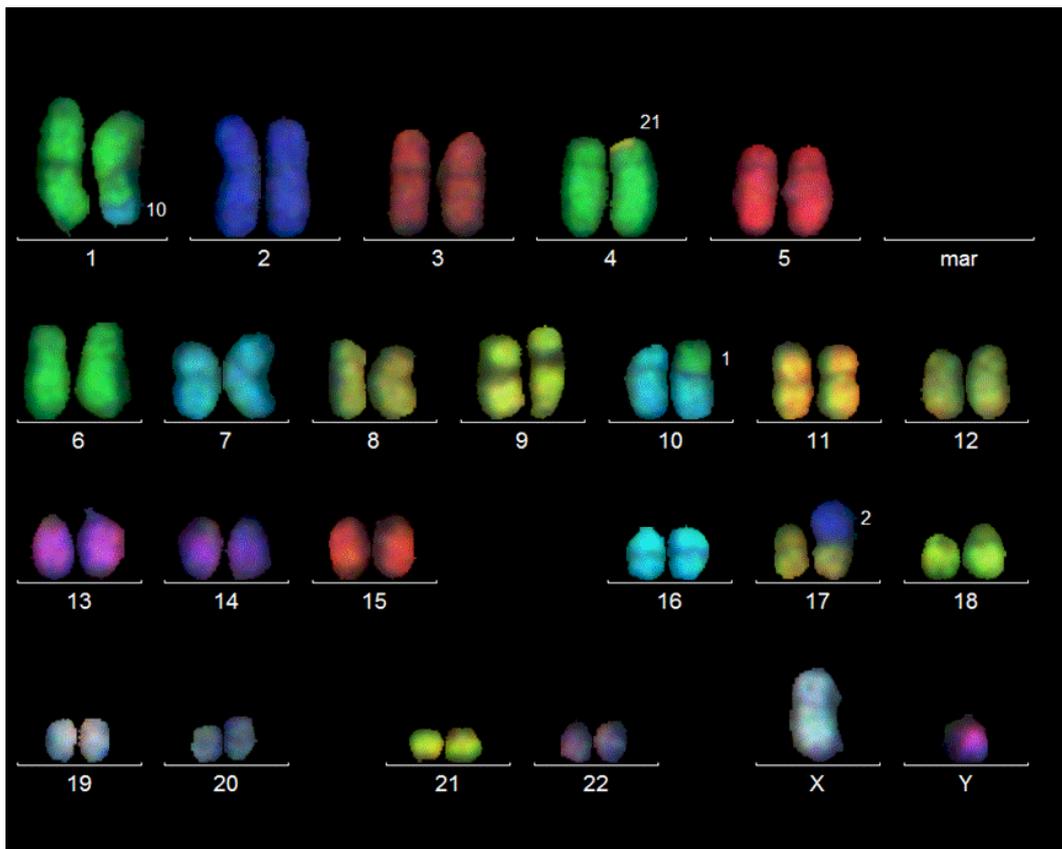


Abbildung 13: Komplex aberranter Karyotyp: Die Abbildung zeigt einen komplex aberranten Karyotyp bei CLL, detektiert mittels 24-Farben-FISH auf Metaphasen. Durch die Kombination verschiedener Fluoreszenzfarben entwickeln die markierten Chromosomenpaarchen charakteristische Emissionsspektren. Dadurch entsteht eine spezifische Färbung jedes der 24 Chromosomen. Diese Methode eignet sich besonders zum Nachweis von Translokationen. In der Abbildung sind zu erkennen die aberranten Chromosomen 1, 4, 10 und 17.

3.6.2.1 17p-Deletion bei Patienten mit komplex aberrantem Karyotyp und/oder Translokationen

Patienten mit Translokationen/komplex aberrantem Karyotyp neigen zu einem ungünstigen Krankheitsverlauf (Dicker et al., 2006; Juliusson et al., 1985; Mayr et al., 2006). Aus diesem Grund wurden die Häufigkeit der 17p-Deletion und der klinische Verlauf in beiden zytogenetischen Gruppen genauer untersucht.

Bei 50% der Patienten mit komplex aberrantem Karyotyp wurde eine 17p-Deletion nachgewiesen (11/22). Beide zytogenetischen Gruppen standen in einem sehr engen Zusammenhang zueinander ($p < 0,0001$).

Die übrigen 11 Patienten mit komplex aberrantem Karyotyp wiesen keine 17p-Deletion auf. Hier wurde eine 11q-Deletion in drei, eine 13q-Deletion in fünf und eine Trisomie 12 in weiteren drei Fällen beobachtet.

Sehr stark korrelierten Fälle mit einer 17p-Deletion und Translokationen. Ein TP53-Verlust wurde in 25% dieser Fälle detektiert (12/48, $p < 0,0001$). Bei Patienten mit unbalancierten Translokationen trat eine 17p-Deletion in 35% der Fälle auf (11/31, $p < 0,0001$). Dort wo ausschließlich unbalancierte Translokationen entdeckt wurden, betrug die Inzidenz der 17p-Deletion 35% (7/20, $p < 0,0001$). In der Gruppe, zu der ausschließlich Fälle mit balancierten Translokationen gezählt wurden, fand sich nur in 6% eine 17p-Deletion (1/17), eine Korrelation bestand nicht ($p = 1,000$).

3.6.2.2 Chromosomale Veränderungen bei Patienten mit 11q-Deletion

In der chromosomalen Bande 11q22 befindet sich unter anderen das Tumorsuppressorgen Ataxia-Teleangiectasia-Mutated (ATM). Da eine 11q-Deletion mit einem Verlust von ATM einhergeht und ebenfalls mit einem ungünstigen klinischen Verlauf bei CLL vergesellschaftet ist, wurden in dieser Analyse sowohl die Inzidenz von komplex aberranten Karyotypen als auch die Inzidenz von Translokationen bei Patienten mit Deletion 11q untersucht.

Ein komplex aberranter Karyotyp trat in 3 Fällen (12,5%) zusammen mit einer 11q-Deletion auf. Fünf von 24 Patienten mit 11q-Deletion (21%) wiesen Translokationen auf. Bei nur 3 Patienten (11%) waren unbalancierte Translokationen nachweisbar, 2 Patienten (8%) hatten ausschließlich unbalancierte Translokationen. Die Inzidenz balancierter Translokationen in der Gruppe mit 11q-Deletion betrug hingegen 17% (4/24).

3.7 Verteilung der TP53-Mutationen auf zytogenetische Subgruppen

3.7.1 TP53-Mutationen bei Patienten ohne 17p-Deletion im FISH

In der Patientengruppe mit keiner durch das FISH-Panel erkennbaren Aberration, wurden in 7,7% TP53-Mutationen gefunden (3/39). Bei Patienten mit Deletion 13q als einziger Aberration traten TP53-Mutationen in 5,4% der Fälle auf (4/75). Patienten mit 11q-Deletion wiesen eine Mutation in 8,3% der Fälle auf (2/24). Keine Mutationen wurden bei Patienten mit Trisomie 12, 6q-Deletion sowie in der Gruppe mit IGH-Rearrangements gefunden.

3.7.2 TP53-Mutationen bei Patienten mit 17p-Deletion im FISH

Von den 18 Patienten mit monoallelischer Deletion 17p im FISH konnte bei 17 (95%) außerdem eine TP53-Mutation, das verbliebene Allel betreffend, festgestellt werden ($p < 0,0001$). Im Falle des Patienten mit TP53-Deletion, der keine Mutation aufwies, waren im FISH nur 10 von 100 Interphasen positiv für den Verlust von TP53 gewesen, so das hier nur ein kleiner Klon betroffen zu sein scheint. Insgesamt wurde also bei 27 Patienten eine TP53-Aberration (TP53-Mutation und/oder 17p-Deletion) festgestellt (14%).

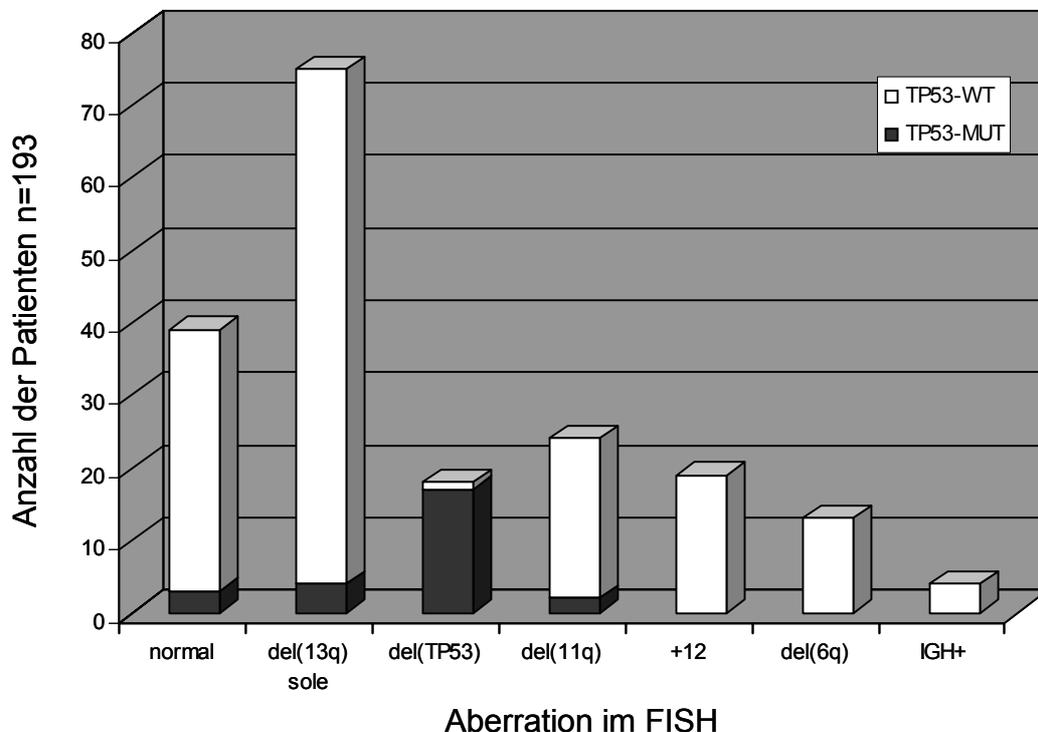


Abbildung 14: Die Inzidenz der TP53-Mutation in den einzelnen durch FISH definierten zytogenetischen Subgruppen: In der Gruppe ohne erkennbare Aberration in der FISH-Analyse wurden 3, bei Patienten mit Deletion 13q als einziger Aberration 4 und bei Patienten mit Deletion 11q wurden 2 Fälle mit TP53-Mutationen gefunden. In der Gruppe mit 17p-Deletion trat die TP53-Mutation in 17 Fällen auf. wt: Wildtyp, mut: Mutation

3.7.3 TP53-Mutationen bei Patienten mit komplex aberrantem Karyotyp

Da komplexe zytogenetische Veränderung als Zeichen genomischer Instabilität interpretiert werden können, analysierten wir bei diesen Patienten den TP53-Mutationsstatus.

Patienten mit komplex aberrantem Karyotyp zeigten in 50% der Fälle (11/22) TP53-Mutationen. Die Präsenz einer Mutation stand in sehr engem Zusammenhang mit dem Vorhandensein komplexer chromosomaler Aberrationen ($p < 0,0001$). Alle komplexen Fälle mit Mutation wiesen gleichzeitig eine 17p-Deletion auf.

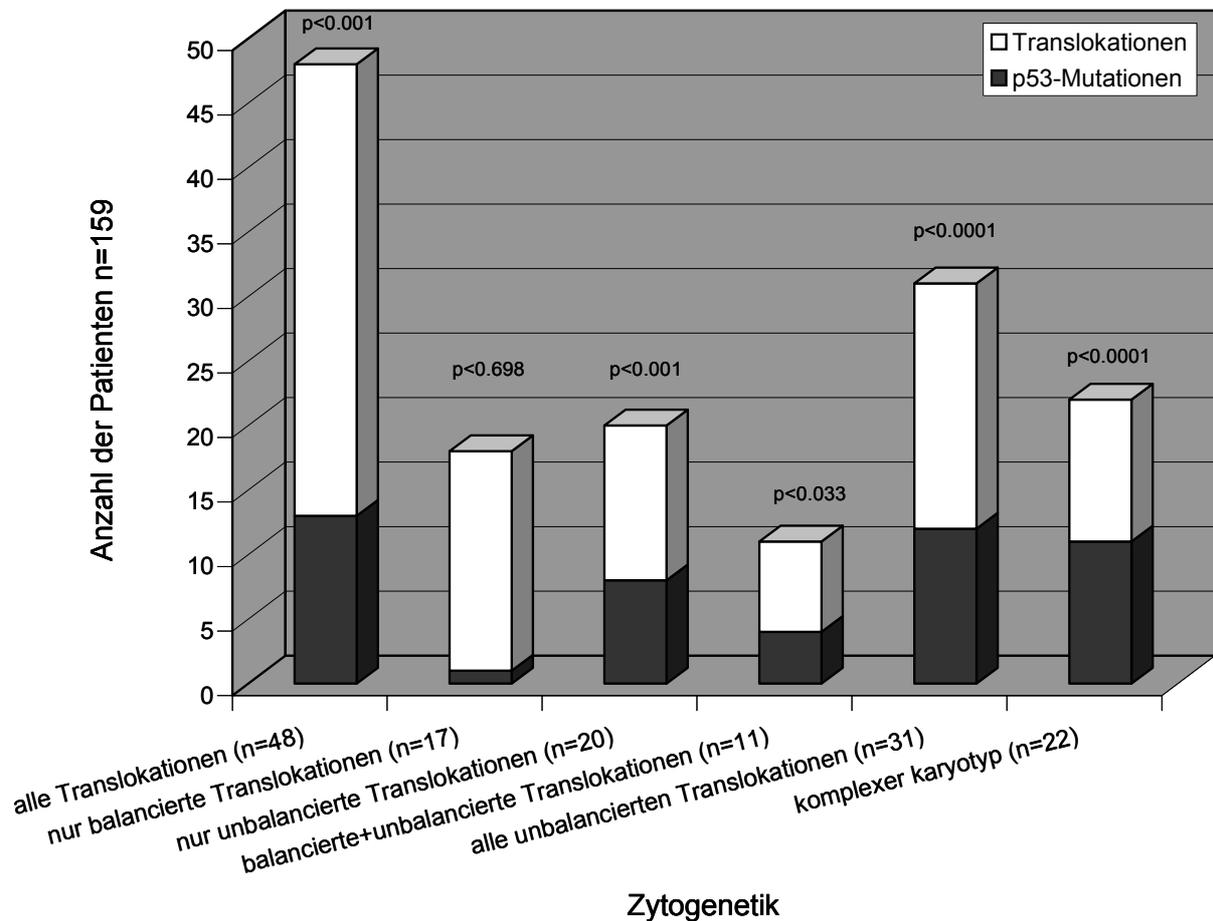


Abbildung 15: Die Häufigkeit der TP53-Mutation in den zytogenetischen Subgruppen: Bei Patienten mit komplex aberrantem Karyotyp traten in 50% der Fälle TP53-Mutationen auf.

3.7.4 TP53-Mutationen bei Patienten mit Translokationen

Aufgrund des engen Zusammenhangs zwischen komplex aberranten Karyotypen und Translokationen (siehe oben), wurde auch bei diesen Patienten die Häufigkeit der TP53-Mutation bestimmt. Bei 13 von 48 Patienten mit Translokationen (27%) wurden TP53-Mutationen observiert. Patienten mit unbalancierten Translokationen und TP53-Mutationen standen in enger Beziehung miteinander ($p < 0,0001$). Die Inzidenz der Mutation betrug hier 39% (12/31). Patienten mit ausschließlich unbalancierten Translokationen zeigten in 40% der Fälle (8/20) eine TP53-Mutation ($p < 0,0001$). Karyotypen, die ausschließlich balancierte Translokationen aufwiesen, zeigten in 6% der Fälle (1/17) TP53-Mutationen ($p = 0,698$).

Translokationen	(n)	TP53-Mutationen	(%)
nur balancierte	17	1	6%
nur unbalancierte	20	8	40%
balancierte+unbalancierte	11	4	36%
insgesamt	48	13	27%
Alle unbalancierten	31	12	39%

Tabelle 11: Die Inzidenz der TP53-Mutation in der Gruppe der Patienten mit Translokationen.

3.8 Klinische Verläufe

Eine Deletion in der Bande 17p13 führt häufig zu einer schnellen Progression der CLL. Dies wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt. In der vorliegenden Arbeit soll darüber hinaus der Effekt einer isolierten TP53-Mutation sowie der Effekt komplexer chromosomaler Veränderungen auf den klinischen Verlauf der CLL untersucht werden.

Die klinischen Verläufe konnten bei 132 Patienten analysiert werden. Es wurde der Zeitraum vom Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zum Zeitpunkt einer Progression (TTP) der Erkrankung untersucht. Als Progression der CLL wurde zunächst ein Anstieg der Lymphozytenzahl sowie ein paralleler Abfall der Erythrozyten und der Thrombozytenzahl gewertet. Dabei musste nicht zwangsläufig das nächst höhere klinische Stadium erreicht werden. Sobald Patienten therapiebedürftig wurden, zählte dies ebenfalls als Progression der Erkrankung. Die Zeitspanne vom Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zum Zeitpunkt der Progression wurde so bei 50 Frauen und 82 Männern ermittelt. Das mediane Lebensalter dieser Patientengruppe betrug zum Diagnosezeitpunkt 63 Jahre.

3.8.1 Kontrolle der erhobenen klinischen Daten

Zur Kontrolle der erhobenen Daten, wurden zuerst 123 Patienten, bei welchen der IGVH-Status durch Sequenzierung bestimmt wurde, bezüglich der Progression der Erkrankung untersucht. Unmutierte VH-Gene beobachteten wir bei 54, mutierte VH-Gene bei 69 Patienten. Analog zu den Daten anderer Arbeitsgruppen, zeigte auch die hier untersuchte Kohorte einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem VH-Mutationsstatus und dem klinischen Verlauf der CLL. Während Patienten mit mutierten VH-Genen im Median erst nach 3098 Tagen (ca. 8,5 Jahre) eine Progression erlitten, betrug die mediane Zeit bis zur Progression bei Patienten mit unmutierten VH-Genen nur 822 Tage (ca. 2,3 Jahre) ($p < 0,0001$).

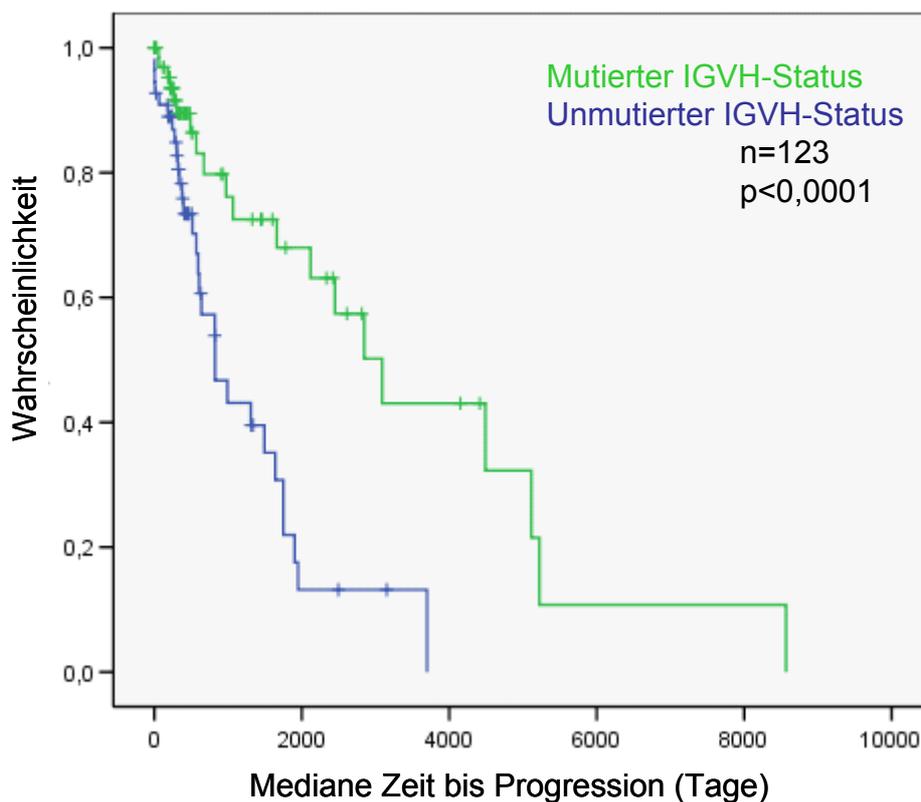


Abbildung 16: Progression der CLL bei Patienten mit ermitteltem IGVH-Status: Die mediane Zeit bis zur Progression (TTP) betrug bei Patienten mit mutierten IGVH-Genen (grüne Kurve) 3089 Tage und bei Patienten mit unmutierten IGVH-Genen (blaue Kurve) 822 Tage.

3.8.2 „Time to Progression“ bei Patienten mit 17p-Deletion und 11q-Deletion

Als nächstes wurde der Effekt einer 17p-Deletion auf den klinischen Verlauf untersucht. Außerdem wurden, ebenfalls zur Kontrolle der klinischen Daten, Patienten mit 11q-Deletion, bezüglich der Krankheitsprogression untersucht. In der folgenden Analyse wurden beide Hochrisikogruppen mit Patienten verglichen, welche keine der genannten Aberrationen aufwiesen. Von den 132 Patienten mit klinischen Daten wiesen 13 eine 17p-Deletion und 21 eine 11q-Deletion auf. Patienten ohne 17p-Deletion und ohne 11q-Deletion zeigten nach einer medianen Zeit von 2118 Tagen (ca. 5,8 Jahre), Patienten mit 17p-Deletion bereits nach 275 Tagen (ca. 0,75 Jahre) und solche mit 11q-Deletion nach 991 Tagen (ca. 2,7 Jahre) einen Progress der Krankheit ($p < 0,0001$).

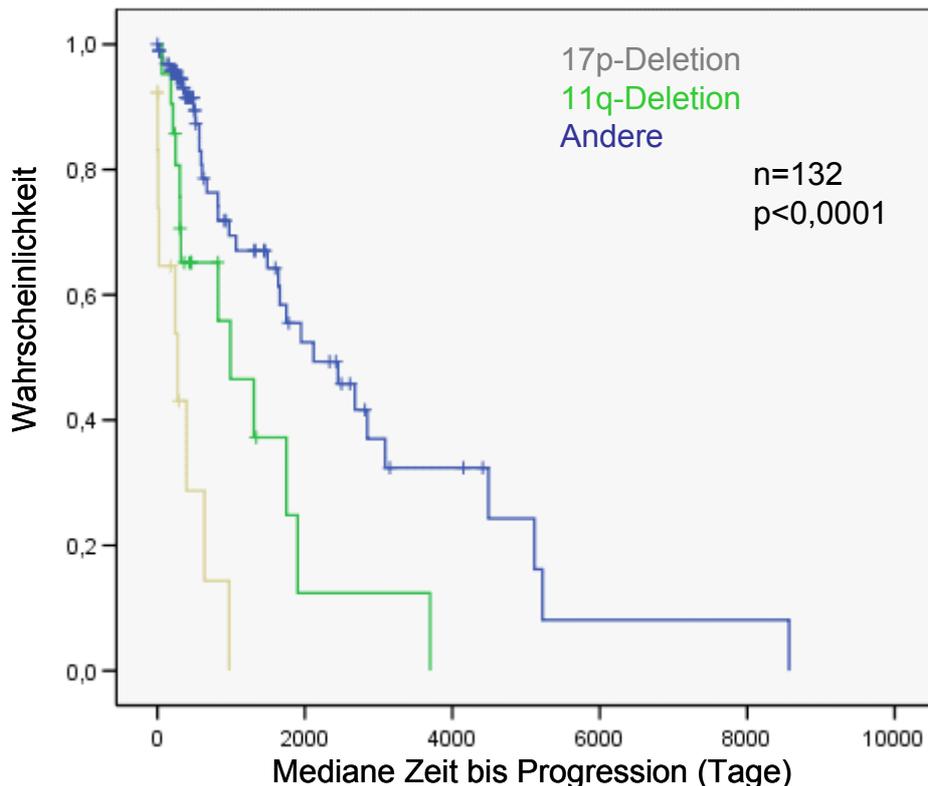


Abbildung 17: Progression der CLL bei Patienten mit 17p-Deletion: Die mediane Zeit bis zur Progression (TTP) betrug bei Patienten ohne 17p-Deletion/11q-Deletion (blaue Kurve) 2118 Tage und bei Patienten mit 17p-Deletion (graue Kurve) oder 11q-Deletion (grüne Kurve) 275, respektive 991 Tage.

3.8.3 „Time to Progression“ bei Patienten mit TP53-Aberration

TP53-Aberrationen (17p-Deletion und/oder TP53-Mutation) wurden bei 20 der 132 Patienten nachgewiesen. Die mediane Zeit vom Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zur Progression betrug in der Gruppe der Patienten ohne TP53-Aberration (n=112) 1903 Tage (ca. 5,2 Jahre), bei Patienten mit TP53-Aberration (n=20) 395 Tage (ca. 1,1 Jahre) ($p < 0,0001$).

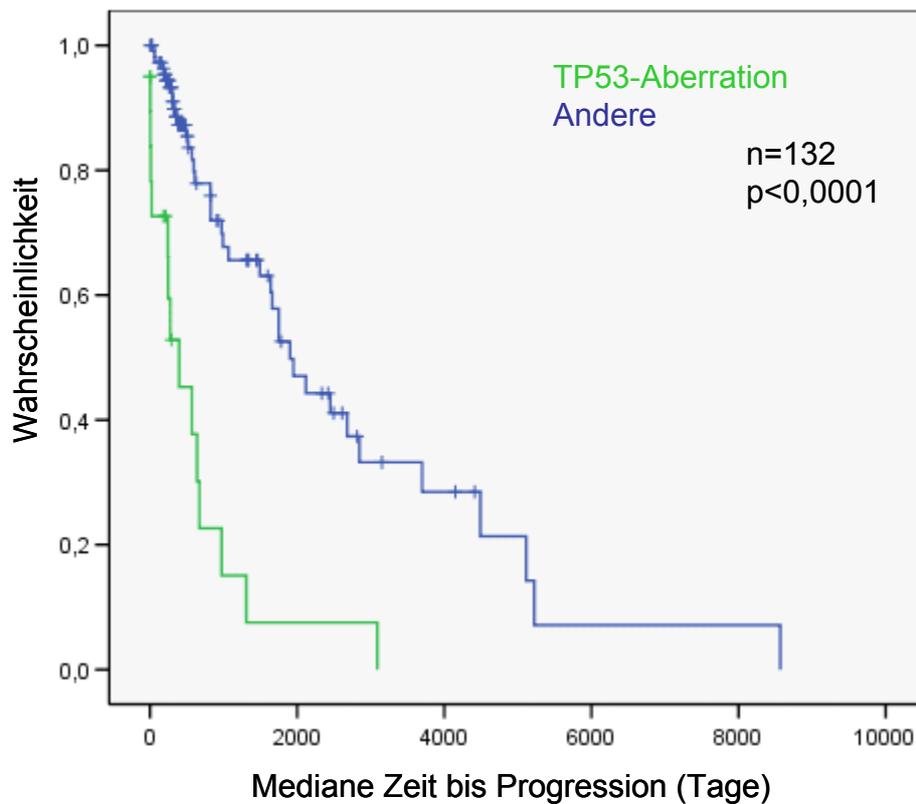


Abbildung 18: Progression der CLL bei Patienten mit TP53-Aberration: Die mediane Zeit bis zur Progression (TTP) betrug bei Patienten ohne TP53-Aberration (blaue Kurve) 1903 Tage und bei Patienten mit TP53-Aberration (grüne Kurve) 395 Tage.

3.8.4 „Time to Progression“ bei Patienten mit isolierter TP53-Mutation

Für diese Untersuchung wurden 119 Patienten analysiert. Davon hatten 7 Patienten ausschließlich eine TP53-Mutation. Keiner der untersuchten Patienten wies eine 17p-Deletion auf. Der Frage nachgehend, ob auch eine isolierte TP53-Mutation den klinischen Verlauf beeinflussen könnte, wurde auch in dieser Gruppe die Zeit bis zur Progression untersucht. Die mediane Zeit bis zur Krankheitsprogression betrug 1903 Tage (ca. 5,2 Jahre) bei Patienten ohne TP53-Mutation und 671 Tage (ca. 1,8 Jahre) bei Patienten, die eine TP53-Mutation aufwiesen ($p=0,014$).

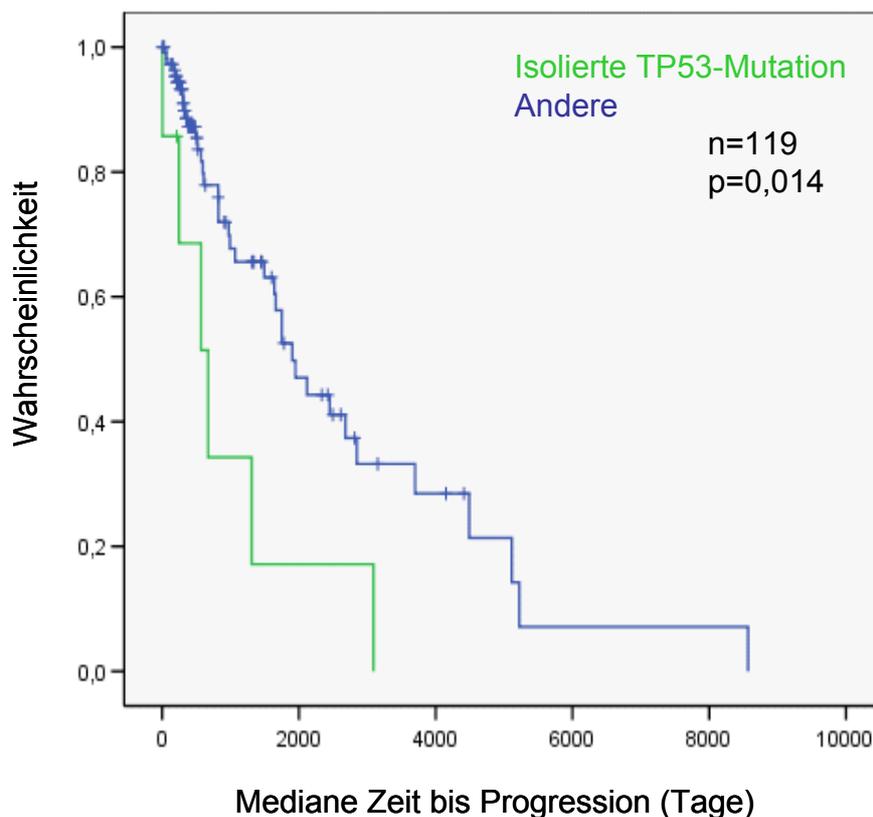


Abbildung 19: Progression der CLL bei Patienten mit TP53-Mutation: Die mediane Zeit bis zur Progression (TTP) betrug bei Patienten ohne TP53-Mutation (blaue Kurve) 1903 Tage und bei Patienten mit TP53-Mutation (grüne Kurve) 671 Tage.

3.8.5 „Time to Progression“ bei Patienten mit komplex aberrantem Karyotyp

Achtzehn Patienten von 132 Patienten mit klinischen Daten zeigten komplexe zytogenetische Veränderungen. Ein Zusammenhang zwischen komplex aberranten Karyotypen und einer ungünstig verlaufenden CLL wurde schon 1985 von Juliusson et al. festgestellt (Juliusson et al., 1985). Auch wir untersuchten in dieser Studie den Zusammenhang zwischen komplex aberranten Karyotypen und dem klinischem Verlauf der Erkrankung. Patienten ohne komplexe Karyotypen zeigten nach einer medianen Zeit von 1750 Tagen (ca. 4,8 Jahre) ein Fortschreiten der CLL. Patienten hingegen mit komplexen zytogenetischen Veränderungen, waren schon nach einer medianen Zeit von 639 Tagen (ca. 1,75 Jahre) progredient ($p < 0,0001$).

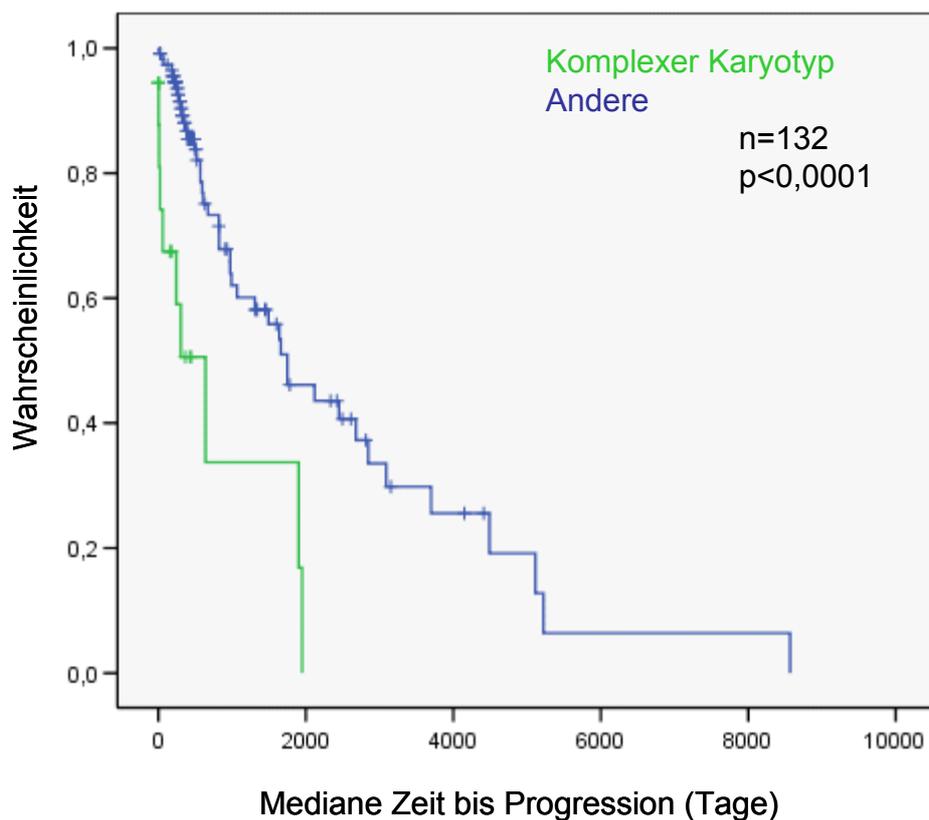


Abbildung 20: Progression der CLL bei Patienten mit komplex aberrantem Karyotyp: Die mediane Zeit bis zur Progression (TTP) betrug bei Patienten ohne komplex aberranten Karyotyp (blaue Kurve) 1750 Tage und bei Patienten mit komplex aberrantem Karyotyp (grüne Kurve) 639 Tage.

3.8.6 „Time to Progression“ bei Patienten mit unbalancierten Translokationen

Weiterhin untersuchten wir den Verlauf bei Patienten mit unbalancierten Translokationen. Bei 111 Patienten mit unbalancierten Translokationen war der klinische Verlauf verfügbar. Davon wiesen 20 Patienten unbalancierte Translokationen auf. Ein früher Progress wurde bei Patienten mit unbalancierten Translokationen beobachtet (im Median: 639 Tage (ca. 1,75 Jahre)). Anders verhielt es sich bei Patienten, welche keine unbalancierten Translokationen zeigten (im Median 1750 Tage (ca. 4,8 Jahre)) ($p=0,001$).

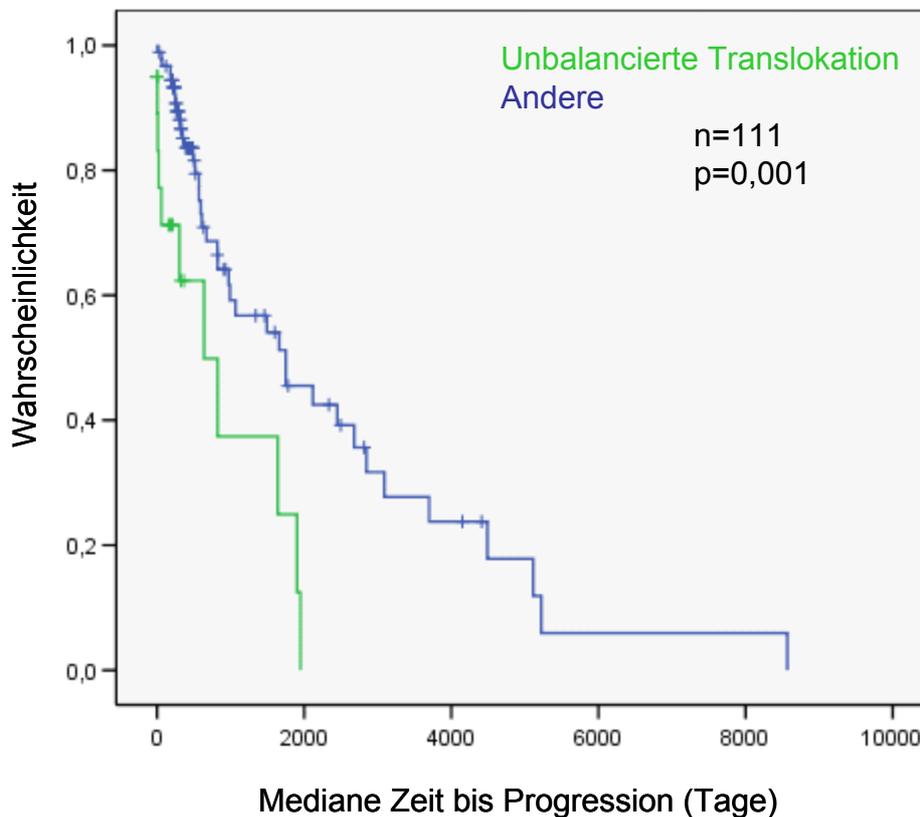


Abbildung 21: Progression der CLL bei Patienten mit unbalancierten Translokationen: Die mediane Zeit bis zur Progression (TTP) betrug bei Patienten ohne unbalancierte Translokationen (blaue Kurve) 1750 Tage und bei Patienten mit unbalancierten Translokationen (grüne Kurve) 639 Tage.

3.8.7 Ergebnisse der Multivariat-Analyse

In die Multivariat-Analyse wurden ausschließlich Parameter einbezogen, welche bereits in der Univariat-Analyse signifikant mit der abhängigen Variable TTP korrelierten. Hierbei handelte es sich um folgende Parameter: isolierte TP53-Mutation, komplex aberranter Karyotyp, unbalancierte Translokationen, unmutierte IGVH-Gene, normaler Karyotyp und 11q-Deletion sowie 17p-Deletion in der FISH-Analyse, und allgemein eine TP53-Aberration.

Parameter	Hazard-Ratio	95% Konfidenzintervall	P
Isolierte TP53-Mutation	2,676	1,041-6,877	0,041
Komplexer Karyotyp	3,042	1,494-6,194	0,002
unbalancierte Translokationen	2,674	1,326-5,395	0,006
balancierte Translokationen	1,57	0,724-3,407	0,253
unmutierte IGVH-Gene	3,726	2,022-6,865	<0,0001
normaler Karyotyp (FISH)	0,395	0,184-0,847	0,017
11q-Deletion (FISH)	2,285	1,207-4,326	0,011
P53-Aberration	3,675	1,950-6,926	<0,0001
17p-Deletion (FISH)	4,43	2,048-9,583	<0,0001
Trisomie 12 (FISH)	1,023	0,312-3,351	0,97
13q-Deletion	0,863	0,477-1,560	0,625

Tabelle 12: Ergebnisse der Univariat-Analyse. Dargestellt sind die pro prognostischen Parameter ermittelte Hazard-Ratio, das entsprechende 95% Konfidenzintervall, sowie der jeweilige p-Wert. P-Werte <0,05 wurden als signifikant erachtet.

Patienten mit TP53-Aberration wiesen eine 17p-Deletion und/oder eine TP53-Mutation auf. Um die einzelnen TP53-Aberrationen genauer gegeneinander abzugrenzen, wurden zwei Multivariat-Analysen durchgeführt. Zuerst untersuchten wir den unabhängigen Voraussagewert einer TP53-Aberration.

Parameter	Hazard-Ratio	95% Konfidenzintervall	p-Wert
P53-Aberration	3,46	1,463-8,186	0,005
Komplexer Karyotyp unbalancierte Translokationen	1,201	0,308-4,686	0,792
Unmutierte IGVH-Gene	0,99	0,281-3,488	0,987
Normaler Karyotyp (FISH)	4,242	1,949-9,237	<0,0001
11q-Deletion (FISH)	0,794	0,345-1,829	0,589
	0,902	0,409-1,986	0,797

Tabelle 13: Ergebnisse der Multivariat-Analyse (Patienten mit TP53-Aberration). Dargestellt sind die pro prognostischen Parameter ermittelte Hazard-Ratio, das entsprechende 95% Konfidenzintervall, sowie der jeweilige p-Wert. P-Werte <0,05 wurden als signifikant erachtet.

Es zeigte sich, dass neben unmutierten IGVH-Genen ($p < 0,0001$) auch die TP53-Aberration ($p = 0,005$) starke unabhängige Voraussagekraft, bezüglich der TTP, aufweist. Das Vorliegen eines komplex aberranten Karyotyps erreichte keine unabhängige Voraussagekraft ($p = 0,792$).

In einer weiteren Multivariat-Analyse untersuchten wir die unabhängige prognostische Aussagekraft isolierter TP53-Mutationen und 17p-Deletionen.

Parameter	Hazard-Ratio	95% Konfidenzintervall	p-Wert
Isolierte TP53-Mutation	3,131	1,037-9,456	0,043
Komplexer Karyotyp unbalancierte Translokationen	1,073	0,225-5,881	0,929
17p-Deletion (FISH)	1,006	0,286-3,542	0,993
Unmutierte IGVH-Gene	4,079	1,015-16,386	0,048
normaler Karyotyp (FISH)	4,151	1,889-9,122	<0,0001
11q-Deletion (FISH)	0,791	0,343-1,823	0,581
	0,925	0,411-2,097	0,85

Tabelle 14: Ergebnisse der Multivariat-Analyse (isolierte TP53-Mutation vs. 17p-Deletion). Dargestellt sind die pro prognostischen Parameter ermittelte Hazard-Ratio, das entsprechende 95% Konfidenzintervall, sowie der jeweilige p-Wert. P-Werte <0,05 wurden als signifikant erachtet.

Die stärkste prognostische Aussagekraft wiesen wiederholt unmutierte IGVH-Gene ($p < 0,0001$) auf. Isolierte TP53-Mutationen und 17p-Deletionen bewiesen beide unabhängige Voraussagekraft hinsichtlich der TTP ($p = 0,043$ respektive $p = 0,048$). Auch in dieser Analyse zeigte ein komplex aberranter karyotyp keine unabhängige prognostische Aussagekraft ($p = 0,929$).

3.8.8 Inzidenz der TP53-Aberration bei Patienten mit Vortherapie

Frühere Untersuchungen beschrieben bereits eine höhere Inzidenz der TP53-Aberration bei Patienten, welche vor der Bestimmung des TP53-Mutationsstatus, beziehungsweise der 17p-Deletion, einen längeren Krankheitsverlauf und eine vorherige Therapie aufwiesen (Thornton et al., 2004). Das häufigere Auftreten in der Gruppe der vorbehandelten Patienten könnte mit einem bereits vor Erst-Therapiebeginn vorhandenen TP53-aberranten Klon zusammenhängen, welcher aufgrund einer Therapieresistenz einen Selektionsvorteil erhält. Im Übrigen besteht aber auch die Hypothese, eine TP53-Aberration würde erst durch eine Chemotherapie induziert.

Von den 132 Patienten mit klinischen Daten waren zum Untersuchungszeitpunkt im Münchner Leukämie Labor nur 19 Patienten vorbehandelt. Zu den am häufigsten eingesetzten Substanzen zählten die Alkylantien Bendamustin, Chlorambucil und Cyclophosphamid, letzteres meist kombiniert mit dem Purinanalogon Fludarabin und dem Anti-CD20 Antikörper Rituximab (FC, FCR) oder als Bestandteil eines Protokolls bestehend aus Cyclophosphamid, Adriamycin, Vincristin und Prednison (CHOP). Einhundertdreizehn Patienten erhielten keine Therapie zum Zeitpunkt dieser Untersuchung.

Die Inzidenzen einer isolierten TP53-Mutation, einer 17p-Deletion respektive einer TP53-Aberration betragen in der Gruppe der vorbehandelten Patienten 10,5% (2/19), 26,3% (5/19) und 36,8% (7/19). In der nicht vorbehandelten Gruppe verhielt sich dies anders: hier betragen die Inzidenzen 4,4% (5/113), 7,1% (8/113) und 11,5% (13/113). Ein komplexer Karyotyp trat ebenfalls häufiger bei vortherapierten Patienten auf. Die Inzidenz betrug hier 21,1% (4/19), bei Unbehandelten hingegen 12,4% (14/113).

Therapie	isolierte TP53-Mutation	isolierte 17p-Deletion	TP53-Aberration	komplexer Karyotyp	Andere	Anzahl
Mit Vortherapie	2	5	7	4	1	19
ohne Vortherapie	5	8	13	14	73	113
Anzahl	7	13	20	18	74	132

Tabelle 15: Die Inzidenz der TP53-Aberrationen und komplexer Karyotypen bei vorbehandelten Patienten.

4 Diskussion

Der klinische Verlauf der chronischen lymphatischen Leukämie ist sehr variabel. Patienten, die zum Zeitpunkt der Diagnose in das klinische Stadium Binet A eingeordnet werden, überleben in der Regel weit über 10 Jahre. Bei einem medianen Lebensalter von 64 Jahren zum Diagnosezeitpunkt, entspricht dies fast der Lebenserwartung der Normalbevölkerung. Circa ein Drittel der Patienten im Binet Stadium A können jedoch einen aggressiven, schnell voranschreitenden Krankheitsverlauf haben, der eine sofortige Therapie erfordert (Dighiero, 2003; Dighiero, 2005).

Diese Erkenntnisse verdeutlichen, dass die Stadieneinteilung nach Binet keine präzise Abschätzung des Krankheitsverlaufs in den frühen klinischen Stadien zulässt.

Nach Untersuchung bestimmter chromosomaler Aberrationen und ihrer Bedeutung für die Lebenserwartung von CLL-Patienten, wurden Anomalien identifiziert, welche frühzeitig eine bessere Voraussage über den individuellen Verlauf der Erkrankung zulassen. Zu diesen chromosomalen Markern gehört unter anderen die mittels FISH-Analyse ermittelbare 17p-Deletion (TP53-Deletion), die mit einer äußerst ungünstigen Prognose assoziiert ist. Bis heute hat die 17p-Deletion die stärkste prognostische Aussagekraft hinsichtlich des Überlebens und des Rezidivs (Dohner et al., 2000; Krober et al., 2002; Oscier et al., 2002). Gleichzeitig gilt die 17p-Deletion auch als prädiktiver Marker, denn sie lässt Aussagen über das Ansprechen der Erkrankung auf die Therapie zu (Byrd et al., 2006a; Grever et al., 2007a). Eine 17p-Deletion gilt demnach als Hochrisikoaberration und kann bei etwa 7-10% der Fälle mit CLL nachgewiesen werden. Die Lebenserwartung dieser Patienten ist mit ca. 2,5 Jahren äußerst gering. Bei Behandlung mit Purinanaloga und Alkylantien bleibt diese Patientengruppe meist therapierefraktär (Byrd et al., 2006a; Dohner et al., 1995). Komplette Remissionen werden praktisch nicht erreicht.

Es liegt nahe, dass die ungünstige Prognose und das schlechte Ansprechen auf die Therapie bei Patienten mit 17p-Deletion tatsächlich mit einem Verlust des TP53-Gens, welches in der chromosomalen Bande 17p13 lokalisiert ist, zusammenhängen. Bisher ist

allerdings nicht eindeutig bestätigt worden, dass TP53-Verluste allein für die schlechte Prognose bei Patienten mit CLL verantwortlich sind.

Tumorsuppressorgene, zu welchen auch das TP53-Gen gehört, zeigen in der Regel ein rezessives Verhalten. Bei Funktionsverlust eines Allels („first Hit“) kommt es mit hoher Wahrscheinlichkeit, früher oder später zum Funktionsverlust des zweiten Allels („second Hit“) und damit zur Tumorentstehung (Knudson, Jr., 1971; Knudson, 2001). Chromosomale Verluste oder Veränderungen der DNA-Sequenz durch Mutationen, können Funktionsverluste der betroffenen Gene herbeiführen. Bei der CLL ist umstritten, ob Mutationen im Tumorsuppressorgen TP53, unabhängig von einer 17p-Deletion, einen ungünstigen klinischen Verlauf bewirken können. Hinsichtlich dieser Fragestellung untersuchten in der Vergangenheit mehrere Arbeitsgruppen, neben der Inzidenz der 17p-Deletion, auch die Inzidenz der TP53-Mutation bei der CLL.

Während die 17p-Deletion heutzutage vorwiegend mithilfe der FISH-Analyse ermittelt wird, bediente man sich zur Untersuchung von TP53-Mutationen bis dato sehr unterschiedlicher Screeningverfahren.

Bei der CLL wurde hauptsächlich mittels Single-Strand-Conformation-Polymorphism-Analyse (SSCP-Analyse) und Sequenzierung, immunhistochemischer Färbung der zellulären TP53-Akkumulation sowie durchflusszytometrischer Messung der TP53-Überexpression, direkt oder indirekt auf ein Auftreten von TP53-Mutationen in 10-15% der Fälle rückgeschlossen (Dowell et al., 1994).

Folgende Studien beschäftigten sich bereits früher mit der Inzidenz von TP53-Mutationen bei der CLL und deren Auswirkung auf die Prognose der Patienten:

Gaidano et al. untersuchten im Jahre 1991 TP53-Mutationen bei Patienten mit malignen lymphatischen Erkrankungen. Dabei umfasste die SSCP-Analyse eine Kohorte von 40 CLL-Patienten. TP53-Mutationen traten in 6 der 40 Fälle auf (15%). Getestet wurden die Exons 5-9 des TP53-Gens. Eine zytogenetische Untersuchung des Kollektivs wurde nicht durchgeführt (Gaidano et al., 1991).

Die Arbeitsgruppe um el Rouby beschäftigte sich 1993 ebenfalls mit TP53-Mutationen bei der CLL. In einer SSCP-Analyse der Exons 4-9 wurden 53 Patienten getestet, die Inzidenz der TP53-Mutation betrug ebenfalls 15% (8/53). Von 29 therapiebedürftigen Patienten ohne TP53-Mutation, erreichten 93% (n=27) eine partielle Remission nach Verabreichung von Chlorambucil. Nur einer von 7 Patienten (14%) mit TP53-Mutation, die eine Therapie benötigten, erreichte eine partielle Remission. Die Inzidenz der 17p-Deletion wurde nicht ermittelt (el Rouby et al., 1993).

Fenau et al. untersuchten in einer weiteren Studie 39 Patienten auf TP53-Mutationen. Hierfür wurden mithilfe der SSCP-Analyse die Exons 5-8 untersucht. Eine zytogenetische Analyse wurde in allen Fällen durchgeführt. In allen 4 Fällen mit 17p-Deletion wurde auch eine TP53-Mutation gefunden, Patienten ohne 17p-Deletion wiesen hingegen keine Mutation auf (Fenau et al., 1992). In einer weiteren Studie dieser Arbeitsgruppe wurde der Zusammenhang der TP53-Mutation in malignen hämatologischen Erkrankungen (AML, MDS und CLL) mit Chemotherapie untersucht. Dabei konnte in 11% (9/81) der CLL-Patienten eine Mutation nachgewiesen werden. Das Screening umfasste die Exons 4-10 und wurde mittels SSCP-Analyse durchgeführt. In der zytogenetischen Untersuchung wiesen alle Patienten mit 17p-Deletion (n=4) eine TP53-Mutation und einen komplex aberranten Karyotyp auf. Nur einer der therapiepflichtigen Patienten mit TP53-Mutation sprach auf die Behandlung mit Chlorambucil an (Wattel et al., 1994).

Döhner et al. beobachteten eine hohe Frequenz der 17p-Deletion (17%) in einer Kohorte von 100 Patienten. Die Kohorte bestand jedoch nicht ausschließlich aus CLL-Patienten (n=90). Fälle mit Prolymphozytenleukämie (n=7) und Morbus Waldenström (n=3) wurden ebenso in die Studie einbezogen. Neun von 14 Patienten mit 17p-Deletion (65%) zeigten aberrante Banden in der SSCP-Analyse; untersucht wurden die Exons 5-9 des TP53-Gens. Therapieversuche mit Fludarabin und Pentostatin zeigten bei keinem der Patienten mit 17p-Deletion eine Wirkung (Döhner et al., 1995).

Darüber hinaus ermittelten Cordone et al. 1998 die Häufigkeit der TP53-Protein-Überexpression anhand immunhistochemischer Färbung des akkumulierten TP53-

Proteins bei 181 Patienten. In 27 von 181 Fällen (15%) wurde eine Akkumulation von TP53-Protein gefunden, in 88% (15 von 17 untersuchte Patienten) der positiven Fälle konnte eine Mutation durch Sequenzierung bestätigt werden (Cordone et al., 1998).

In einer Studie, in der neben der FISH-Analyse die TP53-Protein-Expression mittels Durchflußzytometrie ermittelt wurde, detektierten Thornton et al. 17 Fälle, welche entweder eine 17p-Deletion vorwiesen oder eine TP53-Protein-Überexpression aufzeigten. Durch Sequenzierung konnte in 50% (7 von 14 untersuchte Patienten) dieser Fälle eine TP53-Mutation detektiert werden (Thornton et al., 2004).

Ein Manko der bisherigen Untersuchungen von TP53-Mutationen bei Patienten mit CLL, ist die meist unvollständige Analyse des TP53-Gens. Aufgrund ursprünglicher Beobachtungen fanden sich die meisten TP53-Mutationen menschlicher Tumoren in den „hot spot“ Regionen der Exons 5-8 (Hollstein et al., 1991). Dies führte dazu, dass in späteren Studien hauptsächlich diese Region untersucht wurde. Analysen des gesamten TP53-Gens zeigten jedoch, dass 13.6% aller Mutationen außerhalb dieses Bereiches liegen (Soussi et al., 2001). Darüber hinaus demonstrierten diese Studien, dass ein erheblicher Anteil der Mutationen in Exon 4, 9 und 10 frameshift- und nonsense-Mutationen sind. Solche Mutationstypen führen in der Regel nicht zu einem vollständigen Protein und sind deshalb nicht mithilfe der Verfahren zur Bestimmung der Protein-Expression nachzuweisen.

Untersuchungen, die sich der immunhistochemischen Färbung oder der Durchflußzytometrie zur Detektion von TP53-Mutationen bedienen, riskieren daher einen erheblichen Anteil der Mutationen nicht zu detektieren. Als hauptsächlich eingesetzte Screeningmethode zur Ermittlung von TP53-Sequenzvariationen bei der CLL diente die SSCP-Analyse. Die SSCP-Analyse erreicht jedoch nur eine Sensitivität von ca. 80% (Jones et al., 1999). Auch hier ist das Risiko hoch, einige Mutationen zu übersehen. Besonders kleine Klone mit mutiertem TP53-Gen könnten bereits bei Diagnose vorhanden sein, würden jedoch durch herkömmliches SSCP-Screening nicht erfasst werden.

Die in den oben erwähnten Studien untersuchten Patientenkollektive setzten sich zum Großteil aus Patienten mit unterschiedlichen malignen hämatologischen Erkrankungen zusammen (Dohner et al., 1995; Gaidano et al., 1991; Wattel et al., 1994). Dementsprechend sind die untersuchten genuinen Fallzahlen zur CLL in den genannten Untersuchungen gering.

Für die vorliegende Untersuchung wurde als Screeningverfahren die DHPLC-Analyse ausgewählt, welche eine höhere Sensitivität aufweist als die SSCP-Analyse. Nachträglich wurden zudem alle Patientenproben mithilfe der Microarray-Technologie resequenziert. Das in dieser Arbeit analysierte Patientenkollektiv bestand ausschließlich aus CLL-Patienten.

4.1 Mutationsscreening

Mithilfe des DHPLC-Screenings der Exons 3-9 des TP53-Gens bei 193 Patienten und der anschließenden Sequenzierung aberranter Fragmente wurden insgesamt 24 TP53-Mutationen bei 20 Patienten identifiziert. Dies ergibt eine Inzidenz der TP53-Mutation von 10,4%. Der durch die DHPLC-Analyse abgedeckte Bereich umfasste 97% aller detektierten Mutationen (32/33). Von den neu hinzugekommenen, nur durch die Chip-Analyse bestätigten Mutationen in Exon 7, 8 und 9 (n=8, eine zusätzliche Mutation befand sich in Exon 10) wurden 7 (87.5%) ebenfalls durch das DHPLC-System detektiert, jedoch reichte die Sensitivität der Sequenzanalyse nicht aus, um den aberranten DHPLC-Kurvenverlauf als Mutation zu identifizieren. Des Weiteren wurden 43% mehr frameshift-Mutationen mit diesem Verfahren entdeckt. Ein DHPLC-Screening der Exons 3-9 stellt demnach eine gute Alternative zum P53Amplichip dar, da sich außerhalb dieses Bereiches nur 3% aller Mutationen (n=1) vorfanden. Wenn auffällige Kurvenverläufe in den Amplikons 7, 8 und 9 nicht durch nachfolgende Sequenzierung bestätigt werden können, zusätzlich aber einer erneuten Untersuchung unter Verwendung der Fragmentkollektion unterzogen würden, könnten insgesamt mehr Mutationen mithilfe dieses Verfahrens ermittelt werden.

Zur Bewertung des P53Amplichips von Roche Molecular Systems wurden alle codierenden Bereiche des TP53-Gens (Exons 2-11) der 193 Patientenproben mithilfe

der Microarray-Technologie resequenziert. Durch den P53Amplichip wurden dabei insgesamt 30 TP53-Mutationen bei 25 Patienten identifiziert. Die Inzidenz der TP53-Mutation auf Basis dieser Methode beträgt somit 13%.

Bei Betrachtung aller gefundenen Mutationen, zeigte sich, dass durch den Microarray 35% mehr Aminosäureaustausche und insgesamt 20% mehr Mutationen observiert wurden. Dennoch sollte erwähnt werden, dass der Microarray hinsichtlich der Detektion kleinerer Insertionen und Deletionen, darunter eine 4-Basenpaar-Deletion, noch verbesserungsfähig bleibt, denn 3 frameshift-Mutationen wurden nicht erkannt.

Die durch die Chip-Analyse hinzugekommenen Mutationen (n=9), stellten ausschließlich Punktmutationen dar und verteilten sich größtenteils auf die Exons 7 (n=5), 8 (n=2) und 9 (n=1). Eine zusätzliche Mutation wurde in Exon 10 gefunden und lag somit außerhalb des durch die DHPLC-Analyse abgedeckten Bereiches.

Es zeigt sich, dass der P53Amplichip von Roche Molecular Systems ein schnelles, relativ einfach anzuwendendes Verfahren mit hoher Sensitivität darstellt, um Patienten mit mutiertem TP53-Gen bei der CLL zu identifizieren. Durch die leichte Handhabung und hohe Sensitivität eignet sich dieses Verfahren zur standardisierten Anwendung in klinischen Studien.

Infolge der Kombination beider Screeningmethoden wurden 33 TP53-Mutationen bei 26 Patienten gefunden und es ergab sich eine Gesamtinzidenz der TP53-Mutation von 13.5%. Bei Vernachlässigung der Untersuchung von Exon 4, wie es in 3 der oben erwähnten Studien der Fall ist, wären 12% der ermittelten TP53-Mutationen nicht erkannt worden. Dies verdeutlicht, wie wichtig die Ausweitung des bisher untersuchten Bereichs (Exons 5-8), auf die Exons 3-9 ist. Idealerweise sollte eine Untersuchung des gesamten codierenden Bereiches erfolgen, also die Analyse der Exons 2-11. Dies sollte besonders in zukünftigen klinischen Studien berücksichtigt werden, wenn es um die Relevanz der TP53-Mutation bezüglich des klinischen Verlaufs geht. Die Größe des in dieser Arbeit analysierten CLL Patientenkollektivs, die Anwendung relativ sensitiver Verfahren zur Mutationssuche, sowie die Untersuchung des gesamten codierenden

Bereichs des TP53-Gens erlauben erstmals, allerdings ungeachtet einer Vortherapie, eine aussagekräftige Angabe zur Inzidenz der TP53-Mutation bei Patienten mit CLL.

Da der Aminosäure-Polymorphismus R72P in der Literatur kontrovers diskutiert wird, wurde in dieser Untersuchung ein möglicher Zusammenhang mit TP53-Mutationen oder anderen prognostisch relevanten Markern analysiert. In dieser Studie konnte kein Zusammenhang zwischen dem Pro72 Allel und dem Auftreten einer TP53-Mutation ($p=1,000$) oder anderen prognostisch bedeutsamen Aberrationen demonstriert werden. Eine weitere Arbeitsgruppe untersuchte den Zusammenhang beider möglicher Sequenzvariationen hinsichtlich der Prognose und der Therapieresistenz bei CLL-Patienten, und stellte keine klinische Relevanz fest (Sturm et al., 2005). In einer anderen Studie wurde ein gehäuftes Auftreten des Pro72 Allels bei der CD38 negativen CLL beschrieben, ein Einfluss auf den klinischen Verlauf wurde nicht beobachtet (Kochethu et al., 2006).

4.2 TP53-Mutationen

Tumorsuppressorgene werden meist durch frameshift- oder nonsense-Mutationen inaktiviert. Hierbei kommt es entweder zum Verschwinden oder zur aberranten Synthese des Genprodukts des betroffenen Allels. Anders verhält es sich im Tumorsuppressorgen TP53: hier treten Mutationen in knapp 74% der Fälle als missense-Mutationen auf, die zum Verlust der TP53-Tumorsuppressorfunktion führen (Sigal et al., 2000; Soussi et al., 2001).

Missense-Mutationen im TP53-Gen befinden sich bevorzugt in den Exons 5-8 (Aminosäuren 102-292), welche für die DNA-Bindungsdomäne des TP53-Proteins codieren. Innerhalb dieses Bereiches konnte an jeder Nukleotidposition eine Mutation in mindestens einem menschlichen Tumor nachgewiesen werden (Soussi, 2007). Durch die große Vielfalt an missense-Mutationen in diesem Bereich entsteht ein breites Spektrum von mutierten TP53-Proteinen mit unterschiedlichen Eigenschaften. Mutierte TP53-Proteine haben gemeinsam, dass sie, verglichen mit dem Wildtyp, normal groß, aber stabiler sind, was zu einer Akkumulation im Zellkern der betroffenen Zelle führt. Außerdem kommt es in allen Fällen zum Verlust der spezifischen Transkriptionsaktivität

des TP53-Proteins. Weiterhin ist anzunehmen, dass TP53-missense-Mutationen 1. zu einem dominant-negativen Effekt durch Heteromerisierung des mutierten TP53-Proteins mit dem Wildtyp-TP53-Protein des nicht betroffenen Allels führen, und es 2. zur gesteigerten Aktivität („gain of function“) des mutierten TP53-Proteins kommt (Soussi, 2007). Demnach verhält sich das mutierte TP53-Gen nicht ausschließlich wie ein klassisch rezessiv wirkendes Tumorsuppressorgen. Missense-Mutationen in der DNA-Bindungsdomäne beeinträchtigen die Funktion des TP53-Proteins als Transkriptionsfaktor, jedoch nicht die Fähigkeit zur Oligomerisierung (Sigal et al., 2000).

In bestimmten Hotspots, beispielsweise den Codons R273 und R248 treten besonders häufig Mutationen auf (Hernandez-Boussard et al., 1999). Das Verhalten der unterschiedlichen TP53-Mutanten ist - wie bereits erwähnt - sehr heterogen. Dies soll im folgenden Beispiel veranschaulicht werden: Bei der H273-Mutante (R273H) bleibt die räumliche Anordnung des Wildtyp-TP53-Proteins zu 98% erhalten. Sie weist bei Heteromerisierung mit dem Wildtyp (R273) eine schwache dominant-negative Aktivität auf. Anders verhält es sich bei der Q248-Mutante (R248Q), bei welcher die Wildtyp-TP53-Struktur nur zu 86% erhalten bleibt (Sigal et al., 2000).

In dieser Analyse lag der Anteil der missense-Mutationen bei 70% und entspricht der in der Literatur angegebenen Inzidenz (Sigal et al., 2000). 82% aller detektierten Mutationen fanden sich in der DNA-Bindungsdomäne des TP53-Gens. Die meisten Mutationen (11/33, 33%) befanden sich in Exon 8 und sind Punktmutationen. Ein beträchtlicher Anteil an Punktmutationen wurde auch in Exon 7 (8/33, 24%) gefunden. In Exon 6 und 5 wurden jeweils vier Mutationen entdeckt (12%). Wie bereits in der Literatur beschrieben, traten wiederholt Mutationen in den Codons R248 (n=3) und R273 (n=3) auf (Hernandez-Boussard et al., 1999).

Bei frameshift- und nonsense-Mutationen kommt es früher oder später aufgrund einer Veränderung des Leserasters zur Entstehung eines Terminations-Codons. Dieses bewirkt einen Abbruch der Transkription des betroffenen Gens und es kommt nicht zur Bildung eines funktionstüchtigen Proteins, was man als funktionellen „knock out“ bezeichnen könnte.

Interessanterweise nahm der Anteil der letztgenannten Mutationen in dieser Arbeit von Exon 4 bis Exon 6 stetig ab (Exon 4: 4/4 Mutationen, Exon 5: 3/4 Mutationen, Exon 6: 2/4 Mutationen). Weiter strangabwärts wurde nur noch eine nonsense-Mutation observiert (Exon 9: 1/1). Dies entspricht ebenfalls der in der Literatur beschriebenen Lokalisation von frameshift- bzw. nonsense-Mutationen, die meist außerhalb der DNA-Bindungsdomäne (Exons 5-8) auftreten (Soussi, 2007). Funktionelle Untersuchungen von TP53-missense-Mutationen in den Exons 4, 9 und 10, zeigen keine Einschränkung der Fähigkeit des TP53-Proteins zur Transaktivierung anderer Gene. Diese Mutationen scheinen demnach keinen Selektionsvorteil zu besitzen und der Umstand könnte erklären, warum in den genannten Lokalisationen hauptsächlich kleinere Deletionen und Insertionen, oder nonsense-Mutationen auftreten.

Bei den Patienten Nr.9 und Nr.97 fanden sich jeweils 2 frameshift/nonsense-Mutationen, eine 17p-Deletion hingegen wurde in keinem der beiden Fälle detektiert. Spezifische Untersuchungen TP53-aberranter Klone könnten sich zukünftig näher mit der Fragestellung befassen, ob bei den genannten Patienten mehrere TP53-mutierte Zellpopulationen gleichzeitig vorhanden sind, oder ob in einem Klon etwa beide Allele durch einen funktionellen *knock out* verloren gingen. Bei fünf weiteren Patienten (Nr.67, Nr.155, Nr.86, Nr.143 und Nr.145) traten neben frameshift/nonsense-Mutationen auch 17p-Deletionen auf. Falls in diesen Fällen jeweils ein Allel durch Mutation und ein Allel durch Deletion betroffen sind, könnte dies einen kompletten *knock out* des TP53-Gens bedeuten. In diesem Fall käme auch kein dominant-negativer Effekt mehr zustande und von einem rezessiven Verhalten des TP53-Gens wäre auszugehen. Ob sich der klinische Verlauf dieser Patienten von solchen mit missense-Mutationen unterscheidet, sollte in prospektiven Studien untersucht werden.

Das Spektrum der in dieser Untersuchung detektierten TP53-Mutationen entspricht den in der Literatur beschriebenen Daten (Petitjean et al., 2007; Sigal et al., 2000; Soussi et al., 2001; Soussi et al., 2005; Soussi, 2007). Bezüglich der missense-Mutationen lässt sich sagen, dass auch bei der CLL die bereits bei anderen Entitäten beschriebenen Hotspots von Mutationen auftreten. Aufgrund der heterogenen Eigenschaften und der funktionellen Unterschiede einzelner TP53-Mutationen lässt sich allerdings keine

einheitliche Aussage über die Auswirkung dieser verschiedenen Mutationen auf das klinische Geschehen machen. In zukünftigen prospektiven Studien sollte deshalb der Effekt unterschiedlicher TP53-Mutationen genauer hinsichtlich des klinischen Verlaufs bei der CLL untersucht werden.

4.3 TP53-Mutationen und 17p-Deletion

In dieser Studie wurden insgesamt 27 Patienten mit einer Veränderung des TP53-Gens gefunden. Dies entspricht einer Inzidenz der TP53-Aberration von 14%.

Unter Anwendung des klassischen CLL spezifischen FISH-Panels wurde das gesamte Patientenkollektiv auf einen Verlust des kurzen Arms von Chromosom 17 untersucht. Eine 17p-Deletion wurde in 9,3% (n=18) der Fälle detektiert und entspricht den in der Literatur angegebenen Werten (Dohner et al., 2000).

Bei fast allen Patienten in dieser Gruppe (17/18, 95%) wurde aber auch ein mutiertes zweites Allel identifiziert. Es ließ sich ein hochsignifikanter Zusammenhang zwischen dem 17p-Allelverlust und dem mutierten Allel bestätigen ($p < 0,0001$). Im Sinne der Tumorsuppressortheorie erhärtet dies den Verdacht, dass im Falle einer Deletion der chromosomalen Bande 17p13, es tatsächlich durch Mutation des TP53-Gens zum kompletten Funktionsverlust kommt. Demnach könnte durchaus das TP53-Gen für die schlechte Prognose der Patienten mit 17p-Deletion verantwortlich sein (Dohner et al., 2000).

Von insgesamt 26 Patienten mit TP53-Mutationen wiesen 17 eine 17p-Deletion auf. In einer nachfolgenden Untersuchung sollte geklärt werden, ob bei den restlichen 9 Patienten, welche keine primäre TP53-Deletion aufwiesen, eine solche Veränderung eventuell im Verlauf der Erkrankung auftreten wird.

Weiterhin ist nicht auszuschließen, dass im Falle des Patienten mit 17p-Deletion, bei welchem keine Mutation detektiert werden konnte, eine solche möglicherweise auf dem zweiten Allel des TP53-Gens im Verlauf der Erkrankung entsteht, oder nach Therapie ein kleiner, bisher nicht identifizierter, mutierter Klon expandieren könnte. Bisher ist

wegen fehlender Paralleldaten nicht klar, ob Patienten mit einer isolierten 17p-Deletion ohne eine TP53-Mutation auf dem zweiten Allel bereits als prognostisch schlecht einzuordnen sind oder ob die Mutation auf dem zweiten Allel für den aggressiven Krankheitsverlauf nötig ist. Unklar ist auch, welche Aberration, 17p-Deletion oder TP53-Mutation, im Verlauf der Erkrankung zuerst auftritt.

4.4 Chromosomale Veränderungen

Die klassische Bänderungsanalyse konnte aufgrund des niedrigen mitotischen Index der B-CLL-Zellen *in vitro* lange Zeit nicht effizient zur Untersuchung der CLL genutzt werden. Durch die Einführung so genannter polyklonaler B-Zell-Aktivatoren (PBA) gelang schließlich eine spezifische Stimulation der B-CLL-Zellen, die Ausbeute an auswertbaren Metaphasen war dennoch gering und die Erkennung rekurrenter klonaler Aberrationen nur bedingt möglich (Gahrton et al., 1982). Dessen ungeachtet, konnte bereits in den 80er Jahren gezeigt werden, dass Patienten mit komplexen zytogenetischen Veränderungen eine wesentlich geringere Lebenserwartung aufwiesen als Patienten mit einzelnen Aberrationen (Juliussen et al., 1985; Juliussen et al., 1990b). 17p-Deletionen sind häufig Bestandteil komplexer Karyotypen und eine Assoziation der 17p-Deletion zu komplexen zytogenetischen Veränderungen bei lymphoproliferativen Erkrankungen wurde bereits in verschiedenen Studien nachgewiesen (Dohner et al., 1995; Shaw et al., 2000; Wattel et al., 1994). Eine Einschränkung dieser Daten *per se* bedeutet jedoch die unzulängliche Stimulation der CLL-Zellen für die chromosomale Analyse, was unweigerlich zu einer methodenbedingten Selektion von aberranten Fällen führen muss. Des Weiteren wurden in den erwähnten Studien nicht ausschließlich CLL-Patienten untersucht. Trotz allem lag der Verdacht nahe, dass ein Zusammenhang zwischen der 17p-Deletion und komplex aberranten Karyotypen bei der CLL bestehen könnte.

Das von Dicker et al. eingeführte Protokoll zur Stimulation der B-CLL-Zellen liefert erstmals reproduzierbare Ergebnisse bei der Stimulation von B-CLL-Zellen in Kultur mit einer Auswertquote von über 95% bei unselektierten CLL Fällen (Dicker et al., 2006). Durch Anwendung dieses Protokolls wurden in der vorliegenden Untersuchung bei 22 Patienten komplexe zytogenetische Veränderungen identifiziert (14%). Die Hälfte dieser

Patienten (11/22, 50%) wies sowohl einen Funktionsverlust des TP53-Gens durch eine TP53-Mutation, als auch durch eine 17p-Deletion auf. Es bestand ein hochsignifikanter Zusammenhang ($p < 0,0001$) zwischen der 17p-Deletion, sowie zwischen der TP53-Mutation und einem komplex aberranten Karyotyp. Bei 22 Patienten mit komplexen zytogenetischen Veränderungen waren also in 11 Fällen beide TP53-Allele betroffen, in 11 Fällen weder eine TP53-Mutation noch eine 17p-Deletion zu finden. In einer nachfolgenden Analyse könnte im Verlauf nachträglich bei folgenden Patienten mit 17p-Deletion und TP53-Mutation der Karyotyp bestimmt werden: Patienten Nr.67, Nr.86, Nr.127 und Nr. 143. Bei den Patienten Nr.140 und Nr.145 wurde der Karyotyp bestimmt, ein komplex aberranter Karyotyp stellte sich allerdings nicht dar. Trotz allem besteht die Möglichkeit, dass sich bei den genannten Patienten im weiteren Verlauf der Erkrankung ein komplex aberranter Karyotyp ausbildet. Die oben bereits erwähnten Patienten Nr.9 und Nr.97 sind Träger von jeweils 2 frameshift/nonsense-Mutationen. Hier liegt möglicherweise ein funktioneller *knock out* des TP53-Gens vor. Auch bei diesen Patienten sollte im Verlauf erneut der Karyotyp bestimmt werden. Dies würde die Behauptung, dass zur Entstehung eines komplex aberranten Karyotyps unter anderem ein TP53 *knock out* notwendig ist, untermauern.

Der enge Zusammenhang zwischen der TP53-Aberration und der Anhäufung genetischer Aberrationen, der bereits von einer anderen Arbeitsgruppe postuliert wurde, bestätigt sich in dieser Untersuchung (Wattel et al., 1994). Unsere Ergebnisse legen nahe, dass Veränderungen im TP53-Gen eine Möglichkeit darstellen, die zu genomischer Instabilität bei CLL und im Verlauf der Erkrankung zur Akkumulation genetischer Veränderungen in Form komplexer zytogenetischer Aberrationen führen kann. Weiterhin könnten TP53-Aberrationen im Zusammenhang mit der schlechten Prognose der Patienten mit komplexen zytogenetischen Veränderungen stehen. Da 50% der Patienten mit komplex aberrantem Karyotyp keine TP53-Veränderungen aufwiesen, liegt es nahe, dass auch andere Faktoren, gegebenenfalls andere Tumorsuppressorgene oder DNA-Reparaturmechanismen in der Genese komplexer chromosomaler Veränderungen, eine Rolle spielen könnten.

Ein enger Zusammenhang konnte auch zwischen TP53-Mutationen und dem Vorhandensein unbalancierter Translokationen bestätigt werden ($p < 0,0001$). Dieser Translokationstyp zeichnet sich durch Zugewinne oder Verluste von chromosomalem Material aus. In der Patientengruppe, in der ausschließlich balancierte Translokationen observiert wurden, war die Inzidenz der TP53-Mutation gering (1/17, 6%). In zwei kürzlich veröffentlichten klinischen Studien war das Auftreten von Translokationen insgesamt mit einem ungünstigen klinischen Verlauf bei CLL-Patienten assoziiert (Mayr et al., 2006; Van Den et al., 2007). Die Daten unserer Studie deuten darauf hin, dass TP53-Mutationen und genetische Instabilität für die schlechte Prognose bei Patienten mit unbalancierten Translokationen mitverantwortlich sein könnten. Bei Patienten mit balancierten Translokationen spielen möglicherweise bisher nicht identifizierte Fusionsgene eine Rolle.

4.5 Korrelation zum klinischen Verlauf

Bei 132 Patienten waren klinische Daten verfügbar. Es wurde ein enger Zusammenhang zwischen der 17p-Deletion und einem aggressiven klinischen Verlauf bestätigt ($p < 0,0001$). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Patienten mit aberrantem TP53-Gen (17p-Deletion und/oder TP53-Mutation) einen intensiveren Krankheitsverlauf erfahren, als Patienten, welche keine der genannten Veränderungen aufweisen ($p < 0,0001$). Das Vorliegen einer TP53-Aberration stellte sich in der Multivariat-Analyse als Parameter mit unabhängiger prognostischer Aussagekraft dar ($p = 0,005$). Aufgrund aktueller Publikationen, wurde auch der Einfluss unbalancierter Translokationen auf den Krankheitsprogress bei CLL untersucht und es wurde auch hier eine rasche Progression beobachtet ($p = 0,001$) (Mayr et al., 2006; Van Den et al., 2007).

Um den Einfluss von isolierten TP53-Mutationen auf den klinischen Verlauf zu untersuchen, wurden klinische Daten von Patienten analysiert, welche ausschließlich Träger von TP53-Mutationen waren. Auch hier konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen TP53-Mutationen und einem schnellen Voranschreiten der Erkrankung festgestellt werden ($p = 0,014$). Während Patienten ohne TP53-Mutation nach einer medianen Zeit von 1903 Tagen (ca. 5,2 Jahre) eine Progression der CLL erfuhren, erlitten Patienten mit mutiertem TP53-Gen bereits nach 671 Tagen (im Median, ca. 1,8

Jahre) einen Progress der Erkrankung. In der Multivariat-Analyse behielt eine isolierte TP53-Mutation ebenfalls unabhängige prognostische Aussagekraft hinsichtlich der TTP ($p=0,043$). Eine neuerdings veröffentlichte Arbeit postuliert jedoch eine geringe Relevanz der isolierten TP53-Mutation bezüglich des progressionsfreien Überlebens bei Patienten mit CLL (Grever et al., 2007a). Allerdings sollte erwähnt werden, dass in der genannten Studie, neben TP53-Mutationen auch Polymorphismen mit in die Analyse einbezogen wurden. Auch die Beschränkung des Mutationsscreenings auf die Exons 5-9 schränkt die Daten ein.

Anhand des in unserer Studie gewählten Zeitfensters (Zeit bis zur Progression vom Zeitpunkt der Erstdiagnose), wird ersichtlich, dass auch Patienten, die ausschließlich TP53-Mutationen aufweisen, als Risikopatienten einzustufen sind. Bisher wird aus Machbarkeitsgründen zur Identifizierung der Hochrisikopatienten hauptsächlich die FISH-Analyse durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurden mittels letztgenannter Technik insgesamt 18 Patienten identifiziert. Durch das parallel durchgeführte TP53-Mutationsscreening der Exons 2-11 wurden jedoch 26 Patienten mit mutiertem TP53-Gen gefunden. In dieser Studie wären durch das herkömmliche Screening 8 besonders gefährdete Patienten nicht identifiziert worden. Zukünftige prospektive Studien sollten mithilfe standardisierter Screeningverfahren erneut den Therapieerfolg der bisher bei CLL eingesetzten Substanzen bei Patienten mit TP53-Mutation untersuchen. Aufgrund der Datenlage, liegt die Vermutung nahe, dass auch Patienten mit TP53-Mutation, unabhängig von einer 17p-Deletion, eine Therapieresistenz gegenüber Alkylantien und Purinanaloga aufweisen (el Rouby et al., 1993; Wattel et al., 1994).

Im Übrigen wurde eine höhere Inzidenz der TP53-Mutation bei bereits vorbehandelten Patienten ermittelt: 10,5% bei Vortherapierten im Vergleich zu 4,4% bei Patienten die keine Therapie erhielten. Unter Umständen könnte durch Vermeidung einer Behandlung mit den gängigen Chemotherapeutika Chlorambucil, Fludarabin oder Cyclophosphamid eine Expansion eines sehr kleinen TP53-mutierten Klons vermieden werden. Schließlich könnten bei Patienten mit aberrantem TP53-Gen alternative Therapieschemata eingesetzt werden, wie beispielsweise die frühzeitige Gabe des monoklonalen

Antikörpers Alemtuzumab oder eine allogene Stammzelltransplantation (Grever et al., 2007b; Stilgenbauer et al., 2002).

Schließlich wurden auch Patienten mit komplex aberranten Karyotypen bezüglich des klinischen Verlaufes untersucht. Es zeigte sich, dass diese ebenso eine frühere Progression der CLL erfahren ($p < 0,0001$). Patienten ohne komplexe zytogenetische Aberrationen erlitten nach einer medianen Zeit von 1750 Tagen (ca. 4,8 Jahre), solche mit komplex aberrantem Karyotyp jedoch schon nach 639 Tagen (ca. 1,75 Jahre) eine Progression der CLL. Bei Betrachtung der vortherapierten Patienten zeigte sich eine höhere Inzidenz komplexer Karyotypen als bei nicht vortherapierten Patienten: 21,1% *versus* 12,4%. Dies könnte für eine Resistenzentwicklung komplex aberranter Karyotypen gegenüber Zytostatika sprechen. In den Multivariat-Analysen hatte der komplex aberrante Karyotyp jedoch keine unabhängige prognostische Bedeutung ($p = 0,792$, $p = 0,929$). Da 50% (11/22) der Fälle mit komplexen Karyotypen TP53-Mutationen und 17p-Deletionen aufwiesen, liegt der Verdacht nahe, dass TP53-Aberrationen am schnellen Krankheitsverlauf dieser Gruppe mitverantwortlich sind. Ebenso ist eine Beteiligung anderer Faktoren, möglicherweise Funktionsverluste anderer Tumorsuppressorgene, zu vermuten. Haferlach et al. demonstrierten in einer aktuellen Publikation einen engen Zusammenhang zwischen komplex aberranten Karyotypen und dem unmutierten IGVH-Status sowie der Expression von CD38, beides prognostische Parameter, die mit einer ungünstigen Prognose assoziiert sind (Haferlach et al., 2007). Weitere Untersuchungen komplex aberranter Karyotypen bei der CLL sind deshalb erforderlich.

Diese Untersuchung demonstriert darüber hinaus, dass sich neben der FISH-Analyse und der Bestimmung des TP53-Mutationsstatus, auch die klassische Chromosomenanalyse zur Erkennung von CLL Hochrisiko-Patienten eignet.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Inzidenz von TP53-Aberrationen (17p-Deletion/TP53-Mutation) in einem unselektierten Kollektiv von 193 CLL-Patienten mittels FISH-Analyse, DHPLC-Analyse mit nachfolgender Sequenzierung, sowie P53Amplichip-Resequenzierung ermittelt. Eine klassische Chromosomenanalyse wurde bei 159 dieser Patienten durchgeführt.

Parallel wurden dazu die Exons 3-9 (DHPLC-Analyse/Sequenzierung) und der komplette codierende Bereich des TP53-Gens (Exons 2-11) (P53Amplichip) untersucht. Die Inzidenz der TP53-Mutation betrug 13,5% (26/193). Eine 17p-Deletion trat in 9,3% (18/193) der Fälle auf und ein komplex aberranter Karyotyp wurde in 14% (22/159) observiert. Isolierte TP53-Mutationen, welche in der FISH-Analyse nicht erkannt werden können, traten in 4,7% aller Fälle auf (9/193). Aufgrund der Patientenzahl, der Auswahl der betrachteten Genabschnitte und der Sensitivität der verwendeten Methoden lässt sich erstmals eine repräsentative Angabe zur Inzidenz der TP53-Mutation bei der CLL machen. Es muss dabei erwähnt werden, dass das untersuchte Patientenkollektiv zum Zeitpunkt der Analyse teilweise schon vorbehandelt war. Die Inzidenz der TP53-Mutation war höher bei Patienten, welche bereits vortherapiert waren (10,5% vs. 4,4%).

Rein methodisch ist zunächst festzustellen, dass aufgrund der einfachen Handhabung und hohen Sensitivität sich der P53Amplichip zum diagnostischen Einsatz in klinischen Studien, die die Relevanz der TP53-Mutation prüfen, eignet.

Bei genauerer Betrachtung der Patienten mit 17p-Deletion zeigte sich weiterhin, dass in 95% der Fälle (17/18) zusätzlich auch eine TP53-Mutation vorhanden war ($p < 0,0001$). Dies legt die Vermutung nahe, dass tatsächlich das TP53-Gen für die schlechte Prognose dieser Patientengruppe verantwortlich ist. Des Weiteren wurden bei 50% der Patienten (11/22) mit komplex aberrantem Karyotyp eine TP53-Mutation sowie eine 17p-Deletion gefunden ($p < 0,0001$). Es ist deshalb anzunehmen, dass TP53-Aberrationen, neben anderen Faktoren, an der Genese genomischer Instabilität in Form komplexer zytogenetischer Veränderungen eine Rolle spielen.

Daten zum klinischen Verlauf waren für 132 Patienten vorhanden. Es wurde die Zeit von der Erstdiagnose bis zum Zeitpunkt der Progression der CLL analysiert. Hierbei zeigte sich ein ungünstiger klinischer Verlauf bei Patienten mit 17p-Deletion. Weiterhin konnte demonstriert werden, dass Patienten mit TP53-Mutation, unabhängig von einer 17p-Deletion, eine schnellere Krankheitsprogression erfuhren als Patienten, welche keine TP53-Mutation aufwiesen (im Median 1,8 *versus* 5,2 Jahre) ($p=0,014$). Auch in der Multivariat-Analyse bewies eine isolierte TP53-Mutation unabhängige prognostische Aussagekraft ($p=0,043$). Patienten mit isolierter TP53-Mutation sind demnach als Risikogruppe zu werten und die Bestimmung des TP53-Mutationsstatus ist indiziert, um neben Patienten mit 17p-Deletion weitere besonders gefährdete Patienten zu erkennen. Auch Patienten mit komplex aberranten Karyotypen zeigten einen schnelleren Progress der CLL als solche ohne komplexe zytogenetische Veränderungen (im Median 1,75 *versus* 4,8 Jahre) ($p<0,0001$). Dies veranschaulicht erneut, dass TP53-Aberrationen mit hoher Wahrscheinlichkeit am ungünstigen klinischen Verlauf der Patienten mit komplexen Karyotypen mitwirken. Es wird außerdem deutlich, dass sich auch die klassische Bänderungsanalyse zum Erkennen von Hochrisiko-Patienten mit CLL eignet.

6 Literaturverzeichnis

Bentz M, Huck K, du MS, Joos S, Werner CA, Fischer K, Dohner H, Lichter P. Comparative genomic hybridization in chronic B-cell leukemias shows a high incidence of chromosomal gains and losses. *Blood* 1995; 85:3610-3618

Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguët H, Goasguen J, Vaugier G, Potron G, Colona P, Oberling F, Thomas M, Tchernia G, Jacquillat C, Boivin P, Lesty C, Duault MT, Monconduit M, Belabbès S, Gremy F. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981; 48:198-206

Binet JL, Caligaris-Cappio F, Catovsky D, Cheson B, Davis T, Dighiero G, Dohner H, Hallek M, Hillmen P, Keating M, Montserrat E, Kipps TJ, Rai K. Perspectives on the use of new diagnostic tools in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006; 107:859-861

Buschmann T, Minamoto T, Wagle N, Fuchs SY, Adler V, Mai M, Ronai Z. Analysis of JNK, Mdm2 and p14(ARF) contribution to the regulation of mutant p53 stability. *J Mol Biol* 2000; 295:1009-1021

Byrd JC, Gribben JG, Peterson BL, Grever MR, Lozanski G, Lucas DM, Lampson B, Larson RA, Caligiuri MA, Heerema NA. Select high-risk genetic features predict earlier progression following chemoimmunotherapy with fludarabine and rituximab in chronic lymphocytic leukemia: justification for risk-adapted therapy. *J Clin Oncol* 2006a; 24:437-443

Byrd JC, Lin TS, Grever MR. Treatment of relapsed chronic lymphocytic leukemia: old and new therapies. *Semin Oncol* 2006b; 33:210-219

Byrd JC, Smith L, Hackbarth ML, Flinn IW, Young D, Proffitt JH, Heerema NA. Interphase cytogenetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia may predict response to rituximab. *Cancer Res* 2003; 63:36-38

Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005; 352:804-815

Cordone I, Masi S, Mauro FR, Soddu S, Morsilli O, Valentini T, Vegna ML, Guglielmi C, Mancini F, Giuliacci S, Sacchi A, Mandelli F, Foa R. p53 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a marker of disease progression and poor prognosis. *Blood* 1998; 91:4342-4349

Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, Marce S, Lopez-Guillermo A, Campo E, Montserrat E. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2003; 348:1764-1775

Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, Buchbinder A, Budman D, Dittmar K, Kolitz J, Lichtman SM, Schulman P, Vinciguerra VP, Rai KR, Ferrarini M, Chiorazzi N. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94:1840-1847

Deaglio S, Capobianco A, Bergui L, Durig J, Morabito F, Duhren U, Malavasi F. CD38 is a signaling molecule in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2003; 102:2146-2155

den Dunnen JT, Antonarakis SE. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutat* 2000; 15:7-12

den Dunnen JT, Antonarakis SE. Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum Genet* 2001; 109:121-124

Dicker F, Schnittger S, Haferlach T, Kern W, Schoch C. Immunostimulatory oligonucleotide-induced metaphase cytogenetics detect chromosomal aberrations in 80% of CLL patients: A study of 132 CLL cases with correlation to FISH, IgVH status, and CD38 expression. *Blood* 2006; 108:3152-3160

Dighiero G. Unsolved issues in CLL biology and management. *Leukemia* 2003; 17:2385-2391

Dighiero G. CLL Biology and Prognosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2005;278-284

Dohner H, Fischer K, Bentz M, Hansen K, Benner A, Cabot G, Diehl D, Schlenk R, Coy J, Stilgenbauer S. p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood* 1995; 85:1580-1589

Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, Dohner K, Bentz M, Lichter P. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000; 343:1910-1916

Dohner H, Stilgenbauer S, James MR, Benner A, Weilguni T, Bentz M, Fischer K, Hunstein W, Lichter P. 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood* 1997; 89:2516-2522

Dowell SP, Wilson PO, Derias NW, Lane DP, Hall PA. Clinical utility of the immunocytochemical detection of p53 protein in cytological specimens. *Cancer Res* 1994; 54:2914-2918

Dumont P, Leu JI, Della PA, III, George DL, Murphy M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet* 2003; 33:357-365

el Rouby S, Thomas A, Costin D, Rosenberg CR, Potmesil M, Silber R, Newcomb EW. p53 gene mutation in B-cell chronic lymphocytic leukemia is associated with drug

resistance and is independent of MDR1/MDR3 gene expression. *Blood* 1993; 82:3452-3459

Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S, Sellars B, Valetto A, Allen SL, Schulman P, Vinciguerra VP, Rai K, Rassenti LZ, Kipps TJ, Dighiero G, Schroeder HW, Jr., Ferrarini M, Chiorazzi N. Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J Clin Invest* 1998; 102:1515-1525

Fenaux P, Preudhomme C, Lai JL, Quiquandon I, Jonveaux P, Vanrumbeke M, Sartiaux C, Morel P, Loucheux-Lefebvre MH, Bauters F, . Mutations of the p53 gene in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a report on 39 cases with cytogenetic analysis. *Leukemia* 1992; 6:246-250

Fink SR, Smoley SA, Stockero KJ, Paternoster SF, Thorland EC, Van Dyke DL, Shanafelt TD, Zent CS, Call TG, Kay NE, Dewald GW. Loss of TP53 is due to rearrangements involving chromosome region 17p10 approximately p12 in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2006; 167:177-181

Gahrton G, Juliusson G, Robert KH, Friberg K. Role of chromosomal abnormalities in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Rev* 1987; 1:183-192

Gahrton G, Robert KH. Chromosomal aberrations in chronic B-cell lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1982; 6:171-181

Gahrton G, Robert KH, Friberg K, Zech L, Bird AG. Extra chromosome 12 in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 1980a; 1:146-147

Gahrton G, Robert KH, Friberg K, Zech L, Bird AG. Nonrandom chromosomal aberrations in chronic lymphocytic leukemia revealed by polyclonal B-cell-mitogen stimulation. *Blood* 1980b; 56:640-647

Gaidano G, Ballerini P, Gong JZ, Inghirami G, Neri A, Newcomb EW, Magrath IT, Knowles DM, Dalla-Favera R. p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88:5413-5417

Grever MR, Lucas DM, Dewald GW, Neuberg DS, Reed JC, Kitada S, Flinn IW, Tallman MS, Appelbaum FR, Larson RA, Paietta E, Jelinek DF, Gribben JG, Byrd JC. Comprehensive assessment of genetic and molecular features predicting outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the US Intergroup Phase III Trial E2997. *J Clin Oncol* 2007a; 25:799-804

Grever MR, Lucas DM, Johnson AJ, Byrd JC. Novel agents and strategies for treatment of p53-defective chronic lymphocytic leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007b; 20:545-556

Haferlach C, Dicker F, Herholz H, Schnittger S, Kern W, Haferlach T. Mutations of the TP53 gene in acute myeloid leukemia are strongly associated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia* 2008; 22:1539-1541

Haferlach C, Dicker F, Schnittger S, Kern W, Haferlach T. Comprehensive genetic characterization of CLL: a study on 506 cases analysed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgV(H) status and immunophenotyping. *Leukemia* 2007; 21:2442-2451

Hallek M, Bergmann M, Emmerich B. Chronic lymphocytic leukaemia: up-dated recommendations on diagnosis and treatment. *Onkologie* 2004; 27:97-104

Hallek M, Langenmayer I, Nerl C, Knauf W, Dietzfelbinger H, Adorf D, Ostwald M, Busch R, Kuhn-Hallek I, Thiel E, Emmerich B. Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonmolding chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 93:1732-1737

Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94:1848-1854

Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Thomas PW, Stevenson FK, Oscier DG. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood* 2002; 99:1023-1029

Han T, Ozer H, Sadamori N, Emrich L, Gomez GA, Henderson ES, Bloom ML, Sandberg AA. Prognostic importance of cytogenetic abnormalities in patients with chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 1984; 310:288-292

Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 1997; 387:296-299

Hernandez-Boussard T, Rodriguez-Tome P, Montesano R, Hainaut P. IARC p53 mutation database: a relational database to compile and analyze p53 mutations in human tumors and cell lines. International Agency for Research on Cancer. *Hum Mutat* 1999; 14:1-8

Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253:49-53

Ibrahim S, Keating M, Do KA, O'Brien S, Huh YO, Jilani I, Lerner S, Kantarjian HM, Albitar M. CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001; 98:181-186

Isobe M, Emanuel BS, Givol D, Oren M, Croce CM. Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature* 1986; 320:84-85

Jones AC, Austin J, Hansen N, Hoogendoorn B, Oefner PJ, Cheadle JP, O'Donovan MC. Optimal temperature selection for mutation detection by denaturing HPLC and comparison to single-stranded conformation polymorphism and heteroduplex analysis. *Clin Chem* 1999; 45:1133-1140

Juliusson G, Gahrton G. Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Pathogenetic and clinical implications. *Cancer Genet Cytogenet* 1990a; 45:143-160

Juliusson G, Oscier DG, Fitchett M, Ross FM, Stockdill G, Mackie MJ, Parker AC, Castoldi GL, Guneo A, Knuutila S, . Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. *N Engl J Med* 1990b; 323:720-724

Juliusson G, Robert KH, Ost A, Friberg K, Biberfeld P, Nilsson B, Zech L, Gahrton G. Prognostic information from cytogenetic analysis in chronic B-lymphocytic leukemia and leukemic immunocytoma. *Blood* 1985; 65:134-141

Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, Mattioli M, Cattoretti G, Husson H, Freedman A, Inghirami G, Cro L, Baldini L, Neri A, Califano A, Dalla-Favera R. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med* 2001; 194:1625-1638

Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971; 68:820-823

Knudson AG. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer* 2001; 1:157-162

Kochethu G, Delgado J, Pepper C, Starczynski J, Hooper L, Krishnan S, Fegan C, Pratt G. Two germ line polymorphisms of the tumour suppressor gene p53 may influence the biology of chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Res* 2006; 30:1113-1118

Krober A, Seiler T, Benner A, Bullinger L, Bruckle E, Lichter P, Dohner H, Stilgenbauer S. V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 100:1410-1416

Lamb P, Crawford L. Characterization of the human p53 gene. *Mol Cell Biol* 1986; 6:1379-1385

Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, Garcia MJ, Houlihan A, Que TH, Catovsky D. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia* 1994; 8:1640-1645

Mayr C, Speicher MR, Kofler DM, Buhmann R, Strehl J, Busch R, Hallek M, Wendtner CM. Chromosomal translocations are associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006; 107:742-751

Messmer BT, Messmer D, Allen SL, Kolitz JE, Kudalkar P, Cesar D, Murphy EJ, Koduru P, Ferrarini M, Zupo S, Cutrona G, Damle RN, Wasil T, Rai KR, Hellerstein MK, Chiorazzi N. In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest* 2005; 115:755-764

Midgley CA, Lane DP. p53 protein stability in tumour cells is not determined by mutation but is dependent on Mdm2 binding. *Oncogene* 1997; 15:1179-1189

Montserrat E, Sanchez-Bisono J, Vinolas N, Rozman C. Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of its prognostic significance. *Br J Haematol* 1986; 62:567-575

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology* 1992; 24:17-27

Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Wiestner A, Rosenwald A, Thomas PW, Hamblin TJ, Staudt LM, Oscier DG. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 2004; 363:105-111

Oscier DG, Gardiner AC, Mould SJ, Glide S, Davis ZA, Ibbotson RE, Corcoran MM, Chapman RM, Thomas PW, Copplestone JA, Orchard JA, Hamblin TJ. Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. *Blood* 2002; 100:1177-1184

Osuji NC, Del G, I, Matutes E, Wotherspoon AC, Dearden C, Catovsky D. The efficacy of alemtuzumab for refractory chronic lymphocytic leukemia in relation to cytogenetic abnormalities of p53. *Haematologica* 2005; 90:1435-1436

Petitjean A, Achatz MI, Borresen-Dale AL, Hainaut P, Olivier M. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene* 2007; 26:2157-2165

Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83:2934-2938

Rai KR, Chiorazzi N. Determining the clinical course and outcome in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2003; 348:1797-1799

Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975; 46:219-234

Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, Chen L, Keating MJ, Gribben JG, Neuberg DS, Flinn IW, Rai KR, Byrd JC, Kay NE, Greaves A, Weiss A, Kipps TJ. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2004; 351:893-901

Reed JC. Molecular biology of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol* 1998; 25:11-18

Robert KH, Gahrton G, Friberg K, Zech L, Nilsson B. Extra chromosome 12 and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Scand J Haematol* 1982; 28:163-168

Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, Simon R, Davis RE, Yu X, Yang L, Pickeral OK, Rassenti LZ, Powell J, Botstein D, Byrd JC, Grever MR, Cheson BD, Chiorazzi N, Wilson WH, Kipps TJ, Brown PO, Staudt LM. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2001; 194:1639-1647

Rozman C, Montserrat E. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 1995; 333:1052-1057

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. 1985. *Biotechnology* 1992; 24:476-480

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology* 1992; 24:104-108

Schaffer LG, Tommerup N. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Freiburg: Karger, 2005

Schoch C, Haferlach T, Haase D, Fonatsch C, Loffler H, Schlegelberger B, Staib P, Sauerland MC, Heinecke A, Buchner T, Hiddemann W. Patients with de novo acute myeloid leukaemia and complex karyotype aberrations show a poor prognosis despite intensive treatment: a study of 90 patients. *Br J Haematol* 2001; 112:118-126

Schoch C, Kern W, Kohlmann A, Hiddemann W, Schnittger S, Haferlach T. Acute myeloid leukemia with a complex aberrant karyotype is a distinct biological entity characterized by genomic imbalances and a specific gene expression profile. *Genes Chromosomes Cancer* 2005; 43:227-238

Schoch C, Schnittger S, Bursch S, Gerstner D, Hochhaus A, Berger U, Hehlmann R, Hiddemann W, Haferlach T. Comparison of chromosome banding analysis, interphase- and hypermetaphase-FISH, qualitative and quantitative PCR for diagnosis and for follow-up in chronic myeloid leukemia: a study on 350 cases. *Leukemia* 2002; 16:53-59

Seiler T, Dohner H, Stilgenbauer S. Risk stratification in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol* 2006; 33:186-194

Shaw GR, Kronberger DL. TP53 deletions but not trisomy 12 are adverse in B-cell lymphoproliferative disorders. *Cancer Genet Cytogenet* 2000; 119:146-154

Sigal A, Rotter V. Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer Res* 2000; 60:6788-6793

Soussi T. p53 alterations in human cancer: more questions than answers. *Oncogene* 2007; 26:2145-2156

Soussi T, Beroud C. Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 2001; 1:233-240

Soussi T, Lozano G. p53 mutation heterogeneity in cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 331:834-842

Stilgenbauer S, Dohner H. Campath-1H-induced complete remission of chronic lymphocytic leukemia despite p53 gene mutation and resistance to chemotherapy. *N Engl J Med* 2002; 347:452-453

Sturm I, Bosanquet AG, Hummel M, Dorken B, Daniel PT. In B-CLL, the codon 72 polymorphic variants of p53 are not related to drug resistance and disease prognosis. *BMC Cancer* 2005; 5:105-

Thornton PD, Gruszka-Westwood AM, Hamoudi RA, Atkinson S, Kaczmarek P, Morilla RM, Hilditch BL, A'Hern R, Matutes E, Catovsky D. Characterisation of TP53 abnormalities in chronic lymphocytic leukaemia. *Hematol J* 2004; 5:47-54

Tobin G, Thunberg U, Johnson A, Thorn I, Soderberg O, Hultdin M, Botling J, Enblad G, Sallstrom J, Sundstrom C, Roos G, Rosenquist R. Somatically mutated Ig V(H)3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 99:2262-2264

Tsukada N, Burger JA, Zvaifler NJ, Kipps TJ. Distinctive features of "nurselike" cells that differentiate in the context of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 99:1030-1037

Van Den NE, Robin V, Francart J, Hagemeyer A, Stul M, Vandenberghe P, Delannoy A, Sonet A, Deneys V, Costantini S, Ferrant A, Robert A, Michaux L. Chromosomal translocations independently predict treatment failure, treatment-free survival and overall survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia patients treated with cladribine. *Leukemia* 2007; 21:1715-1722

Wattel E, Preudhomme C, Hecquet B, Vanrumbeke M, Quesnel B, Dervite I, Morel P, Fenaux P. p53 mutations are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematologic malignancies. *Blood* 1994; 84:3148-3157

Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, Wright G, Davis RE, Henrickson SE, Zhao H, Ibbotson RE, Orchard JA, Davis Z, Stetler-Stevenson M, Raffeld M, Arthur DC, Marti GE, Wilson WH, Hamblin TJ, Oscier DG, Staudt LM. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood* 2003; 101:4944-4951

7 Danksagung

Mein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Torsten Haferlach, Frau PD Dr. Claudia Haferlach, Herrn PD Dr. Wolfgang Kern und Frau PD Dr. Susanne Schnittger, die mir im Münchner Leukämie Labor dieses Projekt und vieles mehr ermöglicht haben.

Mein besonderer Dank gilt speziell Herrn Dr. Frank Dicker, ohne dessen unerschöpfliche Geduld und methodischen Beistand diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Auch möchte ich mich bei allen anderen Mitarbeitern des Münchner Leukämie Labors sowie bei Lin Wu, Nancy Patten, Aki Nakao, Sim Troung und Alexander Kohlmann von Roche Diagnostics für die herzliche Zusammenarbeit und Unterstützung bedanken.