

Aus der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Onkologie/Hämatologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Mutationsanalyse des *TP53*-Gens bei Rezidiven der akuten lymphoblastischen Leukämie im Kindesalter

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Claudia Ute van Schewick
aus Bonn

Gutachter: 1.: Priv.-Doz. Dr. med. Dr. rer. nat. K. Seeger

2.: Prof. Dr. med. C. A. Schmidt

3. Priv.-Doz. Dr. med. I. Tamm

Datum der Promotion: 19.09.2008

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	4
1.1	Akute lymphoblastische Leukämie (ALL) im Kindesalter	4
1.1.1	Diagnose und Klassifikation	4
1.1.2	Prognose und Ansprechen auf die Therapie	6
1.1.3	ALL-Rezidive im Kindesalter	9
1.2	<i>Tumorprotein 53 (TP53)</i>	13
1.2.1	Tumorsuppressorgen <i>TP53</i>	13
1.2.2	Struktur	14
1.2.3	Funktion	17
1.2.3.1	Signale zur Aktivierung von p53	17
1.2.3.2	Aktivierung und Abbau von p53	18
1.2.3.3	Effekte von p53 in der Zelle	18
1.2.4	Mutationen von <i>TP53</i> und ihre Rolle bei der Entstehung und Progression maligner Erkrankungen	21
1.3	<i>TP53</i> -Mutationen bei der ALL im Kindesalter	23
1.3.1	<i>TP53</i> -Mutationen bei der ALL-Ersterkrankung	23
1.3.2	<i>TP53</i> -Mutationen bei ALL-Rezidiven.....	24
2	ZIELSETZUNG	26
3	MATERIAL UND METHODEN	27
3.1	Material	27
3.1.1	Patientenproben.....	27
3.1.2	Verbrauchsmaterialien	28
3.1.3	Puffer und Lösungen.....	28
3.1.4	Geräte	29
3.2	Methoden.....	30
3.2.1	Zellaufarbeitung	30
3.2.2	DNA-Isolierung.....	31
3.2.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	32
3.2.3.1	Theoretische Grundlagen	32
3.2.3.2	Durchführung	32

3.2.3.3	Amplifizierung von DNA aus einem nativen Knochenmark- Ausstrich	34
3.2.4	Agarose-Gelelektrophorese	34
3.2.5	Sequenzierung	35
3.2.5.1	Theoretische Grundlagen	35
3.2.5.2	Durchführung	35
3.2.5.3	Auswertung der DNA-Sequenzierung	36
3.2.6	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung (FISH)	36
3.2.6.1	Theoretische Grundlagen	36
3.2.6.2	Durchführung	38
3.2.7	Statistische Auswertung	40
4	ERGEBNISSE	42
4.1	Analyse des untersuchten Patientenkollektivs auf Repräsentativität	42
4.2	Ergebnisse der <i>TP53</i> -Mutationsanalyse	44
4.2.1	<i>TP53</i> -Sequenzveränderungen in diagnostischen Proben von 116 ALL-Rezidiv-Patienten	44
4.2.2	Status der <i>TP53</i> -Allele bei Patientenproben mit <i>TP53</i> -Mutation zum Zeitpunkt der Rezidivdiagnose	49
4.2.3	Analyse der <i>TP53</i> -Sequenzveränderungen zum Zeitpunkt der ALL- Ersterkrankung und der Remission	51
4.3	Prüfung von Zusammenhängen zwischen <i>TP53</i> -Mutationen und klinischen sowie genetisch-biologischen Parametern	53
4.3.1	Zusammenhang zwischen <i>TP53</i> -Mutationen und der Krankheitsprognose sowie dem Therapieergebnis	55
4.3.2	Zusammenhang zwischen <i>TP53</i> -Mutationen und genetischen Faktoren	57
4.3.3	Zusammenhang zwischen <i>TP53</i> -Mutationen und der proliferativen Kapazität leukämischer Blasten	59
5	DISKUSSION	61
5.1	Inzidenz von <i>TP53</i> -Mutationen beim ALL-Rezidiv	61
5.2	Art der identifizierten <i>TP53</i> -Mutationen und funktionelle Konsequenz	64

5.3	Entstehungszeitpunkt von <i>TP53</i> -Mutationen bei der ALL	66
5.4	Korrelation des <i>TP53</i> -Mutationsstatus mit klinischen und molekularbiologischen Parametern	67
5.5	Rolle erblicher <i>TP53</i> -Mutationen bei der ALL (Li-Fraumeni Syndrom).....	69
5.6	Mögliche therapeutische Konsequenzen aus den Untersuchungsergebnissen	72
6	ZUSAMMENFASSUNG	74
7	LITERATURVERZEICHNIS	76
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	90
9	LEBENS LAUF	93
10	DANKSAGUNG	94
11	ERKLÄRUNG	95

1 Einleitung

1.1 Akute lymphoblastische Leukämie (ALL) im Kindesalter

Jedes Jahr erkranken ungefähr 1800 Kinder in Deutschland an einer malignen Erkrankung. Der größte Teil dieser Kinder, ca. 550 pro Jahr, leidet an einer akuten lymphoblastischen Leukämie¹. Die Verbesserung der Therapieprotokolle und der Konditionen für eine Stammzelltransplantation sowie die Identifizierung prognostischer Parameter für besser auf den Patientenbedarf abgestimmte Therapieentscheidungen haben die ereignisfreien Überlebensraten in der ALL auf über 75 Prozent anheben können². Diese Zahl impliziert aber auch, dass immer noch 25 Prozent dieser Kinder ein Rezidiv erleiden und/oder sterben. Da die genannten Heilungsraten in den letzten Jahren stabil geblieben sind, scheint eine weitere Verbesserung schwierig. Neue Chancen für Diagnostik und Therapie erhofft man sich von der Identifizierung der molekularbiologischen Grundlagen der ALL und ihres Rezidivs.

Die Krankheitsgruppe der Leukämien ist durch die maligne Transformation von Zellen des hämatopoetischen Systems gekennzeichnet. Die afunktionalen leukämischen Blasten verdrängen die eigentlichen Knochenmarksbestandteile und führen zu einer Störung der Knochenmarksfunktion und schließlich zum Versagen des Knochenmarks³. Dieser Vorgang kann mit einer Ausschwemmung der leukämischen Zellen ins periphere Blut einhergehen⁴. Die Detektion atypischer Zellen im Differenzial-Blutbild ist häufig der erste labortechnische Hinweis auf eine Leukämie. Aus der erhöhten Anzahl von sichtbaren Leukozyten im Blut erklärt sich der Name Leukämie („weißes Blut“), den Rudolf Virchow 1845 im Rahmen der chronischen myeloischen Leukämie prägte.

1.1.1 Diagnose und Klassifikation

Die Diagnose einer ALL wird gestellt, wenn 25 Prozent oder mehr der kernhaltigen Zellen des Knochenmarks aus unreifen Zellen (Lymphoblasten) bestehen, oder wenn Blasten im peripheren Blut oder im Liquor cerebrospinalis detektiert werden⁵. Finden sich im Liquor pro Mikroliter mindestens fünf weiße Blutzellen mit Blastenmorphologie, so ist die Diagnose einer Leukämie mit Befall des zentralen Nervensystems (ZNS) zu stellen. Zusätzlich werden eine Röntgenuntersuchung des Thorax (zum Ausschluss

eines Mediastinaltumors) und eine sonographische Untersuchung der Bauchorgane in die Diagnostik mit eingeschlossen, um andere extramedulläre Herde auszuschliessen.

Leukämien werden in verschiedene Subgruppen unterteilt. Anhand des klinischen Verlaufs der Krankheit unterscheidet man akute und chronische Leukämien. Akute Leukämien präsentieren einen unbehandelt in wenigen Wochen bis Monaten tödlichen Verlauf, während er sich bei chronischen Leukämien schleichend und über Jahre stabil zeigen kann⁶. Zusätzlich werden Leukämien abhängig von ihrer vermutlichen Ursprungszelle in der Hämatopoese in lymphatische und myeloische Leukämien untergliedert.

Eine weitere Unterteilung kann nach morphologischen Gesichtspunkten vorgenommen werden. Die Merkmale der Französisch-Amerikanisch-Britischen (FAB)-Klassifikation⁷ der akuten lymphatischen Leukämien sind in Tabelle 1.1 dargestellt.

Tabelle 1.1: FAB-Klassifikation der akuten lymphatischen Leukämien (entnommen aus⁴)		
ALL-Typ	Blastenmorphologie	Bevorzugte Altersgruppe
L1 (=kindlicher Typ)	homogene Zellpopulation: vorwiegend kleine blastäre Zellen, heterochromatische Kerne, selten Nukleolen	Kinder
L2 (=Erwachsenentyp)	heterogene Zellpopulation zwischen L1 und L3, oft Kernkerbung, Nukleolen	Erwachsene
L3 (=Burkitt-Typ)	homogene Zellpopulation vorwiegend aus Blasten, rundliche Kerne, große Nukleolen	keine Altersbevorzugung

Eine weitere Subklassifizierung der ALL stellt die Einteilung nach dem Immunphänotyp der entarteten Zelle dar. Der Immunphänotyp wird in der Durchflusszytometrie anhand immunologischer Oberflächenmarker bestimmt, die die Zuordnung zu einer bestimmten hämatopoetischen Differenzierungsstufe möglich machen⁸. Lymphozyten gliedern sich in Zellen der T- und der B-Zell-Reihe auf. T-Zellen sind für die zelluläre Immunantwort verantwortlich, während B-Zellen ihre Funktion auf humoralem Wege wahrnehmen. Die

T-Zell-ALL wird in die unreife T-Vorläufer-Zellen enthaltende prä-T-ALL, die etwas weiter differenzierte intermediate-T-ALL und die am höchsten differenzierte T-ALL unterteilt. Bei der B-Vorläuferzell-ALL können drei Typen nach steigendem Differenzierungsgrad unterschieden werden: pro-B-ALL, c(common)-ALL und prä-B-ALL. Die reife B-ALL (L3 nach der FAB-Klassifikation) nimmt eine Sonderrolle ein, da sie sowohl zytomorphologisch als auch immunologisch Parallelen zu einem B-Non-Hodgkin-Lymphom (B-NHL) aufweist. Sie wird deshalb nach den Therapieprotokollen der B-NHL-Studien behandelt⁹.

1.1.2 Prognose und Ansprechen auf die Therapie

Die Identifizierung prognostischer Faktoren wurde vor allem durch konsekutive Therapieoptimierungsstudien ermöglicht. Für Deutschland, Österreich und die Schweiz sind dies z.B. die ALL-BFM (Berlin Frankfurt Münster)-Studien zur Behandlung von Kindern mit ALL-Ersterkrankung. Validierte prognostische Marker können zur Therapiestratifizierung herangezogen werden und ermöglichen so eine risikoadaptierte Therapie.

Zu den „klassischen“ Prognosemarkern zählen u. a. Alter und Geschlecht des Patienten, die Anzahl an Leukozyten im peripheren Blut, eine Beteiligung des zentralen Nervensystems und das Ansprechen auf die Therapie (beurteilt nach morphologischen Merkmalen) (für eine vollständige Auflistung s. Tabelle 1.2).

Die moderne Molekulargenetik hat zu einer Erweiterung der Prognosemarker um molekulare oder molekular bestimmte Faktoren geführt. Hierzu gehört die Messung des Ansprechens auf die Therapie auf submikroskopischer Ebene (engl. *minimal residual disease*, MRD). Diese Art der molekulargenetischen Untersuchung basiert auf der Beobachtung, dass Leukämiezellpopulationen identisch rekombinierte Immunglobulin- und T-Zell-Rezeptor-Genorte aufweisen, die sie von den normalen Lymphozyten unterscheidbar machen¹⁰. Anhand dieser klonalen Marker können leukämische Restzellen bis zu einer Sensitivität von einer Leukämiezelle in 10.000 normalen Zellen im Knochenmark detektiert werden.

Des Weiteren haben sich chromosomale Aberrationen als prognostisch bedeutsam erwiesen. Zu diesen gehören die Translokationen t(9;22) (*BCR-ABL*)¹¹, t(1;19) (*E2A-PBX*)¹², t(11;19) (*MLL-ENL*)¹³ und t(4;11) (*MLL-AF4*)¹⁴. Bei diesen chromosomalen Translokationen findet in zwei verschiedenen Genen ein Bruch statt. Die Bruchenden

eines Gens fusionieren jeweils mit dem Bruchfragment des anderen Gens. Daraus resultieren die in Klammern genannten Fusionsgene mit einem veränderten Proteinprodukt, welches eine maligne Transformation bewirken oder zu ihr beitragen kann. Sie sind häufig mit einem schlechten Therapieergebnis verbunden. Das Fusionsgen *TEL-AML1* (t(12;21)) und die starke Hyperdiploidie (engl. *high hyperdiploidy*, >50 Chromosomen, messbar u.a. durch einen DNA-Index über 1,16) wurden dagegen mit einer vorteilhaften Prognose in Beziehung gebracht^{15, 16}.

Tabelle 1.2: Prognostische Faktoren für die ALL-Ersterkrankung (nach Ergebnissen der ALL-BFM-Studie^{5, 17})

Klassische Prognoseparameter	Prognose
männliches Geschlecht	ungünstig
Alter <1 Jahr oder >6 Jahre	ungünstig
Leukozytenzahl im Blut >50x10 ⁹ /l	ungünstig
Hepato-, Splenomegalie, mediastinale Masse	ungünstig
ZNS-Beteiligung	ungünstig
Immunphänotyp: pro-B- und prä-B-ALL	ungünstig
Schlechtes Ansprechen auf Prednison-Therapie (≥1000 Blasten/μl am 8.Tag der Therapie)	ungünstig
Kein Ansprechen auf die Therapie am 33.Tag (keine vollständige Remission, d.h. Detektion von Lymphoblasten im Blut oder im Liquor oder >5% Blasten im Knochenmark-Ausstrich)	ungünstig
Molekulargenetisch bestimmte Prognoseparameter	Prognose
Minimale Resterkrankung (MRD) nachweisbar	ungünstig
chromosomale Translokationen t(9;22), t(4;11)	ungünstig
chromosomale Translokation t(12;21), starke Hyperdiploidie	günstig

In die Therapiestratifizierung der ALL-Ersterkrankung gehen im Rahmen der aktuellen ALL-BFM 2000-Studie die Translokationen t(9;22) und t(4;11) als ungünstige prognostische Marker ein. Auch wenn eine Verbindung zwischen Prognose und chromosomalen Veränderungen gezogen werden kann, ist deren Rolle für die Pathogenese der akuten lymphoblastischen Leukämie noch nicht vollständig geklärt. Abbildung 1.1 zeigt die Verteilung der bei der B-Vorläuferzell-ALL (Ersterkrankung) auftretenden chromosomalen Translokationen. Die T-Vorläuferzell-ALL weist ein dazu distinktes Muster an chromosomalen Translokationen auf, das hier angesichts der bei Rezidiven geringen Inzidenz nicht weiter erörtert werden soll.

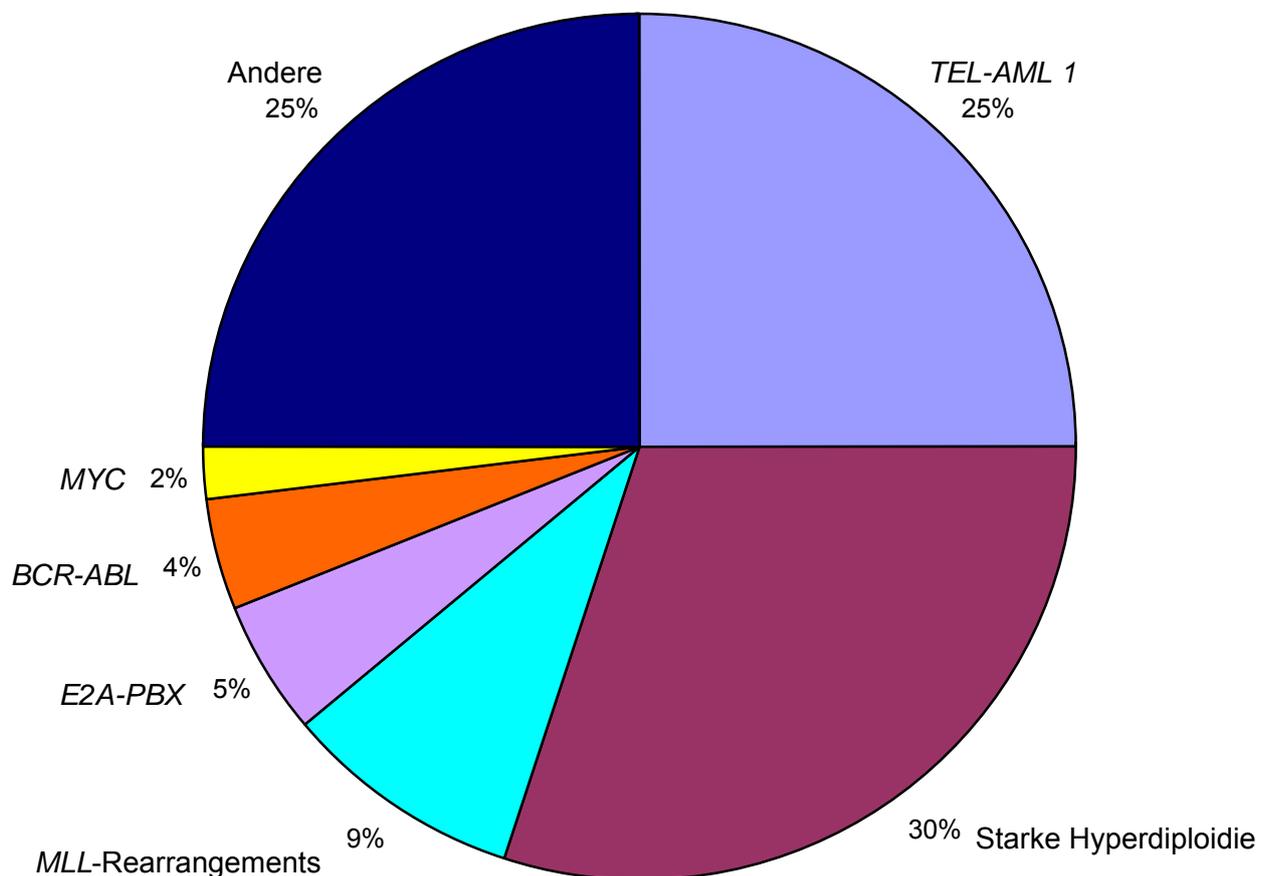


Abbildung 1.1: Prozentuale Verteilung der relevanten chromosomalen Translokationen bei der B-Vorläuferzell-ALL (Ersterkrankung) (entnommen aus¹⁸)

1.1.3 ALL-Rezidive im Kindesalter

Die Therapie der ALL ist mit einer Überlebensrate von über 75 Prozent erfreulich erfolgreich. Dennoch bedeuten diese Zahlen, dass die ALL eine Rezidivquote hat, die der Neuerkrankungsrate anderer onkologischer Erkrankungen in der Pädiatrie, z.B. des Neuroblastoms, sehr nahe kommt. Jedes Jahr erkranken ca. 9 von 10⁶ Kindern an einem ALL-Rezidiv (Daten aus den USA)¹⁹. Die Rezidive zeigen häufig ein schlechteres Ansprechen auf die Therapie, eine niedrigere Remissionsrate und eine erhöhte Zahl an Folgerezidiven.

Nach der Ersterkrankungsbehandlung sind die Patienten in der Rezidivtherapie körperlich und psychisch deutlich weniger belastbar. Zusätzlich bereitet die Resistenz vieler Rezidiv-Leukämiezellen gegenüber den Chemotherapeutika Probleme. Diese Resistenz kann einerseits primär sein, d.h. sie lag bereits zum Zeitpunkt der Erstdiagnose in Subklonen vor, welche dann die Mehrheit der Leukämiezellen im Rezidiv stellen²⁰. Andererseits kann die Resistenz sekundär, d.h. erworben worden sein, gefördert durch den selektiven Druck der Chemotherapie²¹.

Seit etwa drei Jahrzehnten versucht die ALL-REZ BFM-Studiengruppe, die Therapie des ALL-Rezidivs in Deutschland, Österreich und der Schweiz zu optimieren. Die Art und Intensität der Rezidiv-Therapie richtet sich nach der Prognoseeinschätzung.

Zur Risikoabschätzung beim ALL-Rezidiv werden verschiedene prognostische Marker herangezogen. Die Therapiestratifizierung schließt die „klassischen“ Faktoren Zeitpunkt, Ort und Immunphänotyp des Rezidivs ein. Der Zeitpunkt des Auftretens eines ALL-Rezidivs ist ein prognostisch sehr bedeutsamer Faktor. In der ALL-REZ BFM-Studie erfolgt dazu folgende Einteilung²: Ein sehr frühes Rezidiv entsteht noch während der Erstbehandlung innerhalb von 18 Monaten nach der initialen Diagnosestellung. Ein spätes Rezidiv tritt in einem Zeitraum von 6 Monaten nach Beendigung der Ersttherapie und später auf. Ein frühes Rezidiv liegt zwischen diesen beiden Zeitpunkten. Es besteht aus einer gemischten Gruppe, in der sich Patienten befinden, die entweder während oder nach Abschluss der Vortherapie ein Rezidiv erleiden. Sehr frühe und frühe Rezidive sprechen schlechter auf die Therapie an als späte Rezidive, weisen eine kürzere zweite Remissionsdauer und eine niedrigere Überlebensrate auf^{2, 22, 23}. Die späten Rezidive stellen mit 51 Prozent den größten Anteil in dieser Gruppe. Frühe

Rezidive sind mit 33 Prozent, sehr frühe Rezidive mit 16 Prozent vertreten (Angaben aus den ALL-REZ BFM Studien 83-95)².

Der Ort des Rezidivs hat sich ebenfalls als signifikanter Marker für den klinischen Verlauf herausgestellt²: Patienten mit einem isolierten Knochenmark-Rezidiv weisen eine schlechtere Prognose auf als Kinder mit isoliert extramedullärem Rezidiv (z.B. im Hoden oder im zentralen Nervensystem) und auch als Patienten mit kombiniertem Knochenmark-Rezidiv (Befall des Knochenmarks und mindestens eines extramedullären Kompartiments). Isolierte KM-Rezidive bilden die größte Subgruppe mit 58 Prozent. Isoliert extramedulläre Rezidive machen einen Anteil von 18 Prozent aus, Rezidive mit kombiniertem Befall des Knochenmarks und einer extramedullären Lokalisation 24 Prozent².

Hinsichtlich des Immunphänotyps verteilen sich die ALL-Rezidive folgendermaßen auf die verschiedenen Subklassen²: Die B-Vorläuferzell-ALL (mit pro-, prä- und c-ALL) hat einen Anteil von 85 Prozent und stellt damit die größte Subgruppe. Die restlichen 15 Prozent der Rezidive gehören zur Gruppe der T-Zell-ALL (zusammengesetzt aus zwei T-Vorläufer- und der differenzierten T-ALL). Der T-Immunphänotyp wirkt sich sehr negativ auf die Krankheitsprognose des ALL-Rezidivs aus²⁴⁻²⁷. Der Differenzierungsgrad der leukämischen Zelle innerhalb der B- oder T-Zellreihe hat dagegen keine Auswirkungen auf die Prognose des Patienten².

Auf diesen prognostischen Markern Zeitpunkt, Ort und Immunphänotyp des Rezidivs basiert die Risikogruppeneinteilung der ALL-REZ BFM 2002-Studie: Die Patienten werden in vier Strategiegruppen (S1-S4) eingeteilt. S1 ist die Gruppe mit den besten prognostischen Aussichten. Zu der S2-Gruppe gehören Patienten mit einem intermediären Risiko. S3 und S4 werden zusammengefasst zur Gruppe der Hochrisikopatienten (genaue Einteilung der S-Gruppen s. Tabelle 1.3).

Tabelle 1.3: Definition der Strategiegruppen im Protokoll der ALL-REZ BFM 2002-Studie

Lokalisation	Immunphänotyp: non-T			Immunphänotyp: (prä-) T		
	Extramedullär isoliert	KM kombiniert	KM isoliert	Extramedullär isoliert	KM kombiniert	KM isoliert
Zeitpunkt						
sehr früh	S2	S4	S4	S2	S4	S4
früh	S2	S2	S3	S2	S4	S4
spät	S1	S2	S2	S1	S4	S4

Zusätzlich zu den oben genannten Prognosefaktoren wird in der ALL-REZ BFM 2002-Studie die Messung der minimalen Resterkrankung auf molekulargenetischer Ebene als Hilfe bei der Entscheidung eingesetzt, ob S2-Patienten in Remission eine Stammzelltransplantation erhalten sollten^{28, 29}. Patienten mit einem hohen Grad an minimaler Resterkrankung (mehr als 1 Leukämiezelle in 1000 normalen Zellen) haben eine ungünstige Prognose, so dass ihnen deshalb eine Transplantation empfohlen wird.

Prognostisch relevant sind beim ALL-Rezidiv weiterhin genetische Faktoren (translokationsassoziierte Fusionsgene und Hyperdiploidie), wenn auch diese im Regelfall nicht zur Therapiestratifizierung herangezogen werden. Die Verteilung verschiedener genetischer Faktoren beim ALL-Rezidiv ist in Abbildung 1.2 dargestellt (Kirschner-Schwabe et al., persönliche Kommunikation). Die Translokation t(9;22) (*BCR-ABL*) steht beim Rezidiv wie bei der Ersterkrankung für eine schlechte Prognose³⁰. Daher fließt das Vorhandensein dieser Translokation bei der Empfehlung der Stammzelltransplantation für S2-Patienten ein, wenn keine MRD-Messung durchgeführt werden kann. Die Translokation t(12;21) (*TEL-AML1*) ist im Gegensatz dazu dafür bekannt, dass die ALL gut auf die Therapie anspricht und die Patienten sich lange im Stadium der ersten Remission befinden, bevor ein Teil von ihnen erneut ein Rezidiv erleidet³¹. Insgesamt weisen diese Patienten eine bessere Überlebensrate auf als solche, deren Leukämiezellen andere chromosomale Translokationen aufweisen. Nur Patienten mit ALL mit einem stark hyperdiploiden Chromosomensatz (>50, entsprechend einem DNA-Index $\geq 1,16$) zeigen ähnlich positive klinische Verläufe wie

die Patienten mit *TEL-AML1* positiven Leukämiezellen (Kirschner-Schwabe et al., persönliche Kommunikation).

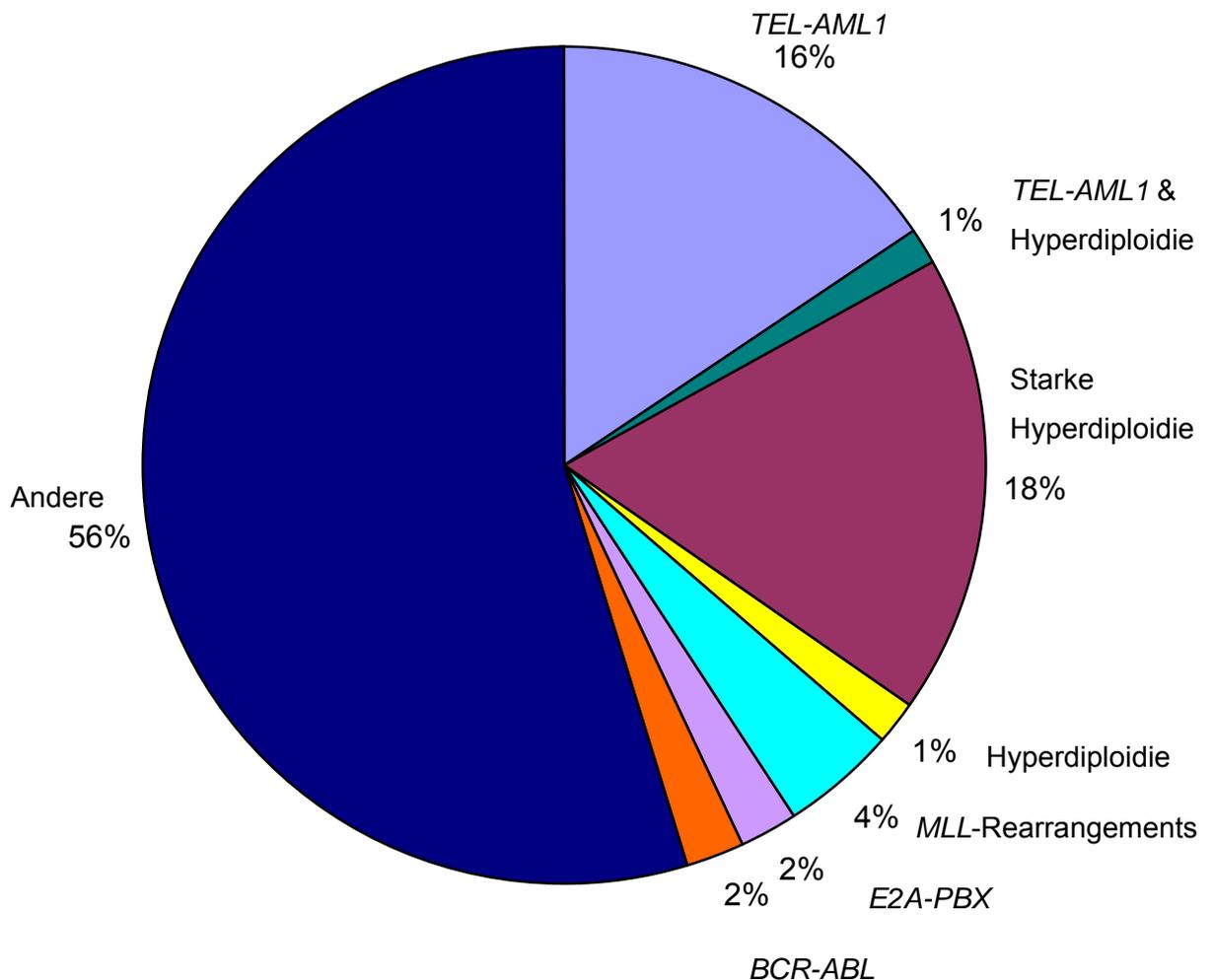


Abbildung 1.2: Prozentuale Verteilung von bekannten genetischen Aberrationen bei isolierten und kombinierten B-Vorläuferzell-ALL-Rezidiven des Knochenmarks innerhalb der ALL-REZ BFM 2002-Studie (Kirschner-Schwabe et al., persönliche Kommunikation)

Die Prognose von Kindern mit ALL-Rezidiven konnte durch die konsekutiven ALL-REZ BFM-Therapieoptimierungsstudien erheblich verbessert werden. Die Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens der Rezidivpatienten konnte von 30 auf 40 Prozent

gesteigert werden^{32, 33}. Diese Ergebnisse, die trotz risikoadaptierter Therapie in den vergangenen Jahren nur noch geringfügig verändert werden konnten, sind jedoch nicht abschließend zufrieden stellend. So wird in vielerlei Ansätzen versucht, die molekulargenetischen Grundlagen der ALL weiter zu erforschen und darauf aufbauend neue Wege für besser wirksame Therapien zu entwickeln.

1.2 Tumorprotein 53 (TP53)

1.2.1 Tumorsuppressorgen TP53

Im Jahr 1979 wurde ein zelluläres Protein identifiziert, das in Simian Virus (SV) 40-transformierten Zellen einen Komplex mit dem großen Tumorantigen des SV 40-Virus bildete^{34, 35}. In den darauf folgenden Jahren wurden diesem Protein mit dem Namen p53 zunächst onkogene Eigenschaften zugesprochen angesichts der Tatsache, dass es in Zellkulturen zu Immortalisierung und Transformation führen konnte^{36, 37}. Auf der anderen Seite wurde beobachtet, dass sich Zellen bei einem Verlust der p53-Expression und -Funktion ebenfalls in Richtung Transformation bewegten^{38, 39}. Diese Widersprüche lösten sich durch die Erkenntnis auf, dass die onkogenen Eigenschaften von p53 darauf beruhten, dass die in frühen Experimenten als Originalsequenz benutzte cDNA dominant-negative sinnverändernde Mutationen enthielt. Die zu Anfang erhaltenen Forschungsergebnisse wurden also mit mutiertem p53 erzielt.

Das für das Protein kodierende Gen *TP53* (*Tumorprotein 53* oder auch kurz *P53*) ist in über 50 Prozent aller Tumorerkrankungen mutiert und ist damit das am häufigsten mutierte Gen bei onkologischen Erkrankungen⁴⁰. Diese Tatsache verdeutlicht, dass das nicht mutierte *TP53*-Gen eine wichtige Funktion in der Unterdrückung der Tumorentstehung haben muss.

Es gibt zwei Gruppen von Genen, die in der Tumorentstehung eine herausragende Rolle spielen: Tumorsuppressorgene und Onkogene. Letztere sind Gene, deren Produkte bei normaler Aktivität zumeist die Proliferation der Zelle bewirken (dann als Proto-Onkogene bezeichnet). Sie sorgen z.B. für den kontinuierlichen Austausch und die ständig neue Bereitstellung von Zellen der Haut, des Gastrointestinaltrakts und des Bluts. Werden sie durch Amplifikation, Mutation oder chromosomale Translokation zu einem Onkogen aktiviert (engl. *gain of function*, Funktionszugewinn), kann dies ein gesteigertes Zellwachstum zur Folge haben. Da es sich zumeist um dominante

Mutationen handelt, genügt oft eine heterozygote Mutation (ein Allel mutiert, ein Allel Wildtyp), um den Phänotyp der Zelle in Richtung Tumorzelle zu verändern. Beispiele für Onkogene sind *RAS* und *MYC*⁴¹.

Im Gegensatz dazu sind Tumorsuppressorgene und ihre Produkte im normalen Zustand für die Kontrolle und Unterdrückung des Zellwachstums zuständig. Mutationen führen zum Verlust dieser Kontrollfunktion und damit zum ungebremsten Wachstum der Zelle. Häufig sind diese Mutationen rezessiv, und die Zelle entartet erst dann, wenn das zweite Allel des Gens ebenfalls inaktiviert wird, zum Beispiel durch Deletion. So ein Verlust der Heterozygotie (engl. *loss of heterozygosity*, LOH) findet sich in vielen Tumoren zusammen mit der Mutation des Tumorsuppressorgens⁴¹.

TP53 zählt zur Gruppe der Tumorsuppressorgene. Um die Konsequenzen einer Mutation des *TP53*-Gens genauer nachvollziehen zu können, soll zunächst seine Struktur und darauf aufbauend die Funktionsweise des p53-Proteins erklärt werden. Danach wird auf *TP53*-Mutationen im Einzelnen eingegangen und ihre Verbindung zur neoplastischen Entartung von Zellen aufgezeigt.

1.2.2 Struktur

Das *TP53*-Gen liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17 (17p13.1). Es verteilt sich auf über 20 kb und enthält 11 Exons und 10 Introns⁴². Von den 11 Exons kodieren nur Exon 2 bis 11 für das p53-Protein.

Das vom *TP53*-Gen kodierte Protein wird als p53 bezeichnet und besteht aus 393 Aminosäuren, die in verschiedene funktionelle Domänen eingeteilt werden können: Die Aminosäuren 1-42 bilden den N-Terminus des Proteins und zeigen transaktivierende Eigenschaften⁴³. Durch die Interaktion dieser Domäne mit basalen Transkriptionsfaktoren kann p53 (nach Bindung der zentralen Domäne an Promoterregionen der entsprechenden Zielgene, s.u.) eine Transkription ermöglichen. An den N-Terminus anschließend findet sich zwischen den Aminosäuren 63-97 eine Prolin-reiche Region, die über die Bindung an SH3-Domänen anderer Proteine eine Rolle in der Signaltransduktion der Wachstumsregulation zu spielen scheint⁴⁴.

Die zentrale Domäne von p53 (engl. *core domain*) befindet sich an den Aminosäurepositionen 102-292⁴⁵. Sie ist für die sequenzspezifische Bindung zwischen p53 und der Ziel-DNA zuständig⁴⁶. Die DNA-Bindungs-Domäne weist eine kompliziert

gefaltete Konformation auf⁴⁵. Diese besteht aus einer β -Sandwich-Struktur als Rückgrat und einem so genannten Schleife-Faltblatt-Helix-Motiv für die Interaktion mit der DNA⁴⁷.

An die zentrale Domäne schließt sich über einen flexiblen Aminosäurerest die Oligomerisierungsdomäne an (Aminosäure 323-356). p53 liegt in Lösung als hochsymmetrisches Tetramer vor⁴⁸ und kann seine Funktion als transkriptioneller Aktivator und Wachstumssuppressor in vivo nur in dieser Konformation erfüllen⁴⁹. Eine zusätzliche funktionelle Domäne ist zwischen den Aminosäuren 363-393 am C-Terminus des Proteins lokalisiert. Sie fungiert als negativer Regulator der sequenzspezifischen p53-DNA-Bindung⁵⁰. In der C-terminalen Region des Proteins sind zusätzlich drei Signale zu finden, die für die Lokalisation von p53 im Kern zuständig sind (Kernlokalisierungssignale)⁵¹.

Jedwede Interaktion des C-Terminus mit einer anderen Region des p53-Tetramers bewirkt, dass das Molekül in einem inaktiven Zustand vorliegt und keine DNA binden kann (negative Regulation). Eine Aktivierung ist möglich durch Phosphorylierung⁵², Acetylierung⁵³, Glykosylierung⁵⁴ und proteolytische Entfernung⁵⁵ der C-terminalen Region. Es wird angenommen, dass diese posttranslationalen Modifikationen durch eine Konformationsänderung des Proteins aktivierend wirken. Die Abbildung 1.3 fasst die vorherigen Ausführungen zusammen.

Das Protein p53 verfügt über fünf in der Evolution hochkonservierte Regionen (I-V), die eine Sequenzhomologie von bis zu 90 Prozent zwischen verschiedenen Spezies (Mensch, Maus, Froscharten) aufweisen⁵⁶. Interessanterweise sind in der DNA-Bindungs-Domäne, die eine zentrale Aufgabe für das Protein erfüllt, vier der fünf evolutionär konservierten Regionen zu finden⁵⁶.

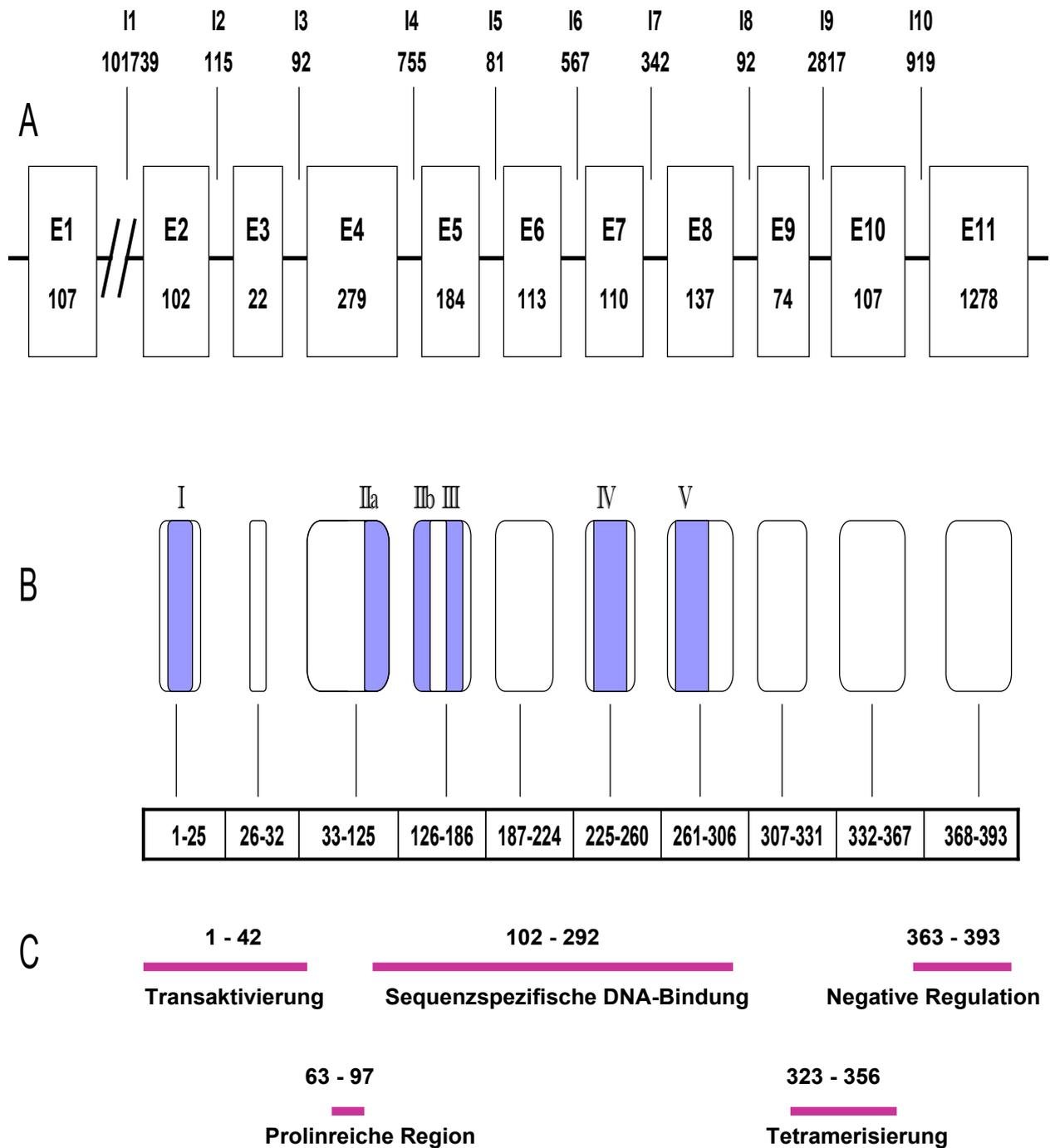


Abbildung 1.3: Struktur und Aufbau des TP53-Gens und des p53-Proteins mit Funktionen der verschiedenen Proteinteile

A: TP53-Gen mit Exons (E1-11) und Introns (I1-10) und der Angabe der zugehörigen Anzahl von Basenpaaren unterhalb der Exon/Intron-Nummer

B: p53-Protein mit den Aminosäure-Residuen, die jeweils vom in A angegebenen Exon kodiert werden; bei den bläulich unterlegten Abschnitte handelt es sich um die hoch konservierten Regionen I-V

C: Funktionelle Aufgaben der verschiedenen Proteinteile, mit den zugehörigen Aminosäure-Nummern gekennzeichnet

1.2.3 Funktion

Das p53-Protein besitzt die Funktion eines transkriptionellen Aktivators. p53 wird als „Wächter des Genoms“ bezeichnet, da es an vielen zentralen Überwachungsstellen für die genomische Integrität beteiligt ist⁵⁷. So ist es in die Zellzyklus-Inhibierung, DNA-Reparatur, Apoptose, Zelldifferenzierung und zelluläre Alterung involviert. Diese Funktionen erfüllt es über verschiedenartige Signalwege. So ermöglicht p53 die Reparatur und das Überleben beschädigter Zellen ebenso wie die Eliminierung zu stark beschädigter Zellen. Auf diese Weise schützt es den Organismus vor der Vervielfältigung fehlerhafter Erbinformation.

1.2.3.1 Signale zur Aktivierung von p53

p53 kann durch vielfältige Stress-Signale aktiviert werden. Alle diese Signale beeinflussen das zelluläre Gleichgewicht und haben Auswirkungen auf die Kontrolle von DNA-Replikation, Chromosomen-Trennung und Zellteilung⁵⁸.

Ein wichtiger Auslöser sind DNA-Schäden in der Zelle, die u.a. durch UV- oder Gamma-Strahlung, Basenalkylierung, Depurinierung von DNA oder Reaktion mit freien Sauerstoff-Radikalen entstehen können. Jeder dieser Schäden ist anders, wird von einer distinkten Proteinkaskade wahrgenommen und hat andere Auswirkungen auf die Reparaturmechanismen der Zelle. Sie münden jedoch alle bei p53⁵⁹.

Weitere Aktivatoren der p53-Signalkaskade sind zelluläre Mangelzustände wie Hypoxie, Glukose-Mangel und Entleerung der Ribosenukleotidtriphosphat-Speicher sowie die Expression von Onkogenen, thermische Schockzustände (Hitze als auch Kälte), Stickstoffoxid-Detektion und die Beschädigung der Mitosespindel⁵⁹.

Als Reaktion auf das erste Stress-Signal wird abhängig von der Art der Schädigung eine Aktivierungskette gestartet, an deren Ende die Stabilisierung von p53 und eine Hemmung seines Abbaus stehen. Noch ist nicht gesichert, ob dies nur auf dem Wege der posttranslationalen Modifikation von p53 stattfindet⁶⁰ oder ob es andere, bis jetzt unbekannte p53-Aktivierungsmechanismen gibt. Es wurde festgestellt, dass auch p53-Moleküle, die an den Modifikationsstellen eine Mutation aufweisen, in den aktivierten Zustand wechseln können.

1.2.3.2 Aktivierung und Abbau von p53

Aktivierung von p53 bedeutet, dass die Konzentration des Proteins in der Zelle ansteigt und seine Aktivität in Bezug auf die Aktivierung der Transkription bestimmter Zielgene mit p53-DNA-Antwort-Elementen gesteigert ist. p53 liegt in Zellen normalerweise in sehr niedriger oder nicht nachweisbarer Konzentration vor, da es eine äußerst kurze Halbwertszeit von 6 bis 20 Minuten hat. Diese Halbwertszeit kommt vor allem durch die Interaktion von p53 mit einem anderen zellulären Protein namens Mouse double minute 2 (Mdm2) zustande⁶¹: Das aktivierte p53 bindet an Mdm2. Dieses funktioniert u.a. als Ubiquitin-Ligase und bewirkt, dass kleine Peptide (Ubiquitin) an das Zielprotein angeheftet werden. Das ubiquitinierte p53 wird daraufhin aus dem Nukleus heraustransportiert und dem zytoplasmatischen Proteasom zugeführt. Die Ubiquitin-Kette fungiert als „Erkennungsflagge“ für das Proteasom, das so das Protein erkennen und lysieren kann. Mdm2 initiiert auf diese Weise den proteolytischen Abbau von p53⁶². Eine weitere Aufgabe von Mdm2 liegt in der Bindung an die Mdm2-Bindungsstelle am Aminoterminus des p53-Proteins. Damit blockiert Mdm2 die Interaktion von p53 mit der transkriptionellen Maschinerie der Zelle⁶³. Soll p53 stabilisiert werden, muss dementsprechend eine Inhibierung der Mdm2-Funktion (z.B. durch p53-Phosphorylierung oder Interaktion zwischen p14^{ARF} und Mdm2) stattfinden.

1.2.3.3 Effekte von p53 in der Zelle

Die Reaktion von p53 auf eine DNA-Schädigung lässt sich stark vereinfacht folgendermaßen beschreiben: Werden Schäden an der DNA festgestellt, so wird p53 aktiviert und hält die Zelle so lange im Zellzyklus fest (Zellzyklus-Inhibition), bis der Schaden repariert worden ist (DNA-Reparatur). Weist die DNA einen zu hohen Schädigungsgrad auf, induziert p53 den programmierten Selbstmord der Zelle (Apoptose)⁶⁴.

p53 moduliert DNA-Reparatur-Prozesse (wie die Nukleotidexzisionreparatur, Basenexzisionsreparatur, nichthomologes Endjoining und homologe Rekombination) sowohl über transkriptionelle Aktivierung als auch über transkriptionsunabhängige Mechanismen⁶⁵. *P48* und *P53R2* sind Beispiele für von p53 induzierte Gene, die in die DNA-Reparatur helfend eingreifen⁵⁹.

Die DNA-Reparatur (ob nun p53-abhängig oder -unabhängig) würde nicht viel Sinn machen, wenn die beschädigten Zellen den Zellzyklus weiter durchlaufen würden und die defekte DNA repliziert würde. p53 stimuliert das Protein p21^{WAF1/CIP1} und vermittelt so einen Zellzyklusblock. p21^{WAF1/CIP1} ist ein effektiver Inhibitor der cyclinabhängigen Kinasen (engl. *cyclin-dependent kinases*, CDKs), die zu den Hauptregulatoren des Zellzyklus gehören und für das Fortschreiten der Zelle durch die verschiedenen Phasen des Zellzyklus verantwortlich sind. Indem p21^{WAF1/CIP1} die CDKs blockiert, bewirkt es einen Zellzyklusstop sowohl am Übergang von der G1- in die S-Phase als auch zwischen G2- und M-Phase⁵⁸. Andere von p53 aktivierte Effektoren bei der Zellzyklus-Inhibition sind Reprimo⁶⁶ und 14-3-3 σ ⁶⁷, die die Zelle in der G2-Phase festhalten können.

Je nach Signalstärke und Ausmaß der Zellschäden kann p53 die programmierte Selbstzerstörung der Zelle bewirken. Für die Apoptose-Induktion stehen verschiedene Mediatoren zur Verfügung⁶⁸: Die Proteine Bax, PUMA und NOXA erfüllen ihre proapoptotische Funktion über die Induktion mitochondrialer Cytochrom C-Freisetzung⁶⁴. Zytoplasmatisches Cytochrom C initiiert im Zusammenspiel mit anderen Proteinen (z.B. dem ebenfalls von p53 induzierten APAF1) die Caspase-Kaskade, einen zur Apoptose führenden intrinsischen Signalweg. Für den extrinsischen Apoptosemechanismus induziert p53 u.a. die Expression des Fas- und des Killer/DR5-Rezeptors. Beide gehören zur Gruppe der Todesrezeptoren und induzieren über die Caspase-Kaskade⁶⁹ den Zelltod.

Abbildung 1.4 fasst die Aktivierungswege und Funktionen des p53-Proteins bildlich zusammen.

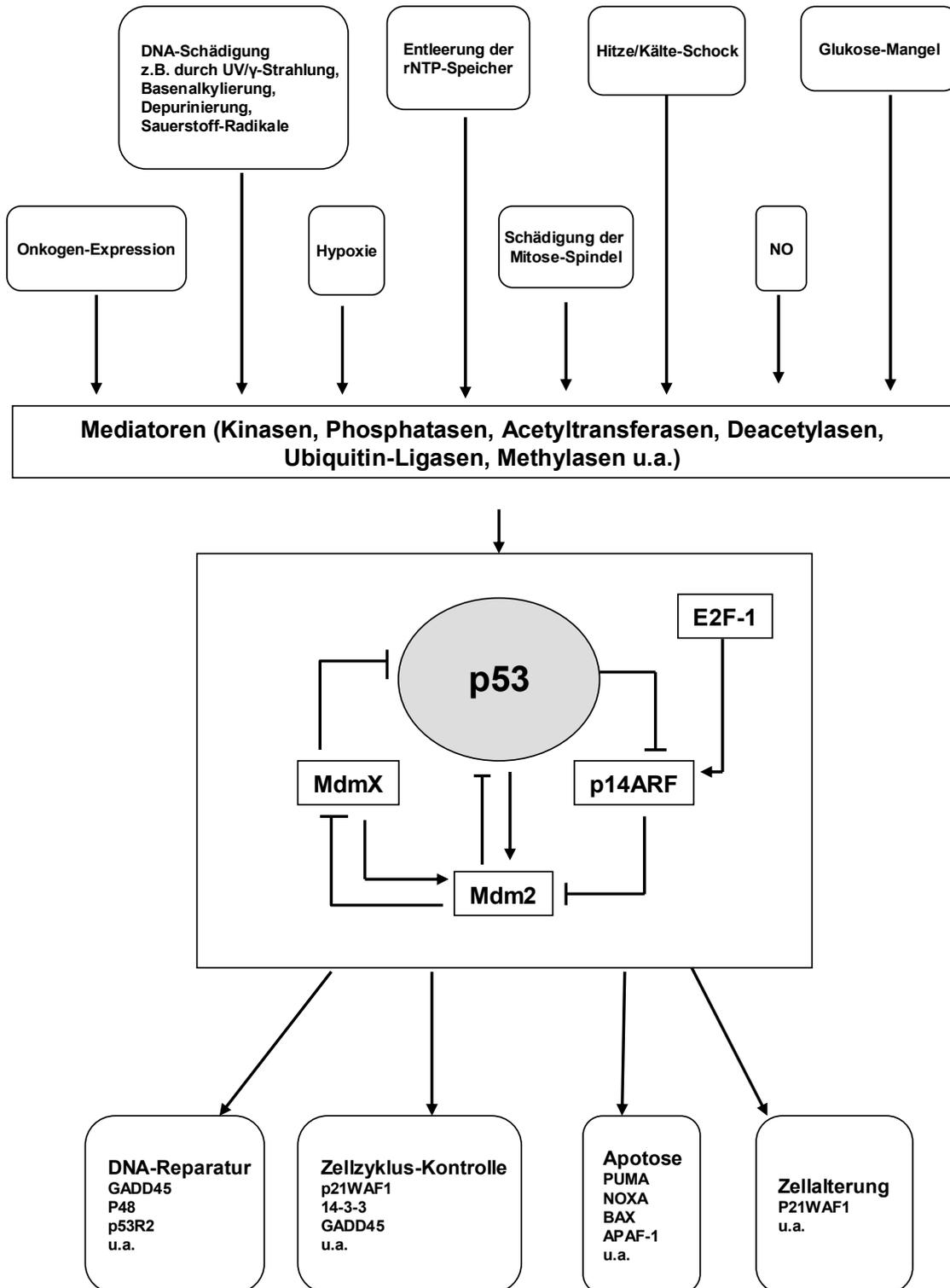


Abbildung 1.4: Das p53-Netzwerk in der Übersicht: Aktivierende Signale, Kernregulation und Effektoren (modifiziert nach ^{59, 64})

Inhibierende Effekte sind durch das Symbol ⊥ gekennzeichnet, aktivierende Effekte durch einen Pfeil →.

1.2.4 Mutationen von *TP53* und ihre Rolle bei der Entstehung und Progression maligner Erkrankungen

TP53 wird v. a. durch sinnverändernde (engl. *missense*) Punkt-Mutationen in seiner Funktion beeinträchtigt. Diese können auf Proteinebene zu einem Aminosäureaustausch mit einem in seinen Eigenschaften veränderten Protein p53 führen. Der Großteil (ca. 97 Prozent) aller bekannten *TP53*-Mutationen liegt in der Region, die für die DNA-Bindungs-Domäne kodiert, besonders in den evolutionär konservierten Bereichen⁷⁰. Eine Häufigkeitsverteilung aller bis jetzt bekannten Mutationen zeigt Abbildung 1.5.

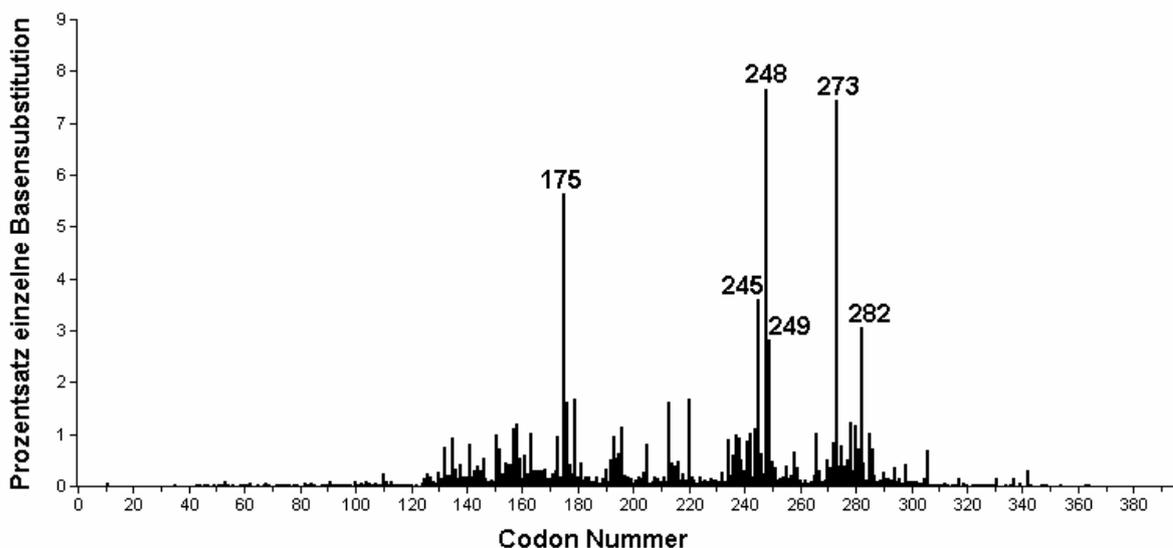


Abbildung 1.5: Häufigkeitsverteilung aller bekannten p53-Mutationen mit verschiedenen Hot Spot-Mutationen (Quelle: IARC TP53 Mutation Database, R11, Oktober 2006⁷⁰)

TP53-Mutationen bilden hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf das p53-Protein und auf die Zelle keine einheitliche Gruppe. In zahlreichen Hefe- und Zelllinien-Assays hat sich das Verhalten verschieden mutierter p53-Proteine als sehr heterogen herausgestellt (für

einen Überblick: Funktionsanalyse in der IARC-Datenbank⁷⁰): Jede Mutation hat ihr eigenes Profil mit sehr distinktem Verhaltenmuster.

TP53-Mutationen können hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die Proteinfunktion in verschiedene Klassen eingeteilt werden⁴⁷: Klasse I-Mutationen finden sich an Stellen, die in direkten Kontakt mit der DNA-Oberfläche treten. Veränderungen in dieser Region führen zum Verlust der Protein-DNA-Bindung. Klasse II-Mutationen betreffen Aminosäure-Residuen, die für die stabile Faltung der zentralen Domäne unentbehrlich sind. Ein Verlust der DNA-Bindung durch diese Mutanten kann strukturellen Defekten des Proteins zugeschrieben werden. Man vermutet, dass es hierbei zu ungefalteten Sekundär- und Tertiär-Strukturen kommt. In Klasse III werden so genannte Null-Mutationen zusammengefasst, die die Funktionalität des Proteins vollständig zerstören. Dies kann durch Insertionen oder Deletionen (mit Leserasterverschiebung) ebenso geschehen wie durch *nonsense*- oder *splice junction*-Mutationen.

Im Falle einer Mutation des *TP53*-Gens wurde lange Zeit vermutet, dass ihre Auswirkungen auf die Zelle allein durch den Verlust der Tumorsuppressor-Funktion zustande kommen. Am nahe liegendsten schien der Rückschluss, dass durch den Wegfall der verschiedenen Kontrollfunktionen des p53 die ungehemmte Proliferation von Zellen möglich wird. Aus dem Wegfall der Inhibierung des Zellzyklus bei Schädigung der Zelle resultiert eine genetische Instabilität, die eine tumoröse Entartung von Zellen wahrscheinlicher macht⁷¹. Von den meisten *TP53*-Mutationen weiß man, dass durch sie die Aktivierung von Zielgenen gestört ist, so dass nach DNA-Schädigung keine Zellzyklus-Inhibierung, Apoptose oder Seneszenz erfolgt.

Die „*two-hit*“-Hypothese von Knudson, nach der ein Tumor erst nach Auftreten von genetischen Aberrationen auf beiden Allelen (z.B. zwei Mutationen oder eine Mutation und ein deletiertes Allel) entsteht, wurde lange Zeit für alle Tumorsuppressorgene als valide angesehen (Beispiel: Retinoblastom-Gen)⁷². Im Falle des p53 hat sich diese Sichtweise inzwischen verändert: Es wird zwar in vielen Tumorentitäten ein *loss of heterozygosity* eines *TP53*-Allels gefunden^{73, 74}. Dies scheint jedoch für den Verlust der p53-Funktion nicht zwingend notwendig zu sein. Man vermutet, dass mutiertes p53 einen dominant-negativen Effekt auf Wildtyp-p53 ausüben kann, d.h. noch vorhandenes Wildtyp-Protein wird durch das mutierte p53 inhibiert. Dies kann dadurch entstehen, dass das mutierte Protein einen Oligomerkomplex mit Wildtyp-p53 bildet. So kann ein mutiertes p53-Molekül in der Tetramer-Konstellation drei Wildtyp-Moleküle blockieren⁷⁵.

⁷⁶. Eine weitere Hypothese sieht *TP53* als haploinsuffizientes Gen: Dies bedeutet, dass ein vorhandenes Wildtyp-Allel des Gens nichts ausreicht, um seine komplette Funktionalität zu erhalten⁷⁷. Das vorhandene Wildtyp-Allel kann die Entstehung eines Tumors verzögern, aber nicht verhindern⁷⁸.

Inzwischen ist bekannt, dass *TP53*-Mutationen (jedenfalls teilweise) auch durch einen Funktionszugewinn gekennzeichnet sind. So konnte in Studien festgestellt werden, dass mutiertes p53 in vitro antiapoptotische Aktivität entfalten⁷⁹ und für eine erhöhte Therapie-Resistenz verantwortlich sein kann⁸⁰. In vivo wurden eine erhöhte Tumorigenität und Invasivität beobachtet^{81, 82}.

Keimbahnmutationen von *TP53* bilden die molekulargenetische Grundlage für das Li-Fraumeni Syndrom. Diese autosomal-dominant vererbte Erkrankung kann mit multiplen Tumoren in einem Individuum einhergehen und ist durch ein frühes (vor dem 45. Lebensjahr) und gehäuftes Auftreten von Krebserkrankungen innerhalb der betroffenen Familien gekennzeichnet. Typische Tumorentitäten des Syndroms sind Weichteil- und Osteosarkom, Mammakarzinom, Hirntumoren und das adrenokortikale Karzinom im Kindesalter (für einen Überblick über das Li-Fraumeni Syndrom s.⁸³).

1.3 *TP53*-Mutationen bei der ALL im Kindesalter

1.3.1 *TP53*-Mutationen bei der ALL-Ersterkrankung

In soliden Tumoren haben *TP53*-Mutationen eine große Bedeutung: Kolon-, Bronchial- und Mammakarzinome weisen diese Art von genetischer Veränderung in großer Zahl auf. Kolonkarzinome zeigen eine *TP53*-Mutationsrate von ungefähr 45 Prozent, wobei bei chemotherapeutischer Behandlung das Vorhandensein der Mutationen mit einer hohen *non response*-Rate auf die Therapie verbunden ist⁸⁴. In Bronchialkarzinomen finden sich *TP53*-Mutationen abhängig von ihrer Histologie in 50 bis 70 Prozent der Fälle. Diese Tumoren sprechen ebenfalls schlechter auf die Chemotherapie an als Bronchialkarzinome ohne *TP53*-Mutation⁸⁵. In Karzinomen der Mamma besteht der größte Teil der gefundenen genetischen Veränderungen aus Mutationen des *TP53*-Gens (30 Prozent)⁸⁶, deren Auftreten hier mit einer erhöhten Proliferationsrate und so mit einer ungünstigen Prognose verbunden ist⁸⁷.

Bei malignen hämatologischen Erkrankungen sind Mutationen des *TP53*-Gens wesentlich seltener⁸⁸. Nichtsdestotrotz wurde bei einigen dieser Erkrankungen (u.a. bei

der akuten myeloischen Leukämie, dem myelodysplastischen Syndrom und der chronischen myeloischen Leukämie) eine starke Korrelation zwischen einer *TP53*-Mutation einerseits und einer schlechten Prognose und Resistenz gegenüber Chemotherapeutika andererseits gefunden⁸⁹. Inwiefern *TP53*-Mutationen in der akuten lymphoblastischen Leukämie und ihrem Rezidiv präsent sind, soll in den folgenden Absätzen erläutert werden.

Zwischen 1991 und 2003 sind mindestens 20 Studien durchgeführt worden, die Mutationen des *TP53*-Gens bei der Ersterkrankung der ALL untersuchen. Greift man aus dieser Masse nur die Studien heraus, die ein Kollektiv von mehr als 25 ALL-Patienten umfassen⁹⁰⁻⁹⁹, und berechnet aus deren Ergebnissen eine durchschnittliche Mutationsrate, so erhält man einen prozentualen Anteil von 5 Prozent (36 Mutationen/693 Patienten). Diese Ergebnisse spiegeln die geringe Prävalenz von *TP53*-Mutationen bei der Ersterkrankung der ALL wider.

1.3.2 *TP53*-Mutationen bei ALL-Rezidiven

Da *TP53*-Mutationen bei anderen Krebserkrankungen im Zusammenhang mit einer Progression des Tumors stehen, wird seit längerer Zeit vermutet, dass sie im Verlauf der ALL auftreten und so mitverantwortlich sind für die Entstehung eines ALL-Rezidivs. Dies würde bedeuten, dass *TP53*-Mutationen beim ALL-Rezidiv häufiger auftreten müssten als bei der Ersterkrankung.

Die vergangenen Jahre haben zahlreiche Studien zu diesem Thema hervorgebracht^{91, 92, 94, 96, 100-107}. Problematisch an allen diesen Studien ist jedoch, dass keine von ihnen ein für ALL-Rezidive repräsentatives Patientenkollektiv zusammenstellen konnte. Nur vier Studien weisen überhaupt eine Patientenzahl von über 25 Patienten auf^{91, 92, 94, 106}. Die höchste Patientenzahl einer Studie beläuft sich auf 51⁹².

Des Weiteren kommen die Studien zu deutlich unterschiedlichen Ergebnissen hinsichtlich der *TP53*-Mutationshäufigkeit bei ALL-Rezidiven: Die Prozentzahlen variieren zwischen 0 Prozent¹⁰¹ und 33 Prozent^{94, 100, 104}, können jedoch schwerlich miteinander in Beziehung gesetzt werden, da nicht miteinander vergleichbare Subkollektive untersucht wurden.

In einigen Studien wird der Verdacht geäußert, dass *TP53*-Mutationen mit einer schlechteren Prognose und einer verkürzten Remissions- und Überlebensdauer

korrelieren^{16, 91, 92, 96, 104}. Statistisch signifikant sind diese Aussagen jedoch nicht. Trotz dieses unsicheren Forschungsstandes herrscht die Meinung vor, dass *TP53*-Mutationen beim ALL-Rezidiv häufiger auftreten als bei der Ersterkrankung und mit einem schlechten klinischen Verlauf bzw. Therapieergebnis verbunden sind^{108, 109}.

Eine Arbeit von Kirschner-Schwabe et al.¹¹⁰ bringt einen weiteren Punkt in die Diskussion mit ein: Es konnte gezeigt werden, dass sehr frühe ALL-Rezidive, die mit einer besonders schlechten Prognose (s. Kapitel 1.1.3) assoziiert sind, verstärkt späte Zellzyklusgene exprimieren. Dies konnte mit einem erhöhten Anteil von Zellen in der S- und G2/M-Phase korreliert werden. Die Vermutung liegt nahe, dass *TP53*-Mutationen, wie z.B. bei Mammakarzinomen gezeigt⁸⁷, für diese erhöhte proliferative Kapazität verantwortlich sind. Dies lässt den Rückschluss zu, dass Mutationen im *TP53*-Gen gehäuft bei sehr frühen Rezidiven vorliegen könnten.

2 Zielsetzung

Mutationen des Tumorsuppressorgens *TP53* treten in über 50 Prozent aller onkologischen Erkrankungen auf und sind insbesondere bei soliden Tumoren häufig. Sie sind in vielen Fällen mit einer Verschlechterung des klinischen Verlaufs, einem schlechteren Ansprechen auf die Chemotherapie und einer verringerten Überlebenswahrscheinlichkeit assoziiert.

Bei der Ersterkrankung der ALL im Kindesalter sind *TP53*-Mutationen eher selten. Beim ALL-Rezidiv im Kindesalter wird dagegen allgemein angenommen, dass die *TP53*-Mutationsrate erhöht und mit einer ungünstigen Prognose sowie einem schlechten Therapieergebnis der Patienten korreliert ist. Tatsächlich zeigen die zugrunde liegenden Studien jedoch heterogene Ergebnisse, die aufgrund kleiner, inhomogener Patientenkollektive häufig statistisch nicht gesichert sind.

In der vorliegenden Arbeit soll daher an einem großen, repräsentativen Kollektiv von Patienten geprüft werden, wie häufig *TP53*-Mutationen beim ALL-Rezidiv tatsächlich auftreten und ob sie mit bestimmten biologischen Charakteristika des Rezidivs sowie einer bestimmten Prognose und dem Überleben der Patienten assoziiert sind. Angeregt wurde diese Fragestellung durch eine Arbeit von Kirschner-Schwabe et al.¹¹⁰, die zeigte, dass prognostisch ungünstige, sehr früh nach der Erstdiagnose auftretende ALL-Rezidive durch eine erhöhte proliferative Kapazität der leukämischen Blasten gekennzeichnet sind. Da p53 ein wichtiger Bestandteil der Zellzykluskontrolle ist und eine Beeinträchtigung seiner Funktion durch Mutation eine unkontrollierte Proliferation der Zellen zur Folge haben kann, soll ein möglicher Zusammenhang mit *TP53*-Mutationen untersucht werden.

Im Speziellen sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Wie hoch ist die Inzidenz von *TP53*-Mutationen in Leukämiezellen von Kindern mit ALL-Erstrezidiv, und zu welchem Zeitpunkt der Erkrankung (Ersterkrankung, Rezidiv, Remission) sind die Mutationen nachweisbar?
2. Gibt es Zusammenhänge zwischen dem Auftreten von *TP53*-Mutationen und bekannten prognostischen und genetischen Faktoren, sowie dem Therapieergebnis?
3. Korrelieren *TP53*-Mutationen mit einer erhöhten proliferativen Kapazität der leukämischen Blasten beim ALL-Rezidiv?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Patientenproben

Für die Auswahl der Patientenproben wurden zunächst alle Kinder und Jugendlichen zwischen 0 und 18 Jahren erfasst, die in der Zeit zwischen März 2002 und November 2005 die Diagnose „Erstrezidiv einer ALL“ erhielten und in der ALL-REZ BFM 2002-Studie registriert wurden. Proben von Patienten mit isoliert extramedullärem Rezidiv wurden hierbei ausgeschlossen. Bei ihnen sind keine oder nicht genügend leukämische Blasten im Knochenmark vorhanden, und nur in Einzelfällen stehen Proben aus dem extramedullären Kompartiment für die Untersuchungen zur Verfügung. Anschliessend wurden aus diesem Kollektiv jene Patienten ausgewählt, für die alle molekulargenetischen Begleituntersuchungen der ALL-REZ BFM Studie (Nachweis translokationsassoziiertes Fusionsgene und durchflusszytometrische Messung des DNA-Gehalts) durchgeführt wurden. Schlussendlich wurden alle Patienten, von denen genügend DNA für die Mutationsanalyse vorhanden war, in die Untersuchung eingeschlossen (n=116).

In 95 der untersuchten Proben lag der Anteil leukämischer Blasten im Knochenmark zwischen 60 und 99 Prozent, 11 Proben wiesen unter 60 Prozent Knochenmark-Blasten auf (zwischen 6 und 58 Prozent). Bei 10 Patienten lagen keine Informationen über den Anteil leukämischer Blasten im Knochenmark vor.

Bei sechs Patienten wurde zusätzlich Knochenmark von der ALL-Ersterkrankung zum Zeitpunkt der Diagnosestellung untersucht. Der Anteil leukämischer Blasten im Nativmaterial war bei diesen Proben unbekannt. Von einem Patienten stand nur ein Knochenmark-Ausstrich vom Diagnosezeitpunkt der Ersterkrankung zur Verfügung. Das davon abgelöste Material wurde als Grundlage für die Sequenzierung verwendet.

Von acht Patienten wurde Knochenmark, entnommen im Stadium der Remission, analysiert. In diesen Proben konnte kein oder nur ein geringfügiger Anteil an leukämischen Blasten (bis 7 Prozent) mit morphologischen Methoden nachgewiesen werden.

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Agarose SERVA	SERVA, Heidelberg, D
Ampli Taq DNA Polymerase (5U/μl)	Applied Biosystems, Foster City, USA
BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, s. o.
BigDye Terminator v1.1, v3.1 5x Sequencing Buffer	Applied Biosystems, s. o.
Biocoll Separating Solution (Ficoll Separating Solution)	Biochrom AG, Berlin, D
Ethanol	Merck, Darmstadt, D
Ethidiumbromid (1%ige Lösung in Wasser)	Merck, s. o.
Hi-Di Formamide	Applied Biosystems, s. o.
HPLC analyzed H ₂ O	Mallinckrodt Baker, Deventer, NL
100 bp DNA Ladder (1,0μg/μl)	Invitrogen, Karlsruhe, D
LSI TP53 Spectrum Orange Sonde	Vysis Inc., London, UK
NucleoSEQ Kit	Macherey-Nagel, Düren, D
Nukleotide: dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Invitrogen, s. o.
Oligonukleotide (Primer)	TIB Molbiol, Berlin, D
PBS-Dulbecco (1x)	Biochrom, s. o.
POP-6 (Performance Optimized Polymer 6)	Applied Biosystems, s. o.
PUREGENE DNA Isolation Kit	Genra Systems, Minneapolis, USA
RPMI 1640 Medium (1x)	Biochrom, s. o.
Türks-Lösung	Merck, s. o.
10x PCR Buffer (mit 1,5mM MgCl ₂)	Applied Biosystems, s. o.
2-Propanol	Merck, s. o.

3.1.3 Puffer und Lösungen

Alle für Puffer und Lösungen verwendeten Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt, D, hergestellt.

10x Erythrozytenlyse-Puffer	82,9 g	1,55 M NH ₄ Cl
	10,0 g	0,1 M KHCO ₃
	2 ml	0,5 M EDTA
	ad 1000 ml	H ₂ O
50x TAE	242 g	Tris Base
	57,1 ml	Eisessig (100%)
	100 ml	0,5 mM EDTA
	ad 1000 ml	H ₂ O
Gelladepuffer	20 g	Sacharose
	0,125 g	Xylene Cyanol
	0,125 g	Bromphenolblau
	ad 50 ml	H ₂ O

3.1.4 Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Elektrophoresekammer	Wide Mini Sub Cell	BIO-RAD, München, D
Spannungsgenerator für Elektrophoresekammer	Power Pack P25	Whatman Biometra, Göttingen, D
Geldokumentationsanlage	Video Graphic Printer UP-895 MD	Sony, Tokio, Japan
UV-Transluminator	Gene Flash	Syngene, Cambridge, UK
Hybridisierungsöfen für Objektträger	HYBrite™	Vysis GmbH, Stuttgart, D
Fluoreszenzmikroskop	ZEISS Axiophot Fluoreszenzmikroskop	ZEISS, Oberkochen, D
PCR-Geräte	DNA Engine PTC-200 (Peltier Thermal Cycler)	MJ Research, Waltham, USA
	Gene Amp PCR System 9700	Applied Biosystems, s. o.
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg, D

Sequenzierer	ABI Prism 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, s. o.
Vortex Schüttler	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Zentrifuge	Centrifuge 5415 D	Eppendorf, s. o.
	Centrifuge 5810	Eppendorf, s. o.

3.2 Methoden

Die *TP53*-Mutationsanalyse wurde an DNA aus Leukämiezellen der Patienten durchgeführt. Die leukämischen Lymphoblasten wurden zuerst durch eine Separation der mononukleären Zellen angereichert (s. Kapitel 3.2.1). Im Anschluss wurde aus diesen Zellen die DNA gewonnen (s. Kapitel 3.2.2).

3.2.1 Zellaufarbeitung

Die mononukleären Zellen wurden durch eine Dichtegradientenzentrifugation von den übrigen Knochenmarkbestandteilen getrennt. Die detaillierte Vorgehensweise wird im Folgenden beschrieben:

Die Leukozytenzahl der Knochenmarkprobe wurde in Türks-Lösung mittels einer Schilling-Zählkammer bestimmt. Um eine Zellzahl zwischen 1×10^6 und 1×10^7 zu erreichen, wurde eine 1:3-1:10-Verdünnung des Knochenmarks mit RPMI-Medium hergestellt. 5 ml dieses verdünnten Knochenmarks wurden über je 4 ml Biocoll Separating Solution geschichtet. Nach einem Zentrifugationsschritt von 18 Minuten bei 2000 U/min (ohne Bremse) wurde der über der Ficoll-Lösung entstandene weiße Ring, der die mononukleären Zellen enthielt, vorsichtig abgenommen und in ein neues Röhrchen transferiert. Das Röhrchen wurde mit der doppelten bis dreifachen Menge an RPMI aufgefüllt und die Zellen bei 1500 U/min für 10 Minuten (mit Bremse) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bezüglich seiner Zusammensetzung begutachtet: War es von blutiger Konsistenz oder enthielt Gerinnsel, wurde eine Erythrozytenlyse durchgeführt, wofür nach Waschen mit 10 ml RPMI-Medium und anschließender Zentrifugation (1500 U/min, 10 Minuten) das Pellet in 10-20 ml Erythrozytenlyse-Lösung resuspendiert wurde. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (1500 U/min, 10 Minuten). Der Überstand wurde abgegossen und

die Zellen ein zweites Mal mit PBS gewaschen und zentrifugiert (1500 U/min, 10 Minuten).

Im Anschluss folgten zwei Waschschrte mit jeweils 10 ml PBS und anschließender Zentrifugation (1500 U/min, 10 Minuten). Danach wurde das Pellet je nach Größe in 1-10 ml PBS aufgenommen. 10 µl dieser Lösung wurden mit 90 µl Turks-Lösung verdünnt und zur Zellzählung in eine Schilling-Zählkammer gegeben. Für die DNA-Isolierung wurden zwischen 3×10^6 bis 1×10^7 Zellen verwendet.

3.2.2 DNA-Isolierung

Die Isolierung der DNA aus den frisch isolierten mononukleären Zellen erfolgte mit dem PUREGENE DNA Isolation Kit der Firma Genra Systems (Minneapolis, USA). Abhängig von der Zellzahl wurde Cell Lysis Solution (300 µl bei $<3 \times 10^6$ Zellen, 600 µl bei $3-5 \times 10^6$ Zellen, 900 µl bei $>5 \times 10^6$ Zellen) zu den Zellen hinzugegeben und die Röhrchen mehrfach geschwenkt. Die Zellen wurden bis zur weiteren Verarbeitung in Cell Lysis Solution bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Vor der Weiterverarbeitung der gelösten Zellen wurden noch vorhandene Inhomogenitäten durch Inkubation bei 37°C vollständig gelöst. Die Proben wurden danach auf Raumtemperatur abgekühlt. Zur Proteinfällung wurden, abhängig von der Menge des vorher verwendeten Lysepuffers, 100-300 µl Protein Precipitation Solution (auf 4°C gekühlt) zur Probe gegeben. Nach 25 Sekunden vortexen erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 13000 U/min für 10 Minuten (bei 4°C). Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und eisgekühltes Isopropanol in gleichem Volumen wie die Cell Lysis Solution (300, 600 oder 900 µl) zur Fällung der DNA hinzu pipettiert. Nach Zentrifugation (13000 U/min, 10 Minuten) wurde das Pellet mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen und erneut bei 13000 U/min für 10 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgezogen und das Pellet bei 37°C vollständig getrocknet. Die DNA wurde je nach Pellet-Größe in 100-600 µl DNA Hydration Solution gelöst. Die vollständige Hydratation der DNA erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur.

Die Bestimmung der Konzentration der DNA wurde mittels UV-Spektrophotometer durchgeführt: Nach Verdünnung der DNA in einem Verhältnis von 1:50 mit HPLC-gereinigtem Wasser wurde die Absorption bei 260 nm gemessen (A_{260}). 1 OD entspricht hierbei 50 µg doppelsträngiger DNA. Abschliessend wurde die Konzentration der DNA auf 100 ng/µl eingestellt.

3.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

3.2.3.1 Theoretische Grundlagen

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) wurde 1985 als Methode eingeführt¹¹¹. Sie ermöglicht es, auch kleinste DNA-Mengen *in vitro* so häufig und so spezifisch zu amplifizieren, dass mit dem entstandenen PCR-Produkt weitergehende Experimente möglich sind. Der Ablauf der Reaktion ist wie folgt: Die doppelsträngige Ziel-DNA wird durch eine Temperaturerhöhung auf 95°C aufgetrennt (Denaturierung). An die nun einzelsträngige DNA hybridisieren die Primer (Annealing), Oligonukleotide, die komplementär zur DNA-Ziel-Sequenz aufgebaut sind. Um beide DNA-Stränge amplifizieren zu können, werden zwei Primer in die Reaktion hineingegeben, ein den Vorwärtsstrang (engl. *forward*) und ein den Rückwärtsstrang (engl. *reverse*) bindender Primer. Das Annealing findet meistens bei einer Temperatur zwischen 55 und 70°C statt. Die Primer bilden den Angriffspunkt für eine hitzestabile DNA-Polymerase, z. B. die *Taq*-DNA-Polymerase, ein Enzym, das aus dem thermophilen Bakterienstamm *Thermus aquaticus* isoliert wurde. Dieses Enzym besitzt 5'-3'-DNA-Polymeraseaktivität. Somit kann es nach dem Anlagern an die freien 3'-OH-Enden der Primer bei 72°C durch den Einbau von Desoxynukleotiden (dNTPs) zur Ziel-DNA komplementäre DNA-Stränge synthetisieren (Elongation). Die drei Reaktionsschritte Denaturierung, Annealing und Elongation werden je nach Anwendung zwischen 25 und 40 Mal wiederholt, um eine optimale Amplifizierung zu gewährleisten.

3.2.3.2 Durchführung

TP53 hat 10 kodierende Exons (Exon 2-11). 97 Prozent aller *TP53*-Mutationen finden sich jedoch zwischen den Aminosäurepositionen 92 bis 292 in der DNA-bindenden Domäne, entsprechend dem Endbereich von Exon 4 bis zum mittleren Bereich von Exon 8. So genannte *hot spots*, besonders häufig auftretende Mutationsloci, sind die Aminosäuren auf Position 175, 245, 248, 249, 273 und 282 (kodiert in Exon 5-8). Aus diesen Gründen wurde die vorliegende Untersuchung auf die Analyse der Exons 5-8 des *TP53*-Gens beschränkt¹¹².

Jedes Exon wurde einzeln amplifiziert. Dazu wurden die in Tabelle 3.1 aufgelisteten Primer verwendet. Die Sequenzen der verwendeten Primer wurden der Publikation von Hsiao et al¹⁰² entnommen.

Tabelle 3.1: Für Amplifizierung und Sequenzierung der Exons 5-8 des *TP53*-Gens verwendete Primer (entnommen aus¹⁰²)

Primer	Primersequenz	Annealing-temperatur	Basenpaar-länge der amplifizierten Sequenz
Exon 5 forward	5'-CTGTTCACTTGTGCCCTGAC-3'	58-60	233
Exon 5 reverse	5'-CAACCAGCCCTGTCGTCTCT-3'		
Exon 6 forward	5'-GAGACGACAGGGCTGGTT-3'	58-60	193
Exon 6 reverse	5'-CCACTGACAACCACCCTT-3'		
Exon 7 forward	5'-CCAAGGCGCACTGGCCTC-3'	63-68	171
Exon 7 reverse	5'-GAGGCAAGCAGAGGCTGG-3'		
Exon 8 forward	5'-GGGACAGGTAGGACCTGATT-3'	58-60	183
Exon 8 reverse	5'-CACCGCTTCTTGTCTGCTT-3'		

Der PCR-Ansatz erfolgte nach folgendem Protokoll:

10x PCR Buffer (mit 1,5 mM MgCl ₂)	5 µl
10 mM dNTPs	1 µl
10 mM <i>forward</i> Primer	1 µl
10 mM <i>reverse</i> Primer	1 µl
<i>Taq</i> -Polymerase	0,5 µl
Genomische DNA (100 ng/µl)	0,5-4µl
HPLC-H ₂ O	ad 50 µl

Der fertige Ansatz wurde zügig in ein PCR-Gerät (DNA Engine PTC-200, MJ Research, Waltham, USA) gestellt und nach folgendem Protokoll amplifiziert:

1. Initiale verlängerte Denaturierung	95°C	10 Minuten
2. Denaturierung	95°C	30 Sekunden

3.	Annealing Exon 5, 6, 8	58-60°C	30 Sekunden
	Annealing Exon 7	63-68°C	30 Sekunden
4.	Elongation	72 °C	45 Sekunden
	Wiederholung von Schritt 2-4 für 35-40 Zyklen		
5.	Finale Elongation	72°C	10 Minuten
6.	Kühlung bis zur Weiterverarbeitung	4°C	

3.2.3.3 Amplifizierung von DNA aus einem nativen Knochenmark-Ausstrich

Für die Probe eines Patienten musste ein Knochenmark-Ausstrich für die PCR verarbeitet werden. Zunächst wurde der Knochenmark-Ausstrich mit 100 µl DNA Hydration Solution durch wiederholtes Pipettieren vorsichtig vom Objektträger gelöst und in einem Eppendorf-Röhrchen aufgefangen. Diese Lösung wurde 16 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Für die PCR wurden 10 µl davon verwendet. Die im PCR-Ansatz verwendete Menge an HPLC-H₂O wurde dementsprechend verringert. Das weitere Vorgehen entsprach der in Kapitel 3.2.3.2 geschilderten Durchführung der PCR.

3.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode, um DNA-Fragmente ihrer Länge nach aufzutrennen und dann sichtbar zu machen. Dabei bildet das Agarose-Gel ein Netz, das die negativ geladenen Nukleinsäure-Moleküle im elektrischen Feld durchwandern. Je höher die Agarose-Konzentration des Gels ist, desto kleiner sind die Poren dieses Netzes. Dementsprechend wandern kürzere Moleküle bei höherer Gelkonzentration schneller als längere. Im Vergleich mit einem Mix aus standardisierter DNA unterschiedlicher Länge (z. B. einer so genannten Basenpaar-Leiter, Invitrogen, Karlsruhe, D) kann die Länge der analysierten DNA bestimmt werden. Durch Hinzufügen des in die DNA interkalierenden Farbstoffes Ethidiumbromid wird dieser Vorgang unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Für die vorliegenden Versuche wurde ein zweiprozentiges Agarose-Gel verwendet. Dazu wurden 2 g Agarose in 100 ml 1x TAE-Puffer gelöst und bei 800 Watt in der Mikrowelle mehrmals aufgekocht. Nach dem Abkühlen auf 60°C wurden 5 µl Ethidiumbromid hinzugefügt, das Gel in eine Kammer gegossen und zum Erhärten bei

Raumtemperatur stehen gelassen. In die durch einen Kamm erzeugten Taschen des Gels wurden jeweils 10 µl des PCR-Produkts zusammen mit 4 µl des 1:3-verdünnten Ladepuffers pipettiert. Bei einer angelegten Spannung von 120 Volt wanderten die Moleküle 20 bis 30 Minuten durch das Gel. Danach wurde das Ergebnis der PCR unter UV-Licht beurteilt und fotografisch dokumentiert.

3.2.5 Sequenzierung

3.2.5.1 Theoretische Grundlagen

Die Sequenzierung bietet die Möglichkeit, die Basenabfolge der DNA zu entschlüsseln. In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode nach Sanger verwendet¹¹³. Hierbei werden in der Sequenzier-PCR zusätzlich zu den Desoxynukleotiden so genannte Didesoxynukleotide (ddNTPs) in den neu synthetisierten DNA-Strang eingebaut. Diesen ddNTPs fehlt an ihrem 3'-Ende die Hydroxylgruppe, so dass nach Einbau eines solchen Nukleotids ein Kettenabbruch erfolgt. Dadurch entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge. Die vier ddNTPs sind mit einem jeweils anderen Fluoreszenzfarbstoff versehen, der die Identifizierung jedes einzelnen der vier Nukleotide ermöglicht. Die DNA-Fragmente werden in einer Kapillare ihrer Länge entsprechend elektrophoretisch aufgetrennt und danach mit einem Laser zur Fluoreszenz angeregt.

Das automatische Sequenziergerät gibt zur Auswertung der Sequenzierung so genannte Chromatogramme aus. Diese zeigen die Fluoreszenzstärke der jeweiligen Base in einem Graphen aufgetragen gegen die Zeit. Die Fluoreszenz-Ausschläge (engl. *peaks*) der vier Basen verdeutlichen auf diese Weise bildlich die DNA-Sequenz. Ist die Sequenz bekannt, können Mutationen im Vergleich zu einer Referenzsequenz detektiert werden. Homozygote Mutationen stellen sich als einzelner Peak bei veränderter Basenfolge dar, heterozygote Mutationen sind durch Überlagerung zweier Peaks unterschiedlicher Basen erkennbar.

3.2.5.2 Durchführung

Die Sequenzier-PCR wurde mit dem BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit durchgeführt. Dabei wurde folgender Ansatz verwendet:

BigDye Terminator v1.1, v3.1 5x Sequencing Buffer	3,5 µl
3,2 mM Primer (<i>forward</i> oder <i>reverse</i>)	1 µl
BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	1 µl
PCR-Produkt	0,5-6 µl
HPLC-H ₂ O	ad 20 µl

Die verwendete Menge an PCR-Produkt war abhängig von der Stärke der in der Agarose-Gelelektrophorese sichtbar gemachten Bande.

Der fertige Ansatz lief im Gene Amp PCR System 9700 mit folgendem Protokoll:

- | | | |
|--|------|-------------|
| 1. Initiale Denaturierung | 96°C | 1 Minute |
| 2. Denaturierung | 96°C | 10 Sekunden |
| 3. Annealing und Elongation | 50°C | 5 Sekunden |
| Wiederholung von Schritt 2-3 für 25 Zyklen | | |
| 5. Finale Elongation | 60°C | 4 Minuten |
| 6. Kühlung bis zur Weiterverarbeitung | 4°C | |

Die Proben wurden im Anschluss mit dem NucleoSEQ Kit entsprechend dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt, um noch verbliebene Materialreste der Sequenzier-PCR zu entfernen. Vor der Sequenzierung wurden 16 µl Formamid mit 4 µl des aufgereinigten Sequenzier-PCR-Produktes gemischt. Die Sequenzierung erfolgte mit dem ABI-Prism 310 Genetic Analyzer.

3.2.5.3 Auswertung der DNA-Sequenzierung

Die Auswertung der *TP53*-Sequenzen und der Vergleich mit der *TP53*-Referenz-Sequenz erfolgte mit den Computerprogrammen „Seq Analysis“ (Applied Biosystems, s. o.) und „Sequencher 4.7“ (Gene Codes, Ann Arbor, USA).

3.2.6 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)

3.2.6.1 Theoretische Grundlagen

Die Methode der *in-situ*-Hybridisierung wurde 1969 unabhängig von zwei Arbeitsgruppen entwickelt^{114, 115}. Sie stellt eine Möglichkeit dar, spezifische

Nukleinsäuresequenzen direkt im Untersuchungsmaterial (*in-situ*, d.h. am Ort selbst) nachzuweisen. Dies beruht auf der Fähigkeit doppelsträngiger Nukleinsäuren, sich bei hohen Temperaturen aufzutrennen (Denaturierung) und nach Absenkung der Temperatur unter den Schmelzpunkt wieder zu Doppelsträngen zusammenzulegen (Hybridisierung). Während der Hybridisierung können sich anstelle des ursprünglichen Nukleinsäurestrangs eingeführte Sonden an die einzelsträngige Nukleinsäure anlagern. Diese Sonden enthalten die zur gesuchten Nukleinsäuresequenz homologe Basenabfolge. Sie sind entweder mit einem Fluoreszenz-Farbstoff markiert (direkte Methode, FISH) oder mit markierten Antikörpern und Anti-Antikörpern assoziiert (indirekte Methode). Bei der direkten Methode kann die Hybridisierung ohne weiteren Zwischenschritt im Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden.

Lokuspezifische Sonden (engl. *locus specific identifier*, LSI) enthalten die Sequenz eines bestimmten Gens oder Genabschnitts. Sie werden v.a. zur Detektion von speziellen Deletionen, Amplifikationen oder Translokationen eingesetzt. Des weiteren gibt es Sonden, die ein gesamtes Chromosom anfärben (engl. *whole chromosome painting*, WCP) oder sich an das Zentromer eines Chromosoms anlagern und dadurch eine schnelle Zählung der Chromosomen ermöglichen (engl. *chromosome enumeration probe*, CEP).

Die FISH kann sowohl an Metaphase-Chromosomen (aus Zellkulturen) als auch an Interphase-Kernen (direkt im Gewebe) durchgeführt werden. In Knochenmark-Ausstrichen wird die DNA direkt im Zellkern der noch intakten Zellen nachgewiesen (Interphase-FISH).

In der hier durchgeführten Untersuchung wurde eine LSI-Sonde für das Gen *TP53* verwendet (LSI *TP53* Spectrum Orange Sonde). Sie erstreckt sich über einen 145 kb grossen Abschnitt auf Chromosom 17p13.1, so dass sie das 20 kb umfassende *TP53* an seinen beiden Enden überspannt. Ist *TP53* deletiert, so kann die Sonde nicht an die Ziel-DNA binden. In der mikroskopischen Auswertung ist statt zwei Signalen nur eines sichtbar (entsprechend einem Heterozygotieverlust). Sind mehr als zwei Signale in einem Zellkern vorhanden, handelt es sich vermutlich um eine Amplifikation des *TP53*-Gens.

3.2.6.2 Durchführung

Die Interphase-FISH wurde auf Knochenmark-Ausstrichen derjenigen Patienten durchgeführt, bei denen eine *TP53*-Mutation in der Sequenzierung detektiert worden war. Die Knochenmark-Ausstriche wurden in 70%igem Ethanol über Nacht bei -20°C fixiert und dann an der Luft getrocknet. Im Anschluss erfolgte eine Vorbehandlung mit verschiedenen Wasch-, Alkohol- und Enzymlösungen, um das spätere Hybridisierungsergebnis zu optimieren. Zu Beginn der Behandlung wurden die Nukleinsäuren mit einer Fixativ-Lösung aus Methanol und Eisessig (im Verhältnis 3:1) auf dem Ausstrich fixiert. Danach folgten Waschschrte mit 2x SSC-Puffer und einer aufsteigenden Alkoholreihe, um Zytoplasmareste zu entfernen und mit dem Alkohol die Zellen zu entwässern. Vor Beginn der Enzymbehandlung wurde jedes Präparat unter dem Lichtmikroskop betrachtet, um die notwendigen Einwirkzeiten für die Enzymlösung zu bestimmen. Der Einsatz des Enzyms RNase führt zur Zerstörung von Ribonukleinsäuren, die sonst eine Kreuzhybridisierung mit störender Hintergrundfluoreszenz bewirken können. Die Protease Pepsin ist ein Enzym, das alle im Zytoplasma als auch außerhalb der Zelle vorhandenen Proteine verdaut und gleichzeitig den Zellkern für die Sonde durchlässiger macht. Ein nach der Pepsinbehandlung erfolgender Waschschrte mit PBS und Formamid stabilisiert die DNA und führt durch das beigefügte Formamid zur Absenkung des Schmelzpunktes.

Das Protokoll der Vorbehandlung umfasste folgende Einzelschritte:

- | | | | |
|----|--|---------------------|---------------|
| 1. | 70%iger Alkohol | -20°C | über Nacht |
| 2. | Fixativ-Lösung (Methanol:Eisessig 3:1) | Raumtemperatur (RT) | 2 x 3 Minuten |
| 3. | 2x SSC-Puffer | 37°C | 30 Minuten |
| 4. | aufsteigende Alkoholreihe: | | |
| | 70%iges Ethanol | RT | 4 Minuten |
| | 90%iges Ethanol | RT | 4 Minuten |
| | 100%iges Ethanol | RT | 4 Minuten |
| 5. | Lufttrocknen | RT | |
| 6. | Knochenmark-Ausstriche hinsichtlich Qualität und Zelldichte im Lichtmikroskop beurteilen und RNase-Einwirkzeit festlegen | | |

7.	RNAse-Lösung (auf Objektträger (OT) geträufelt und mit Deckglas bedeckt)	37°C	10-60 Minuten
8.	2x SSC-Puffer	RT	3x5 Minuten
9.	1x PBS-Puffer	RT	5 Minuten
10.	Pepsin-Lösung	37°C	10 Minuten
11.	1x PBS + MgCl ₂	RT	5 Minuten
12.	1x PBS + Mg Cl ₂ + Formamid	RT	10 Minuten
13.	1x PBS	RT	5 Minuten
14.	aufsteigende Alkoholreihe:		
	70%iges Ethanol	RT	4 Minuten
	90%iges Ethanol	RT	4 Minuten
	100%iges Ethanol	RT	4 Minuten
15.	Lufttrocknen	RT	

Vor Beginn der Hybridisierung wurde der Objektträger noch einmal unter dem Lichtmikroskop betrachtet, um eine für die FISH besonders geeignete Stelle zu markieren. Der danach hergestellte Hybridisierungsmix bestand pro Objektträger aus 0,5 µl LSI *TP53*-Spectrum Orange-Sonde, 1 µl HPLC-H₂O und 3,5 µl Hybridisierungspuffer. Nach kurzem Vortexen wurden diese 5 µl Sondenmix auf die markierte Stelle des Objektträgers geträufelt, ein Deckglas (Ø 18 mm) aufgesetzt und mit FixoGum befestigt. Die so vorbereiteten Knochenmark-Ausstriche wurden in den mit feuchten Tüchern ausgelegten HYBrite gelegt und nach folgendem Protokoll denaturiert und hybridisiert:

1.	Denaturierung	75°C	2 Minuten
2.	Hybridisierung	37°C	6-16 Stunden

Im Anschluss an die Hybridisierung mussten nicht gebundene Sondenmoleküle mit verschiedenen Waschlösungen abgewaschen werden, um die visuelle Auswertung nicht zu stören. Dies erfolgte nach dem vom Hersteller empfohlenen Rapid-Wash-Protokoll:

1.	0,4x SSC + 0,3% Tween-20	73°C	2 Minuten
2.	2x SSC + 0,1% Tween-20	RT	1 Minute
3.	HPLC-H ₂ O	RT	kurz spülen
4.	Lufttrocknen (abgedunkelt)	RT	

Die getrockneten Objektträger wurden mit 20 µl Vectashield+DAPI (4.6-Di-amidino-2-Phenylindol) eingedeckt. Bei Vectashield handelt es sich um eine Substanz, die die gefärbten Ausstriche vor dem Ausbleichen schützen soll. DAPI ist ein blauer Fluoreszenzfarbstoff, der zur Gegenfärbung der Interphasekerne benutzt wird. Die intensive Blaufärbung bei Anregung durch Licht mit einer Wellenlänge von 360-390 nm hilft beim Aufsuchen der Zellkerne und erleichtert die Beurteilung der Sondensignale. Die Objektträger wurden bis zu ihrer Auswertung bei -20°C gelagert.

Die Auswertung der hybridisierten Knochenmark-Ausstriche erfolgte unter einem Fluoreszenzmikroskop mit einem Filterschieber mit vier Filterblöcken. Dabei wurden folgende vom Hersteller der LSI TP53-Sonde empfohlene Auswertungskriterien verwendet („Recommended Enumeration Guidelines for Single Color Probe Enumeration“, auf der Vysis-Homepage <http://www.vysis.com>): Die Auszählung erfolgte an 200-500 Kernen. Es wurden nur einzeln liegende Zellkerne bei der Auswertung berücksichtigt, sich überlappende oder nicht intakte Kerne wurden nicht gezählt. Kerne ohne Signal wurden nur gezählt, wenn sie von zahlreichen Zellkernen mit Signalen umgeben waren. Kerne mit Signalen an der Kernperipherie wurden nicht gezählt. Gesplittete oder diffuse Signale wurden als ein Signal gezählt, wenn sie miteinander durch ein Fluoreszenzband verbunden waren.

3.2.7 Statistische Auswertung

Um festzustellen, ob es sich bei dem untersuchten Patientenkollektiv um eine für die ALL-REZ BFM-Studie repräsentative Stichprobe handelt, wurde der χ^2 -Test angewandt. Dieser Test orientiert sich an einer Vierfeldertafel. Er überprüft die Unabhängigkeit zweier Variablen in einer Kreuztabelle und untersucht damit indirekt, ob ein Zusammenhang zwischen den beiden Merkmalen besteht. Zwei Variablen einer Vierfeldertafel gelten als voneinander unabhängig, wenn die beobachteten Häufigkeiten der einzelnen Zeilen mit den erwarteten Häufigkeiten übereinstimmen.

Ein Vergleich von Patienten mit und ohne *TP53*-Mutation anhand klinischer Merkmale sollte feststellen, ob bestimmte Merkmale bei Patienten mit *TP53*-Mutation prozentual häufiger oder seltener zu finden sind als in der Gruppe ohne Mutationen, und ob diese Ergebnisse signifikant unterschiedlich sind. Auch in diesem Fall findet der χ^2 -Test Anwendung. Bei erwarteten Werten pro Zelle kleiner oder gleich 5 (wie im vorliegenden Kollektiv der Fall) gilt der χ^2 -Test jedoch als ungenau. Hier wurde stattdessen zur genaueren Abschätzung Fisher's exakter Test angewendet.

Beim exakten Test nach Fisher wird die genaue Wahrscheinlichkeit dafür ausgerechnet, die beobachtete oder eine noch extremere Vierfeldertafel zufällig zu erhalten. Prinzipiell könnte dieser Test immer angewendet werden. Da er aber sehr rechenintensiv ist, wird er nur für kleine Fallzahlen, bei denen der χ^2 -Test zu ungenau ist, verwendet.

Die statistischen Tests wurden mit Hilfe des Software-Programms „SPSS for Windows“, Version 12.0.1, der Firma SPSS Inc. (Chicago, USA) durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Analyse des untersuchten Patientenkollektivs auf Repräsentativität

Zunächst sollte geprüft werden, ob die auf *TP53*-Mutationen untersuchten Patienten eine repräsentative Auswahl aus dem Kollektiv aller im selben Zeitraum behandelten Patienten der ALL-REZ BFM-Studie darstellen. Dazu wurde eine Gegenüberstellung der 116 untersuchten Patienten mit allen im gleichen Zeitraum registrierten Studien-Patienten anhand klinischer Parameter durchgeführt. Die statistische Signifikanz des Vergleichs wurde mit dem χ^2 -Test überprüft.

Die Einschlusskriterien, die für die untersuchten Patienten festgelegt wurden, d. h. erstes ALL-Rezidiv mit Knochenmark-Befall (isoliertes oder kombiniertes Knochenmark-Rezidiv) und Diagnosestellung zwischen März 2002 und November 2005 (vergl. Kapitel 3.1.1), wurden äquivalent auf alle Studienpatienten angewendet. So wurden isoliert extramedulläre Rezidive, entsprechend der Strategieguppe S1, generell ausgeschlossen. Die Vergleichsgruppe setzte sich somit aus 220 ALL-REZ BFM-Patienten zusammen.

Die verglichenen Parameter beinhalteten Merkmale der Patienten wie Alter und Geschlecht, weiterhin Ort, Zeitpunkt und Immunphänotyp des Rezidivs sowie die Einteilung in Strategieguppen, die Anzahl der leukämischen Blasten im Blut bei Diagnosestellung und die bei der Ersterkrankung erhaltene Therapie.

Der P-Wert des χ^2 -Tests lag für alle untersuchten Parameter deutlich oberhalb des gewählten Signifikanzniveaus $\alpha=0,05$ (s. Tabelle 4.1), d. h. es konnte zwischen den beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die untersuchten Patienten stellen somit eine repräsentative Stichprobe des ALL-REZ BFM-Gesamtkollektivs für den angegebenen Zeitraum dar.

Tabelle 4.1: Analyse des auf TP53-Mutationen untersuchten Patientenkollektivs auf Repräsentativität im Vergleich zur Gesamtheit der ALL-REZ BFM-Studienpatienten

	Untersuchte Patienten (%)	ALL-REZ BFM Vergleichsgruppe (%)	P-Wert (χ^2-Test)
Altersgruppe bei Diagnose			0,69
<5 Jahre	17 (15)	40 (18)	
5 bis <10 Jahre	43 (37)	83 (38)	
ab 10 Jahre	56 (48)	99 (44)	
Geschlecht			0,21
männlich	73 (63)	124 (56)	
weiblich	43 (37)	98 (44)	
Zeitpunkt des Rezidivs			0,11
sehr früh	38 (33)	58 (26)	
früh	16 (14)	51 (23)	
spät	62 (53)	113 (51)	
Ort des Rezidivs			0,57
KM isoliert	96 (83)	178 (80)	
KM kombiniert	20 (17)	44 (20)	
Strategiegruppe			0,19
S2	63 (54)	117 (53)	
S3	10 (9)	34 (15)	
S4	43 (37)	71 (32)	
Immunphänotyp			0,96
pro-B-ALL	6 (5)	16 (7)	
c-ALL	64 (55)	114 (51)	
T-ALL	6 (5)	11 (5)	
prä-T-ALL	4 (4)	7 (3)	
prä-B-ALL	26 (22)	46 (21)	

Fortsetzung Tabelle 4.1				
BAL (biphänotypisch, hybrid)	1	(1)	4	(2)
sonstige	4	(4)	11	(5)
unbekannt	5	(4)	13	(6)
periphere Blasten bei Diagnose				0,32
<1/μl	10	(9)	29	(13)
1/μl bis <10000/μl	83	(72)	151	(68)
ab 10000/μl	20	(17)	30	(14)
unbekannt	3	(3)	12	(5)
Therapie der Ersterkrankung				0,84
ALL-BFM	81	(70)	150	(68)
CoALL	28	(24)	60	(27)
andere	7	(6)	12	(5)
Gesamt	116		222	

4.2 Ergebnisse der *TP53*-Mutationsanalyse

4.2.1 *TP53*-Sequenzveränderungen in diagnostischen Proben von 116 ALL-Rezidiv-Patienten

In den Leukämiezellen von 116 Patienten mit einem ersten ALL-Rezidiv (isoliertes oder kombiniertes KM-Rezidiv) wurden Exon 5 bis 8 des *TP53*-Gens auf Mutationen untersucht. Die vorliegende Analyse wurde auf diese Exons beschränkt, da sich die große Mehrheit aller *TP53*-Mutationen in diesem Bereich befindet¹¹². Die Mutationsanalyse erfolgte durch Sequenzierung der aus den leukämischen Blasten des Knochenmarks gewonnenen DNA. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit der Sequenz des NCBI GenBank-Eintrages #X54156¹¹⁶ verglichen. Diese Sequenz wird von allen *TP53*-Datenbanken und dem Großteil der wissenschaftlichen Veröffentlichungen als *TP53*-Referenzsequenz verwendet. Zur Beschreibung der Mutationen im Text wurde die allgemein anerkannte Nomenklatur verwendet¹¹⁷.

Die Analyse erbrachte folgende Ergebnisse: In der DNA von insgesamt acht Patienten des untersuchten Kollektivs fanden sich Veränderungen der *TP53*-Gensequenz. Eine Sequenz wies eine Deletion auf (sieben Nukleotide wurden aus der Sequenz entfernt), und zwei Basenaustausche konnten anhand publizierter Daten¹¹⁸ als Polymorphismen identifiziert werden. Die weiteren fünf Veränderungen konnten als *missense*-Mutationen (d.h. durch einen Basenaustausch verändert sich im Genprodukt die Aminosäure¹¹⁹) charakterisiert werden. Die Inzidenz von *TP53*-Mutationen beim ALL-Rezidiv liegt somit bei 5 Prozent (6/116). Die Chromatogramme der *TP53*-Mutationen können in Abbildung 4.1 betrachtet werden. Die einzelnen Aspekte aller gefundenen *TP53*-Sequenzveränderungen sind in Tabelle 4.2 zusammenfassend dargestellt und werden im Folgenden näher erläutert.

Der Basenaustausch g.13399A>G/A auf Exon 6 (Codon 213), der bei zwei Patienten gefunden wurde, ist ein so genannter stiller Austausch: Altes und neues Basen-Triplett kodieren für die gleiche Aminosäure. Diese Veränderung ist in der Literatur seit 1991 als seltener Polymorphismus bekannt¹¹⁸. In einer Untersuchung von 189 Proben von Mamma- und Bronchial-Karzinomen wurde diese Veränderung in 3,2 Prozent der Fälle gefunden, war aber ebenso in normalem Vergleichsgewebe der betreffenden Patienten vorhanden. In der vorliegenden Untersuchung fanden sich bei beiden Patienten dieselben *TP53*-Sequenzveränderungen auch in Remissionsmaterial. Diese Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass bei beiden Patienten ein Polymorphismus vorliegt.

In Exon 5 wurde bei der Probe 8484 die sieben Basenpaare umfassende Deletion g.13218-13224delAGCGCTG gefunden. Dadurch sind Codon 180, 181 und 182 deletiert. Der Ausfall von sieben Basenpaaren bewirkt auf der Ebene der *messenger*-RNA (mRNA) eine so genannte Leseraster-Verschiebung (engl. *frameshift*) in der Kodierung der Aminosäuren. Hierdurch entsteht ein neues Stop-Codon (TGA) an den Nukleotidpositionen 14057-59 der veränderten Sequenz. Als Folge kann ein aberrantes Protein entstehen. Des weiteren besteht die Möglichkeit, dass die mRNA durch einen *nonsense mediated mRNA decay* (NMD) genannten Mechanismus abgebaut wird¹²⁰, so dass es gar nicht erst zur Entstehung eines Proteins kommt.

Bei den weiteren fünf bei ALL-Rezidiv-Proben identifizierten Mutationen handelt es sich um Basenpaaraustausche, die aus der Literatur als *missense*-Mutationen bekannt sind^{96, 107, 121-123}. Sie verteilen sich folgendermaßen auf die verschiedenen Exons: In Exon 5 liegt die Mutation g.13059C>T (RNA Codon 127), in Exon 7 die drei Mutationen

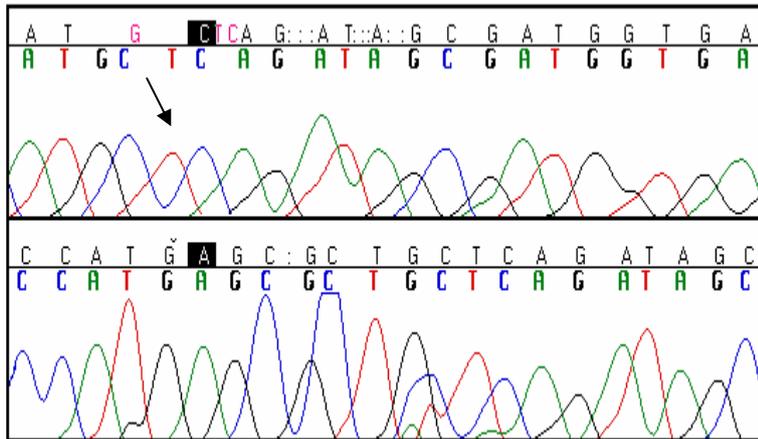
g.14060G>C (Codon 245), g.14069C>T (Codon 248) und g.14070G>A (Codon 248) und in Exon 8 die Mutation g.14512C>A (Codon 281).

Von diesen fünf *missense*-Mutationen stellen sich drei als Transition und zwei als Transversion dar. Transitionen sind Basenaustausche innerhalb der gleichen Nukleotidbasen-Gruppe, also Ersatz einer Purinbase durch eine Purinbase (A↔G) und einer Pyrimidin- durch eine Pyrimidinbase (C↔T). Im Gegensatz dazu ist eine Transversion durch den Austausch zwischen den beiden Gruppen gekennzeichnet: Eine Purinbase (A/G) wird durch eine Pyrimidinbase (C/T) ersetzt und umgekehrt. Die fünf vorliegenden *missense*-Mutationen bewirken alle die Entstehung einer anderen Aminosäure auf Proteinebene. Bei vier der fünf Mutationen gehört die neu gebildete Aminosäure einer anderen chemischen Gruppe an. Ein so genannter Aminosäure-Gruppenwechsel findet statt (s. Tabelle 4.2).

Drei der fünf *missense*-Mutationen stellen sich in der Sequenzierung als heterozygot dar, d.h. in den Chromatogrammen ist neben der veränderten Base noch die Base der Referenzsequenz zu erkennen. Die Mutationen auf den Nukleotidpositionen 14069 und 14070 erscheinen dagegen homozygot. Dies spiegelt jedoch nicht den *TP53*-Allelstatus in den Leukämiezellen wider, da die sequenzierten Proben neben den Leukämiezellen einen variablen Anteil an normalen hämatopoetischen Zellen enthielten. Das nicht veränderte Allel kann daher entweder auf normale hämatopoetische Zellen oder auf die Leukämiezellen selbst zurückzuführen sein. Letzteres ist jedoch unwahrscheinlich, wenn in den Leukämiezellen durch Deletion eines *TP53*-Allels ein Heterozygotieverlust (LOH) vorliegt. Daher wurde im Folgenden durch Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung von KM-Ausstrichen der numerische Status der *TP53*-Allele erhoben und das Ergebnis mit dem Anteil an Leukämiezellen in der Probe korreliert.

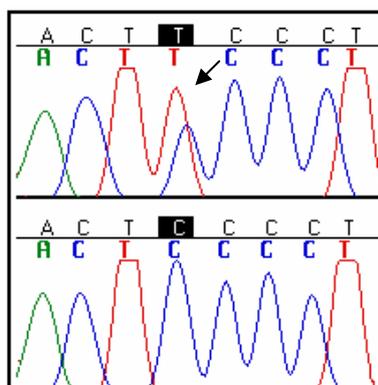
Tabelle 4.2: Ergebnisse der TP53-Sequenzanalyse in diagnostischen Proben von ALL-Rezidiv-Patienten

Patnr/ LNR	KM- Blasten	Exon	Homo-/ Heterozygot	Nt- Position	Codon	Basen- Austausch	Art des Basen- Austauschs	Aminosäure- Austausch	Aminosäure- Gruppenwechs el	Klassifikation
10162/ 2773	62%	6	Heterozygot	13399	213	A>G	Transition	ARG→ARG	basisch→ basisch	Polymorphis- mus ¹¹⁸
10851/ 2827	90%	6	Heterozygot	13399	213	A>G	Transition	ARG→ARG	basisch→ basisch	Polymorphis- mus ¹¹⁸
8484/ 2623	95%	5	Homozygot	13218- 13224	180-182	delAGCGCTG	Deletion	n.d.	Frameshift	Mutation
8957/ 2669	19%	5	Heterozygot	13059	127	C>T	Transition	SER→PHE	neutral→ aromatisch	Mutation ¹²²
8725/ 2642	63%	7	Heterozygot	14060	245	G>C	Transversion	GLY→ARG	neutral→ basisch	Mutation ¹²¹
11581/ 2894	47%	7	Homozygot	14069	248	C>T	Transition	ARG→TRP	basisch→ heterozyklisch	Mutation ¹⁰⁷
9095/ 2693	92%	7	Homozygot	14070	248	G>A	Transition	ARG→GLN	basisch→ sauer	Mutation ⁹⁶
7781/ 2668	74%	8	Heterozygot	14512	281	C>A	Transversion	ASP→GLU	sauer→ sauer	Mutation ¹²³



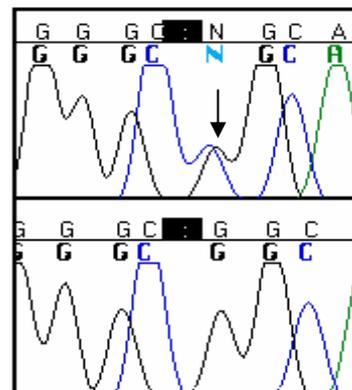
←Patient 2623 mit Deletion
delAGCGCTG auf den
Nukleotidpositionen 13218-
13224

←Wildtypsequenz eines
anderen Patienten



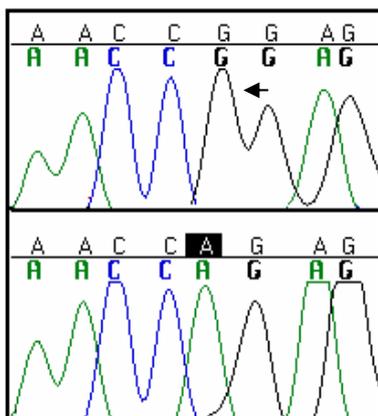
←Patient
2669
g.13059C>T
Exon 5

←Wildtyp-
sequenz
eines
anderen
Patienten



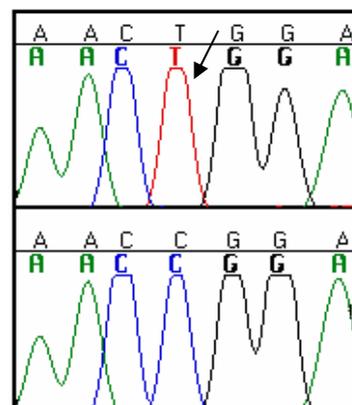
←Patient
2642
g.14060G>C
Exon 7

←Wildtyp-
sequenz
eines
anderen
Patienten



←Patient
2693
g.14070G>A
Exon 7

←Wildtyp-
sequenz
eines
anderen
Patienten

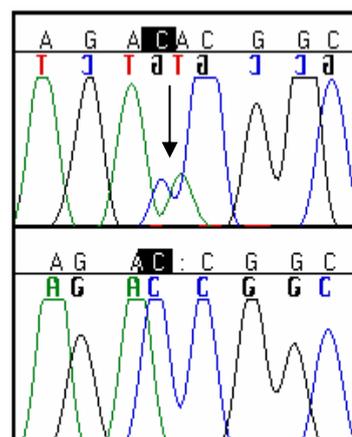


←Patient
2893
g.14069C>T
Exon 7

←Wildtyp-
sequenz
eines
anderen
Patienten

Abbildung 4.1: Chromatogramme der Mutationsanalyse des TP53-Gens bei ALL-Rezidiven im Kindesalter.

Die abgebildeten Chromatogramme zeigen Ausschnitte aus den Patientenproben, bei denen in der Sequenzierung eine TP53-Mutation detektiert werden konnte. Die Wildtypsequenz des jeweiligen Genabschnitts ist zum Vergleich mit abgedruckt.



←Patient
2668
g.14512C>A
Exon 8

←Wildtyp-
sequenz
eines
anderen
Patienten

4.2.2 Status der *TP53*-Allele bei Patientenproben mit *TP53*-Mutation zum Zeitpunkt der Rezidivdiagnose

Um den numerischen Status der *TP53*-Allele zu erheben und eine eventuelle Deletion (LOH) oder Amplifikation des *TP53*-Gens in den Leukämiezellen festzustellen, wurden Knochenmark-Ausstriche der sechs Patienten mit *TP53*-Mutation durch Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung einer kommerziellen Sonde für den *TP53*-Locus analysiert. Die Ergebnisse wurden mit dem Anteil der Blasten in der Knochenmark-Probe nach morphologischer Differenzierung korreliert und sind zusammenfassend in Tabelle 4.3 dargestellt. Da es bei der FISH abhängig von der verwendeten Sonde zu Hybridisierungsartefakten kommen kann, wurden Zellpopulationen kleiner als zehn Prozent nicht in Betracht gezogen.

Die drei Patienten, in deren Zellen sich die Mutation in der Sequenzierung heterozygot darstellte (2668, 2642, 2669), zeigen in einem Teil ihrer Zellen nur ein *TP53*-Signal. Entsprechend dem Anteil der Leukämiezellen in der Probe betrifft dieser Allelverlust (LOH) bei Patient 2668 und 2642 vermutlich nur einen Teil der Leukämiezellen, bei Patient 2669 dagegen vermutlich die Mehrheit der Leukämiezellen.

Zwei Patientenproben, bei denen sich die Mutation in der Sequenzierung homozygot darstellte (2894, 2623), weisen Zellpopulationen mit drei *TP53*-Allelen auf. Bei der Probe des Patienten 2693 ist dies vermutlich auf den Zugewinn eines Chromosoms 17 zurückzuführen, welcher aus einer anderen Analyse bekannt ist (Mikroarray-basierte vergleichende genomische Hybridisierung, Kirschner-Schwabe et al., persönliche Kommunikation). Nimmt man die Duplikation des mutierten *TP53*-Allels in den Zellpopulationen mit drei *TP53*-Signalen an, so liegt die Interpretation nahe, dass das mutierte Allel auf Grund seines Mengenüberschusses bei diesen Patienten in der PCR vor der Sequenzierung präferenziell amplifiziert wurde.

Bei der Probe des Patienten 2894 erschien die Mutation in der Sequenzierung ebenfalls homozygot, hier liegt jedoch weder eine Amplifikation noch eine Deletion des *TP53*-Allels vor. Hypothetisch lässt sich annehmen, dass die Homozygotie durch einen Verlust des normalen *TP53*-Allels und einen anschließenden Zugewinn des mutierten *TP53*-Allels (sogenannte uniparentale Disomie) in den Leukämiezellen entstanden sein könnte.

Tabelle 4.3: *TP53*-Allelstatus nach FISH-Analyse

Patnr/ LNR	Allelstatus nach Sequenzie- rung	Genetik (soweit bekannt)	Anteil KM- Blasten	Anzahl der Signale in der <i>TP53</i> -FISH			Schluss- folgerung über Allelstatus in Leukämiezellen
				1	2	3	
7781/ 2668	heterozygot	hyperdiploid/triploid in 20% der Zellen (DNA-Index=1,55)	74%	10%	88%	2%	Leukämiezellen heterozygot, ein kleiner Teil zeigt LOH (=hemizygot)
8725/ 2642	heterozygot	DNA-Index=1,00 MLL-AF4	63%	25%	73%	2%	Leukämiezellen heterozygot, ein Teil zeigt LOH (=hemizygot)
8957/ 2669	heterozygot	DNA-Index=1,00 E2A-PBX	19%	17%	83%	0%	Leukämiezellen zeigen LOH (=hemizygot)
9095/ 2693	homozygot	hyperdiploid (nach arrayCGH)	92%	5%	59%	45%	Teil der Leukämiezellen zeigt Zugewinn von <i>TP53</i> -Allel → lässt vermutlich mutiertes Allel in PCR überwiegen
8484/ 2623	homozygot	DNA-Index=1,00	95%	6%	70%	24%	Teil der Leukämiezellen zeigt Zugewinn von Chromosom 17 → lässt vermutlich mutiertes Allel in PCR überwiegen
11581 / 2893	homozygot	hyperdiploid in 79% der Zellen (DNA-Index=1,26)	47%	2%	92%	6%	Leukämiezellen homozygot für Mutation, Entstehung evtl. durch Verlust des WT <i>TP53</i> -Allels und nachfolgende Verdopplung des mutierten <i>TP53</i> - Allels (uniparentale Disomie)

4.2.3 Analyse der *TP53*-Sequenzveränderungen zum Zeitpunkt der ALL-Ersterkrankung und der Remission

Ziel dieser Analyse war es zu prüfen, ob erstens die beim Rezidiv identifizierten *TP53*-Mutationen bereits zum Zeitpunkt der Ersterkrankung vorhanden waren und zweitens, ob diese somatisch, d.h. nur in den Leukämiezellen, oder bereits in der Keimbahn der Patienten vorhanden sind. Daher wurde von den Patienten mit einer *TP53*-Mutation DNA aus Knochenmark oder peripherem Blut vom Zeitpunkt der Erstdiagnose und vom Zeitpunkt der vollständigen Remission untersucht. Hierbei wurde nur das jeweils im Rezidiv veränderte Exon sequenziert. Die Ergebnisse der Sequenzierung sind in Tabelle 4.4 zusammengefasst.

Tabelle 4.4: Analyse der *TP53*-Sequenzveränderungen zum Zeitpunkt der ALL-Ersterkrankung und der Remission

Patnr/ LNR	Ersterkrankung (Diagnose-KM)	1. Rezidiv (Diagnose- KM)	Remission				
			Patnr	Material	Zeitpunkt	Blasten- anteil	<i>TP53</i> - Mutation
8725/ 2642	nicht detektiert	heterozygot	8967	KM	nach 1.R1- Block	7%	nicht detektiert
8957/ 2669	nicht detektiert	heterozygot	9082	KM	vor F2- Block	6%	nicht detektiert
8484/ 2623	nicht detektiert	homozygot	kein Material				
7781/ 2668	heterozygot	heterozygot	7971	KM	nach F2- Block	0%	nicht detektiert
9095/ 2693	homozygot	homozygot	9584	KM	vor KMT in CR2	0%	heterozygot
			9585	pB	vor KMT in CR2	0%	heterozygot
			9361	KM	vor 1.R1- Block	0%	heterozygot
			9481	KM	vor 2.R1- Block	0%	heterozygot
11581/ 2894	nicht detektiert	homozygot	6106	KM	CR1	0%	heterozygot
			11699	KM	vor 1.R2- Block	0%	heterozygot

Insgesamt standen von fünf der sechs Patienten mit *TP53*-Mutation Proben vom Zeitpunkt der Erstdiagnose und der Remission zu Verfügung. Patient 2623, der in der Rezidiv-Probe eine Deletion gezeigt hatte, verstarb, ohne eine Remission erreicht zu haben, so dass in diesem Fall kein Remissionsmaterial zur Verfügung stand. Drei der fünf Patienten zeigten keine mit der Methode der Sequenzierung detektierbare *TP53*-Mutation zum Zeitpunkt der Remission (2642, 2669, 2668). Zwei dieser Patienten wiesen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose ebenfalls keine Mutationen auf (2642, 2669),

bei einem Patienten dagegen lag die im Rezidiv gefundene Sequenzveränderungen bereits bei der Ersterkrankung vor.

Interessanterweise wiesen zwei der fünf Patienten zum Zeitpunkt der Remission *TP53*-Mutationen an der gleichen Nukleotidposition auf wie im Rezidivmaterial (2693, 2894). In den Remissionsproben waren diese Sequenzveränderungen heterozygot, während sie zum Zeitpunkt der Rezidivdiagnose in der Sequenzierung als homozygot erschienen (vgl. dazu Kapitel 4.2.2 und Tab. 4.3). Um diesen Befund abzusichern, wurden von den zwei Patienten weitere Proben von verschiedenen Remissionszeitpunkten sequenziert. Diese wiesen ebenfalls die Mutation auf, so dass das Vorliegen einer heterozygoten Keimbahnmutation bei Patient 2693 und 2894 als wahrscheinlich angesehen werden kann. Bei Patient 2693 erschien die Mutation in der Sequenzierung zum Zeitpunkt der Ersterkrankung wie bei der Rezidivdiagnose homozygot. Im Widerspruch zu einer Keimbahnmutation war bei Patient 2894 dagegen die Mutation in der Ersterkrankung nicht nachzuweisen.

4.3 Prüfung von Zusammenhängen zwischen *TP53*-Mutationen und klinischen sowie genetisch-biologischen Parametern

Um Aussagen über die klinische und biologische Relevanz von *TP53*-Mutationen beim ALL-Rezidiv zu erhalten, wurden sowohl die wichtigsten prognostischen und genetisch-biologischen Parameter als auch das Therapieergebnis zur Korrelation mit dem *TP53*-Mutationsstatus herangezogen. Diese Daten werden im Rahmen der ALL-REZ BFM-Studie regelmässig dokumentiert. Alle nominal skalierten Daten wurden mit Fisher's exaktem Test auf statistische Signifikanz überprüft. Aufgrund der geringen Anzahl von Patienten mit *TP53*-Mutation sind die durchgeführten statistischen Analysen in ihrer Aussagekraft begrenzt. Eine Tendenz lässt sich jedoch aus ihnen ablesen. Alle überprüften Parameter sind für die Patienten mit *TP53*-Mutation in Tabelle 4.5 zusammengefasst.

Tabelle 4.5: Klinische und biologische Parameter der Patienten mit TP53-Mutation

Patnr/ LNR	Geschlecht	S- Gruppe	Immun- phänotyp	Zeitpunkt des Rezidivs	Ort des Rezidivs	Folgeereignisse	Genetik (soweit bekannt)	Anteil Zellen in S- + G2/M-Phase bei Rezidivdiagnose
8484/ 2623	männlich	4	T-ALL	früh	KM isoliert	verstorben ohne CR		13,64%
8957/ 2669	männlich	4	prä-B-ALL	sehr früh	KM isoliert	Nonresponder	E2A-PBX1 positiv	38,06%
8725/ 2642	männlich	4	pro-B-ALL	sehr früh	KM isoliert	Nonresponder	MLL-AF4 positiv	11,54%
9095/ 2693	männlich	2	prä-B-ALL	spät	KM isoliert	in CCR (nach KMT)	hyperdiploid	nicht durchgeführt
11581/ 2894	weiblich	2	prä-B-ALL	spät	KM isoliert	in CCR (nach KMT)	hyperdiploid in 79% der Zellen	22,23%
7781/ 2668	männlich	2	prä-B-ALL	spät	KM kombiniert	verstorben in CR	hyperdiploid/ triploid in 20% der Zellen	nicht durchgeführt

4.3.1 Zusammenhang zwischen *TP53*-Mutationen und der Krankheitsprognose sowie dem Therapieergebnis

Es wird vermutet, dass das Auftreten von *TP53*-Mutationen beim ALL-Rezidiv mit einer ungünstigen Prognose und einem schlechten Ansprechen auf die Therapie verbunden ist. Deshalb wurden prognostische und mit dem Therapieerfolg korrelierende Parameter der Patienten mit *TP53*-Mutation statistisch analysiert.

Wie in Kapitel 1.1.3 erwähnt, werden die Patienten in der ALL-REZ BFM-Studie in Strategiegruppen eingeteilt, um den Verlauf der Krankheit einschätzbar zu machen. Zunächst sollte ein Vergleich der Patienten mit und ohne Mutation zeigen, ob Patienten mit *TP53*-Mutation typischerweise einer bestimmten Strategiegruppe zugeordnet sind und sich dementsprechend vom Gesamtkollektiv unterscheiden. Der P-Wert von 0,819 liegt deutlich über dem gewählten Signifikanzniveau α von 0,05 (s. Tabelle 4.6). Somit weist die Gruppe mit *TP53*-Mutation im Vergleich zu Patienten ohne Mutation keinen signifikanten Unterschied in der Risikostratifizierung auf.

Die Aufteilung auf Strategiegruppen gewährt eine Gesamtrisikoeinschätzung des klinischen Verlaufs. Da aber auch jeder der in die Statistik einfließenden Faktoren einen Einzeleffekt auf die Prognose des Patienten ausübt, ist es sinnvoll, auch sie auf statistische Signifikanz hinsichtlich des *TP53*-Mutationsstatus zu überprüfen. Als erster Einzelparameter wurde der Immunphänotyp des ALL-Rezidivs zum Vergleich herangezogen. Interessanterweise ist hier ein signifikanter Unterschied in der Zusammensetzung beider Gruppen festzustellen. Der P-Wert von 0,015 (also $P < 0,05$) macht dies deutlich (s. Tabelle 4.6 für die zahlenmäßige Verteilung). 61 Prozent der Patienten ohne Mutation zeigen ein common-ALL-Rezidiv, jedoch keiner der Patienten mit Mutation. Die Mehrheit dieser Patienten weist ein Rezidiv mit prä-B-ALL-Immunphänotyp auf (4 Patienten; 66,6 Prozent). Die übrigen beiden ALL-Rezidive verteilen sich auf die pro-B-ALL und die T-ALL. Abbildung 4.2 verdeutlicht in einem Balkendiagramm die unterschiedliche Verteilung über die immunphänotypischen Subklassen.

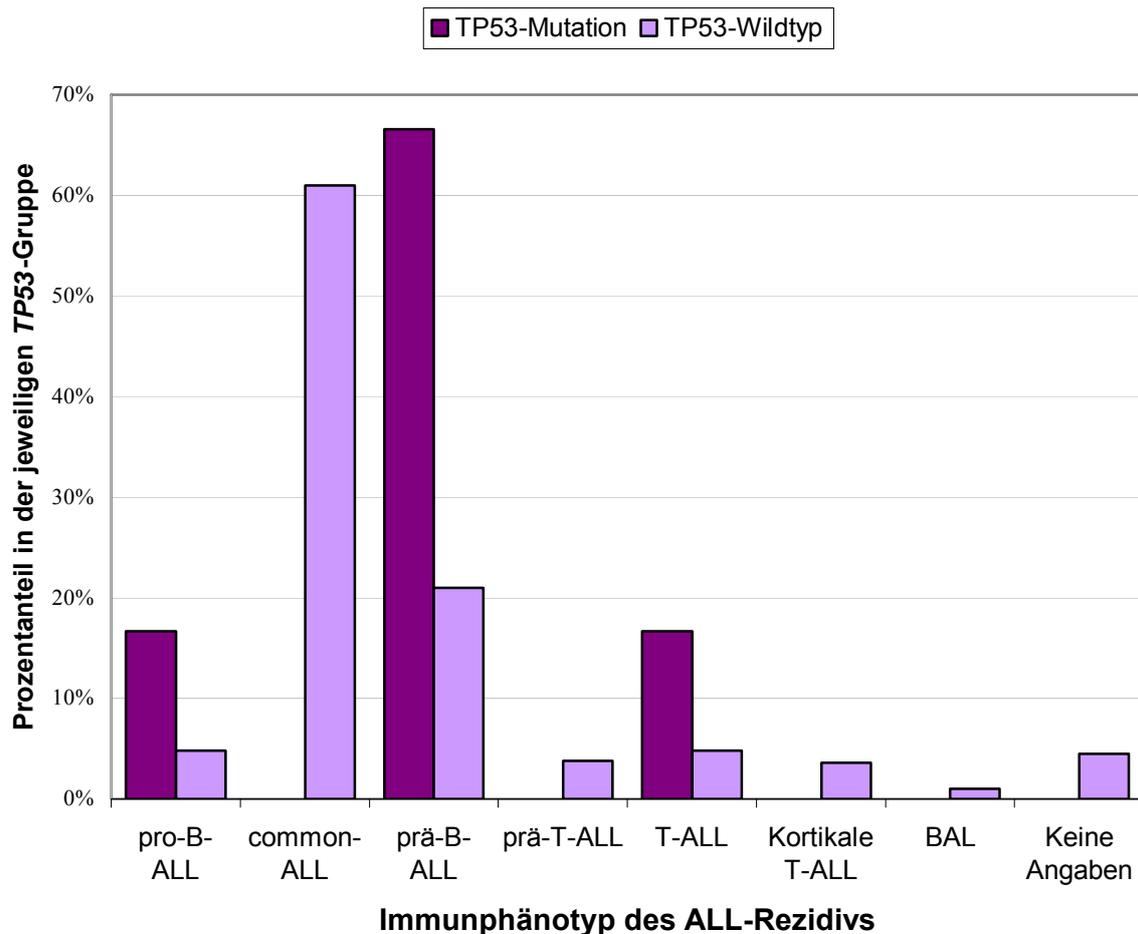


Abbildung 4.2: Verteilung des Immunphänotyps in Abhängigkeit vom *TP53*-Mutationsstatus

Weitere prognostisch wichtige Faktoren sind insbesondere der Zeitpunkt und der Ort des Rezidivs (für die genaue Einteilung s. Kapitel 1.1.3). Die Gruppe der Patienten mit *TP53*-Mutation zeigt keine Assoziation für einen bestimmten Rezidivzeitpunkt bzw. -ort (s. Tabelle 4.6). Sie ähnelt in ihrer Verteilung derart der Vergleichsgruppe, dass in der statistischen Analyse ein P-Wert von 1,0 erreicht wird.

Abschliessend wurde das Ergebnis der Therapie als wichtiger Anhaltspunkt für Erfolg oder Misserfolg der Behandlung im Zusammenhang mit dem *TP53*-Mutationsstatus betrachtet. Auch hier lässt sich keine signifikant andere Verteilung zwischen den beiden Gruppen feststellen ($P=0,08$ bei $\alpha=0,05$, s. Tabelle 4.6). Der P-Wert liegt in diesem Fall aber in der Nähe der Signifikanzschwelle, was als Hinweis auf einen, wenn auch

geringen, Unterschied zwischen den Gruppen gedeutet werden kann. So befinden sich 52,7 Prozent der Patienten ohne Mutation in anhaltender vollständiger Remission (engl. *continuous complete remission*, CCR), während dies bei der Gruppe mit Mutationen nur 33,3 Prozent sind. Die negativen Folgeereignisse (verstorben in CR, erneut rezidiert, Nonresponder, verstorben ohne CR) machen in der Gruppe mit *TP53*-Mutationen 66,7 Prozent aus, während diese in der Gruppe ohne Mutationen nur 46,2 Prozent stellen.

4.3.2 Zusammenhang zwischen *TP53*-Mutationen und genetischen Faktoren

Bestimmte genetische Faktoren wie chromosomale Translokationen und Hyperdiploidie (vgl. Kapitel 1.1.3) sind beim ALL-Rezidiv mit der Prognose und dem Therapieergebnis assoziiert. Daher wurde das Vorliegen von translokationsassoziierten Fusionsgenen sowie einer starken Hyperdiploidie (entsprechend einem DNA-Index von größer oder gleich 1,16 in der DNA-Durchflusszytometrie) im vorliegenden Patientenkollektiv in Relation zum *TP53*-Status gesetzt (s. Tabelle 4.6). Ein P-Wert von 0,153 zeigt jedoch, dass auch in diesem Zusammenhang keine Korrelation zu einer Mutation des *TP53*-Gens besteht.

Tabelle 4.6: Korrelationen zwischen dem *TP53*-Status und klinischen bzw. genetischen Merkmalen der untersuchten Patienten

	Patienten mit <i>TP53</i> -Mutation (%)		Patienten ohne <i>TP53</i> -Mutation (%)		Gesamt (%)		P-Wert Fisher's exakter Test
Immunphänotyp							0,015
pro-B-ALL	1	(16,7)	5	(4,6)	6	(5,4)	
common-ALL	0	(0)	64	(61)	64	(57,7)	
prä-B-ALL	4	(66,6)	22	(21)	26	(23,4)	
prä-T-ALL	0	(0)	4	(3,8)	4	(3,6)	
T-ALL	1	(16,7)	5	(4,7)	6	(5,4)	
Kortikale T-ALL	0	(0)	4	(3,8)	4	(3,6)	
BAL (biphänotypisch)	0	(0)	1	(1)	1	(0,9)	
keine Angaben	0		5		5		
Zeitpunkt des Rezidivs							1,000
sehr früh	2	(33,3)	36	(32,7)	38	(32,8)	
früh	1	(16,7)	15	(13,6)	16	(13,8)	
spät	3	(50)	59	(53,6)	62	(53,4)	
Ort des Rezidivs							1,000
KM isoliert	5	(83,3)	91	(82,7)	96	(82,8)	
KM kombiniert	1	(16,7)	19	(17,3)	20	(17,2)	
Strategiegruppe							0,819
S2	3	(50)	60	(54,5)	63	(54,3)	
S3	0	(0)	10	(9,1)	10	(8,6)	
S4	3	(50)	40	(36,4)	43	(37,1)	
Folgeereignis							0,080
in CCR	2	(33,3)	58	(53,2)	60	(52,2)	
verstorben in CR	1	(16,7)	5	(4,6)	6	(5,2)	
erneut rezidiert	0	(0)	27	(24,8)	27	(23,5)	

Fortsetzung Tabelle 4.6						
Nonresponder	2	(33,3)	16	(14,7)	18	(15,6)
Induktionstod	1	(16,7)	3	(2,7)	4	(3,5)
keine Angaben	0		1		1	
Fusionsgen-Konstellation						0,153
TEL-AML1	0	(0)	18	(16,4)	18	(15,5)
BCR-ABL	0	(0)	2	(1,8)	2	(1,7)
MLL-AF4	1	(16,7)	4	(3,6)	5	(4,3)
MLL-ENL	0	(0)	1	(0,9)	1	(0,9)
E2A-PBX	1	(16,7)	2	(1,8)	3	(2,6)
Hyperdiploidie	1	(16,7)	15	(13,6)	16	(13,8)
Andere	3	(50)	68	(61,8)	71	(61,2)
Gesamt	6		110		116	

4.3.3 Zusammenhang zwischen *TP53*-Mutationen und der proliferativen Kapazität leukämischer Blasten

Sehr frühe, prognostisch ungünstige ALL-Rezidive korrelieren mit einer erhöhten proliferativen Kapazität der leukämischen Blasten¹¹⁰. Da eine Mutation von *TP53* aufgrund seiner wichtigen Rolle in der Zellzykluskontrolle eine unkontrollierte Proliferation der Zelle bewirken kann, sollte in der vorliegenden Arbeit ein möglicher Zusammenhang zwischen einer Mutation dieses Gens und der gesteigerten Wachstumsrate leukämischer Blasten überprüft werden.

Bei 98 der 116 untersuchten Patientenproben (4 Proben mit *TP53*-Mutation, 94 Proben ohne Mutation) wurde im Rahmen der molekularbiologischen Begleituntersuchungen der ALL-REZ BFM Studie eine Messung der Zellzyklusverteilung mittels Durchflusszytometrie durchgeführt, bei der jeweils der Anteil der in G0/G1-, G2/M- oder S-Phase vorliegenden Zellen bestimmt wurde. Da die Gruppe mit *TP53*-Mutationen nur vier Patienten umfasst, kann kein statistischer Test für den Vergleich beider Gruppen

herangezogen werden. Es kann jedoch folgendes Bild anhand des Vergleichs der Mediane festgehalten werden: Der Anteil an Zellen in S- und G2/M-Phase (entsprechend dem mutmaßlich proliferierenden Anteil an Zellen) ist im Kollektiv der ALL-Rezidive mit Mutation höher (s. Tabelle 4.7). Während die ALL-Rezidive ohne Mutation einen Anteil von 5,52 Prozent (Median) an Zellen in der S- und G2/M-Phase aufweisen, sind dies bei den Rezidiven mit Mutation 13,64 Prozent. Sowohl der minimale als auch der maximale Wert fallen in der Gruppe mit Mutationen höher aus.

Tabelle 4.7: Korrelation zwischen dem *TP53*-Status und dem prozentualen Anteil von Zellen in der S- und G2/M-Phase

<i>TP53</i>-Status	Anzahl analysierte Patienten	Median	Minimum	Maximum
<i>TP53</i> -Mutation	4	17,55%	11,54%	38,06%
<i>TP53</i> -Wildtyp	94	5,52%	0,27%	33,45%

5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersucht den *TP53*-Mutationsstatus bei ALL-Erstrezidiven im Kindesalter. Dabei sollte die Häufigkeit von *TP53*-Mutationen ebenso analysiert werden wie eine mögliche Assoziation zwischen *TP53*-Mutationen einerseits und prognostischen und biologischen Parameter andererseits.

5.1 Inzidenz von *TP53*-Mutationen beim ALL-Rezidiv

Nach Durchführung zahlreicher Studien über den Mutationsstatus von *TP53* in der ALL-Ersterkrankung¹⁻⁹ zwischen 1991 und 2003 herrscht in der Literatur weitgehend Einigkeit darüber, dass *TP53*-Mutationen in diesem Krankheitsstadium keine größere Rolle spielen. Bestätigt wird dieses Bild vor allem durch eine Studie von Wada et al., die bei 293 untersuchten ALL-Ersterkrankungspatienten drei Mutationen detektieren konnte (3/293, ca. ein Prozent)¹²⁴ (s. auch Tabelle 5.1). Eine Metaanalyse der bis jetzt durchgeführten Studien zu diesem Thema ergibt eine *TP53*-Mutationsrate bei der Ersterkrankung von fünf Prozent (s. dazu Kapitel 1.3.1). Die Mutation dieses für die Zellzyklusregulation so eminent wichtigen Tumorsuppressorgens scheint also, im Gegensatz zu soliden Tumoren wie Mamma⁸⁶-, Bronchial⁸⁵- oder Kolonkarzinomen⁸⁴, keine wesentliche pathogenetische Ursache für die Leukämogenese in der Ersterkrankung einer akuten lymphoblastischen Leukämie darzustellen.

Im Gegensatz dazu wird jedoch weiterhin ein pathogenetischer Zusammenhang zwischen der Rezidiventstehung einer ALL und Mutationen im *TP53*-Gen vermutet. Grundlage für diese Hypothese ist die Assoziation von *TP53*-Mutationen mit einem schlechteren klinischen Verlauf, Krankheitsprogression und Therapieresistenz^{108, 125, 126} (s. dazu auch Kapitel 1.3.2). Viele Studien haben im Verlauf der vergangenen 15 Jahre versucht, diese Annahme zu überprüfen. Die verschiedenen Untersuchungen von ALL-Rezidiven beschreiben jedoch stark voneinander abweichende Mutationsraten zwischen 0 und 38 Prozent^{3, 4, 7, 8, 17-25}. Ein Problem bei all diesen Studien ist die relativ geringe Anzahl an untersuchten Patienten (zwischen 3 und 51 analysierten Patientenproben). Zu kleine Patientenkollektive schmälern die Aussagekraft einer Studie und sind hinsichtlich Ausreißern empfänglich. Viele der in Tabelle 5.1 aufgeführten Studien weisen in ihrer Veröffentlichung ausdrücklich auf diese Problematik hin. In einigen Studien wurde darüber hinaus nicht zwischen Erst- und

Mehrfach-Rezidiven unterschieden^{94, 105}, was einen Vergleich zusätzlich erschwert. Ferner ist auch die Beschränkung einiger Studien auf bestimmte Immunphänotypen problematisch. So hat die bis jetzt größte Studie zum *TP53*-Mutationsstatus nur 51 T-ALL-Rezidive untersucht⁹². Diese bilden jedoch im Gesamtkollektiv aller Rezidivpatienten einen relativ geringen Anteil von rund 14 Prozent². Zudem sind sie beim Rezidiv per se mit einer schlechteren Prognose assoziiert^{2, 26, 27} und es besteht ein möglicher Zusammenhang zwischen diesem Immunphänotyp und *TP53*-Mutationen^{92, 96, 102}. Aus diesem Grund kann es zu einer Verzerrung der Analyse durch die ausschließliche Betrachtung von T-ALL-Rezidiven in diesem Kontext kommen.

Aus den genannten Gründen legt die vorliegende Untersuchung Wert auf ein ausreichend großes Patientenkollektiv sowie auf die Repräsentativität der Stichprobe innerhalb der ALL-Rezidiv-Patienten der Therapieoptimierungsstudie ALL-REZ BFM. Für die Analyse wurde daher eine repräsentative Gruppe von 116 Patienten mit isoliertem oder kombiniertem Knochenmark-Erstrezidiv, die gemäß dem ALL-REZ BFM 2002-Protokoll behandelt worden waren, ausgewählt. Von der aus leukämischen Knochenmark-Blasten isolierten DNA wurden Exon 5 bis 8 des *TP53*-Gens sequenziert. Bei den 116 ALL-Erstrezidivproben wurde in sechs Fällen eine Mutation gefunden. Dies entspricht einer *TP53*-Mutationsrate von gerundet fünf Prozent. Entgegen den Annahmen sind *TP53*-Mutationen bei ALL-Rezidiven somit ein eher seltenes Ereignis. Gegenüber der Ersterkrankung ist die Mutationsrate annähernd gleich (s. Kapitel 1.3.1). Ein Zusammenhang zwischen *TP53*-Mutationen und einer ALL-Rezidivierung erscheint unwahrscheinlich.

Eine Zusammenfassung der einzelnen Studien zu *TP53*-Mutationen beim ALL-Rezidiv zeigt Tabelle 5.1, zusammen mit der größten Ersterkrankungsstudie (Wada et al.¹²⁴) und der Einordnung der eigenen Ergebnisse.

Tabelle 5.1: Analyse von Studien zum *TP53*-Mutationsstatus bei ALL-Ersterkrankung und ALL-Rezidiven

Anzahl analysierter Patienten (Kinder/ Erwachsene)	Untersuchte Exons	Anzahl Mutationen	Mutationsrate in Prozent	Immunphänotyp (soweit bekannt)	Referenz
<u>Ersterkrankung</u>					
293 (293/0)	5-8	3	1%	B-Vorläuferzell-ALL, T-ALL	Wada et al. 1993 ¹²⁴
<u>Rezidiv</u>					
17 (17/0)	5-8	0	0%	B-Vorläuferzell-ALL, T-ALL	Gump et al. 2001 ¹⁰¹
42 (42/0)	5-8	2	5%	B-Vorläuferzell-ALL	Zhou et al. 2000 ¹⁰⁶
14 (14/0)	5-9	1	7%	T-ALL	Kawamura et al. 1999 ⁹⁶
18 (18/0)		2	11%		Cimino et al. 1997 ¹²⁷
37 (37/0)	5-8	7	19%	B-Vorläuferzell-ALL, T-ALL	Blau et al. 1997 ⁹¹
24 (0/24)		5	21%		Tang et al. 1998 ¹⁰⁵
51 (51/0)	4-8	12	24%	T-ALL	Diccianni et al. 1994 ⁹²
4 (4/0)	4-8	1	25%		Megonigal et al. 1998 ¹⁰³
14	5-9	4	29%	B-Vorläuferzell-ALL	Zhu et al. 1999 ¹⁰⁷
3 (2/1)	5-9	1	33%	B-Vorläuferzell-ALL	Nomdedéu et al. 1997 ¹⁰⁴
9 (9/0)	5-8	3	33%	B-Vorläuferzell-ALL, T-ALL	Felix et al. 1992 ¹⁰⁰
29 (22/7)	5-9	11	38%	B-Vorläuferzell-ALL, T-ALL	Göker et al. 1995 ⁹⁴
<u>Vorliegende Analyse (Rezidiv)</u>					
116 (116/0)	5-8	6	5%	B-Vorläuferzell-ALL, T-ALL	vorliegende Arbeit 2007

5.2 Art der identifizierten *TP53*-Mutationen und funktionelle Konsequenz

In der vorliegenden Arbeit wurden sechs Mutationen im *TP53*-Gen detektiert. Im Vergleich mit anderen Studien stellt sich folgendes Bild dar: Von den sechs Mutationen sind nur zwei schon bei anderen ALL-Rezidiven gefunden worden (s. Tabelle 5.2). Hierbei handelt es sich um die Mutation g.14060G>C auf Codon 245 und eine der beiden Mutationen auf Codon 248 (g.14070G>A). Codon 245 und 248 gehören zu den am häufigsten mutierten Basen-Triplets des Gens *TP53* (*hot spots*). Dass die anderen hier detektierten Mutationen bis jetzt nicht in der ALL gefunden wurden, spricht dafür, dass es kein systematisches Verteilungsmuster für *TP53*-Mutationen bei dieser Erkrankung gibt. In den zwei größten *TP53*-Datenbanken (IARC *TP53* Mutation Database⁷⁰ Version R11 (Oktober 2006) und UMD *TP53* Mutation Database R1 (Januar 2007)⁴⁰) sind aber alle hier gefundenen *missense*-Mutationen dokumentiert. Nur die Deletion in Exon 5 (g.13218-13224delAGCGCTG) ist in diesem Ausmaß noch nicht in einer Datenbank registriert. Es finden sich lediglich Einträge zu Deletionen an Nukleotidposition 13218, 13221 und 13223.

Im Rahmen der vorliegenden Analyse wurden keine Untersuchungen zum biochemischen Verhalten des mutierten Proteins durchgeführt. In der Literatur sind jedoch Experimente zu diesem Zweck unternommen worden. Die Auswirkungen verschiedener *TP53*-Mutationen können als stark heterogen angesehen werden. Alle bisher untersuchten Mutationen zeigen eine einzigartige Verhaltensweise hinsichtlich ihrer Wirkweise in Zelllinien und Mausmodellen. Dennoch können sie, wie in Kapitel 1.2.4 erläutert, in drei funktionelle Klassen eingeteilt werden. Es kann festgehalten werden, dass alle in dieser Untersuchung beim ALL-Rezidiv gefundenen Mutationen in der DNA-Bindungs-Domäne lokalisiert sind. Im Einzelnen gehören nur die *missense*-Mutationen auf Codon 248 (Arg²⁴⁸) zu den Mutationen der Klasse I, welche die direkte Bindung des Proteins mit der DNA-Zielsequenz stören. Alle weiteren *missense*-Mutationen können zur Klasse II gezählt werden, die durch strukturelle Veränderungen eine Destabilisierung der DNA-bindenden Proteinoberfläche bewirken kann. Die Deletion gehört zur Klasse III der Mutationen und hat durch ein vorzeitiges Stop-Codon ein verkürztes und in seiner Funktion eingeschränktes Protein oder sogar den Verlust des Proteins durch Abbau der mRNA durch *nonsense mediated decay*¹²⁰ zur Folge.

Bis auf die Deletion sind zu allen identifizierten Mutationen in der Literatur Funktionsanalysen in Hefe und Zelllinien beschrieben (Zusammenfassung und Referenzen s. Tabelle 5.2). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in den untersuchten Systemen alle Mutationen zu einer Herabsetzung oder einem Verlust der transkriptionellen Aktivität des Proteins führen. Diese Aussage deckt sich mit der Beobachtung von Kato et al.¹²⁸, dass zwei Drittel aller *TP53*-Mutationen in der Kerndomäne zu einer funktionellen Inaktivierung des Proteins führen. Des Weiteren entfalten vier der Mutationen vermutlich zusätzlich eine dominant-negative Aktivität gegenüber dem Wildtyp-Protein und unterdrücken auf diese Weise die p53-Wildtyp-Funktion. Dieser Mechanismus ist vor allem bei heterozygoten Mutationen von Interesse, bei denen Wildtyp- und mutiertes Allel parallel vorliegen.

Von den identifizierten *missense*-Mutationen stellten sich in der Sequenzierung drei als heterozygot dar. Durch Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung konnte gezeigt werden, dass bei einem dieser Patienten ein Verlust des zweiten *TP53*-Allels (LOH) in einer Zellpopulation vorliegt, die dem Anteil der Leukämiezellen in der Probe entspricht. Die Leukämiezellen sind somit vermutlich hemizygot für das mutierte *TP53*-Allel, während die beim Sequenzieren sichtbare Wildtypsequenz von normalen hämatopoetischen Zellen in der Probe stammt. Eine dominant-negative Auswirkung des mutierten Proteins ist in diesem Fall daher eher unwahrscheinlich. Bei den weiteren zwei Patienten konnte ein LOH nur in einem Teil der Leukämiezellen nachgewiesen werden, so dass eine dominant-negative Auswirkung des mutierten Proteins in Betracht gezogen werden kann.

Bis heute stehen nur wenige Daten über einen LOH bei *TP53*-Mutationen zur Verfügung¹²⁹. Diese bestätigen jedoch näherungsweise die in der vorliegenden Analyse vorgefundene LOH-Rate von 50 Prozent bei *TP53*-Mutationen (in der Literatur ca. 60 Prozent).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sehr wahrscheinlich alle in dieser Untersuchung detektierten *TP53*-Mutationen durch einen Funktionsverlust und/oder durch eine zusätzliche dominant negative Funktion des mutierten Proteins den p53-Signalweg beeinträchtigen.

Tabelle 5.2: Mögliche Auswirkungen der identifizierten TP53-Mutationen auf die Funktion von TP53

Mutation	bekannt bei	Art der Mutation / Klasse	mögliche funktionelle Auswirkungen	Referenz
Codon 180-182 Nt 13218-224 Homozygot	bis jetzt in der Literatur nicht bekannt	Deletion Klasse III	möglicherweise aberrantes Protein oder Abbau der mRNA durch <i>nonsense mediated mRNA decay</i>	-
Codon 127 Nt 13059 Heterozygot	u.a. Basazellkarzinom der Haut ¹³⁰	<i>missense</i> Klasse II	stark herabgesetzte transkriptionelle Aktivität	Kato et al ¹²⁸
Codon 245 Nt 14060 Heterozygot	u.a. ALL-Rezidiv ¹³¹	<i>missense</i> Klasse II	stark herabgesetzte transkriptionelle Aktivität, vermutlich Inhibition von Wt-p53	Kato et al ¹²⁸ Monti et al ¹³²
Codon 248 Nt 14069 Homozygot	<i>hot spot</i> Mutation, u.a. Burkitt-Lymphom ¹³³	<i>missense</i> Klasse I	Verlust der transkriptionellen Aktivität, vermutlich Inhibition von Wt-p53	Kato et al ¹²⁸ Dearth et al ¹²⁹ Monti et al ¹³²
Codon 248 Nt 14070 Homozygot	<i>hot spot</i> Mutation, u.a. ALL-Rezidiv ^{91, 105}	<i>missense</i> Klasse I	Verlust der transkriptionellen Aktivität, vermutlich Inhibition von Wt-p53	Kato et al ¹²⁸ Dearth et al ¹²⁹
Codon 281 Nt 14512 Heterozygot	u.a. B-CLL ¹²³	<i>missense</i> Klasse II	stark herabgesetzte transkriptionelle Aktivität, vermutlich Inhibition von Wt-p53	Kato et al ¹²⁸ Monti et al ¹³²

5.3 Entstehungszeitpunkt von TP53-Mutationen bei der ALL

Der Zeitpunkt des Auftretens einer TP53-Mutation im Krankheitsverlauf ist immer wieder Gegenstand von Diskussionen. Es existiert die These, dass sich TP53-Mutationen bei der ALL erst beim Rezidiv entwickeln und so eine wichtige Rolle in der Krankheitsprogression spielen. Eine andere Hypothese spricht davon, dass eine Minderheit von Subklonen mit TP53-Mutation schon bei der Ersterkrankung vorliegen kann und durch Selektion die bestimmende Zelle im Rezidiv wird^{107, 131}. Studien zu

diesem Thema zeigen zumeist heterogene Ergebnisse mit einer geringen Zahl an Patienten, die auch schon zum Zeitpunkt der Ersterkrankung die im Rezidiv gefundene Mutation aufweisen^{91, 92, 100}.

Um die oben aufgeführten Thesen am vorliegenden Patientenkollektiv zu überprüfen, wurde von allen Patienten mit Mutation Ersterkrankungsknochenmark sequenziert. Die bei dieser Untersuchung erhaltenen Ergebnisse reihen sich angesichts ihrer Heterogenität in die vorhergehenden Studien ein: Zwei Patienten weisen auch in der Ersterkrankung die später detektierte Mutation auf, vier Patienten zeigen zu diesem Zeitpunkt nur Wildtyp-*TP53*-Sequenzen. Zu bedenken ist in diesem Kontext, dass die Nachweisschwelle für mutierte Zellen bei der automatischen DNA-Sequenzierung bei ca. 10 Prozent liegt¹³³. Eventuelle Subklone mit einem prozentualen Anteil von unter 10 Prozent in der Probe wären auf diesem Wege nicht nachweisbar. Angesichts dieser technischen Limitationen können nur begrenzt Schlüsse aus den vorliegenden Ergebnissen gezogen werden. Die Annahme scheint jedoch gerechtfertigt, dass der Großteil der *TP53*-Mutationen zum Zeitpunkt der ALL-Ersterkrankung noch nicht den Leukämie-Hauptklon bildet.

5.4 Korrelation des *TP53*-Mutationsstatus mit klinischen und molekularbiologischen Parametern

In der vorliegenden Untersuchung sollte neben der Inzidenz von *TP53*-Mutationen beim ALL-Rezidiv auch eine mögliche Korrelation dieser Mutationen mit molekularbiologischen Charakteristika des Rezidivs, der Prognose und dem Therapieergebnis der Patienten festgestellt werden. Da jedoch entgegen der ursprünglichen Annahme überhaupt nur eine geringe Häufigkeit von *TP53*-Mutationen beim ALL-Rezidiv gefunden wurde, ist die Gruppe von sechs Patienten mit einer *TP53*-Mutation sehr klein und kann deshalb in der statistischen Analyse einen Fehler 2. Art begünstigen (systematische Unterschiede werden nicht erkannt, obwohl sie existieren). Dieses Problem ließe sich nur mit einer genügend großen Patientenzahl lösen, für deren Rekrutierung allein Jahrzehnte notwendig wären. Deshalb werden im Folgenden auch statistisch nicht signifikante Unterschiede diskutiert, wenn sie eine Tendenz zur Divergenz andeuten.

Die Hypothese, dass *TP53*-Mutationen mit Prognose und Biologie des ALL-Rezidivs assoziiert sein könnten, wurde angeregt durch eine Arbeit von Kirschner-Schwabe et

al.¹¹⁰. In dieser Studie wurde gezeigt, dass sehr früh nach der Erstdiagnose auftretende ALL-Rezidive, die eine schlechte Prognose aufweisen, durch eine Hochregulation von Zellzyklus-Genen gekennzeichnet sind, deren Funktionen insbesondere in der Mitose angesiedelt sind. Dies korrelierte mit einem erhöhten Anteil von Zellen in den „Proliferationsphasen“ S und G2/M des Zellzyklus in den Rezidivproben, so dass eine erhöhte proliferative Kapazität der leukämischen Blasten bei Patienten mit Frührezidiv angenommen wurde. Da das Protein p53 ein wichtiger Bestandteil der Zellzykluskontrolle ist, und eine Beeinträchtigung seiner Funktion durch Mutation eine unkontrollierte Proliferation der Zellen zur Folge haben kann, sollte ein Zusammenhang von *TP53*-Mutationen mit dem Zeitpunkt des Rezidivs und der Zellzyklusverteilung geprüft werden. Es wurde jedoch keine signifikant distinkte Verteilung der Patienten mit *TP53*-Mutation im Hinblick auf den Zeitpunkt des Rezidivs festgestellt. Gleiches gilt für den Ort des Rezidivs, welcher neben dem Zeitpunkt des Rezidivs ein weiterer wichtiger prognostischer Faktor ist.

In Bezug auf die Zellzyklusverteilung konnte dagegen ein Unterschied zwischen der Patientengruppe mit und der Gruppe ohne Mutationen gefunden werden. Die *TP53*-Patienten mit Mutation zeigten eine deutlich höhere Fraktion von Zellen in der G2/M- und der S-Phase. Dies ermöglicht die Annahme, dass *TP53*-Mutationen zwar nicht generell, aber doch in einem Subset der Patienten durch Veränderung der Zellzykluskontrolle zu einer erhöhten proliferativen Kapazität der leukämischen Blasten beitragen.

Ferner sollte eine mögliche Korrelation zwischen *TP53*-Mutation und bestimmten genetischen Veränderungen bei der ALL (Vorliegen translokationsassoziierter Fusionsgene, Hyperdiploidie) untersucht werden. In der Literatur sind dazu nur wenige Studien vorhanden^{103, 134}. Kustanovich et al.¹³⁴ stellten fest, dass die Gruppe der *E2A-PBX1*-positiven ALL-Patienten deutlich häufiger eine aberrante p53-Expression aufweist als eine negative Vergleichsgruppe. Die hier vorliegende Untersuchung kann diese Feststellung unterstützen: Einer von sechs Patienten mit *TP53*-Mutation weist die t(1;19)-Translokation auf, während es in der Vergleichsgruppe nur 1,8 Prozent sind. In diesem Fall ist darüber hinaus auch die Betrachtung des Immunphänotyps interessant: Das Fusionsgen *E2A-PBX1* ist vor allem mit der prä-B-ALL assoziiert (25 Prozent der prä-B-ALLs¹³⁵). Der Patient mit *TP53*-Mutation und *E2A-PBX1*-Fusionsgen dieser Untersuchung präsentiert den Immunphänotyp einer prä-B-ALL und hat als

Nonresponder ein schlechtes Therapieergebnis erzielt. Da die vorliegende Analyse zudem ein signifikant gehäuftes Auftreten von *TP53*-Mutationen bei prä-B-ALLs detektieren konnte, lässt sich im Umkehrschluss spekulieren, dass die drei Merkmale prä-B-ALL, t(1;19) und *TP53*-Mutation bei gemeinsamem Auftreten ein Subset von ALL-Patienten mit schlechter Prognose charakterisieren könnten. Zusammenfassend muss jedoch festgehalten werden, dass die vorliegende Untersuchung keine statistisch signifikante Assoziation zwischen dem Auftreten eines bestimmten Fusionsgens bzw. der Hyperdiploidie und *TP53*-Mutationen feststellen konnte.

Zusätzlich wurde ein Zusammenhang zwischen den entdeckten *TP53*-Mutationen einerseits und dem Therapieergebnis der Patienten andererseits überprüft: Die Analyse der Folgeereignisse, anhand derer der klinische Verlauf der Patienten eingeschätzt werden kann, erbrachte keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Gruppe mit und ohne *TP53*-Mutationen. Die Beobachtung, dass der Großteil der eine Mutation aufweisenden Patienten keine anhaltende komplette Remission erreichen konnte und die Mehrheit (4 von 6 Patienten) inzwischen verstorben ist, konnte statistisch nicht gesichert werden. Dies ist ein interessanter Aspekt, da in anderen Studien aus ähnlichen Daten Schlussfolgerungen über den klinischen Verlauf von *TP53*-Mutationspatienten gezogen wurden^{92, 96, 104} und auf deren Grundlage eine Verbindung zwischen *TP53*-Mutationen und einer schlechteren Prognose (charakterisiert durch eine kürzere Remissionszeit, ein schlechteres Ansprechen auf die Reinduktionstherapie und eine kürzere Überlebensdauer) hergestellt wurde. Unter Berücksichtigung aller bis jetzt erfolgten Studien kann jedoch festgehalten werden, dass zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine statistisch gesicherten Aussagen vorliegen, die *TP53*-Mutationen im Gesamtkollektiv von ALL-Rezidiven (d.h. inklusive B-Vorläuferzell- und T-ALL) mit einer schlechteren Prognose in Verbindung setzen.

5.5 Rolle erblicher *TP53*-Mutationen bei der ALL (Li-Fraumeni Syndrom)

In der vorliegenden Untersuchung fanden sich zwei der als *TP53*-Mutationen klassifizierten Sequenzveränderungen auch zum Zeitpunkt der Remission in den Knochenmarkszellen der Patienten wieder und sind daher als Keimbahnmutationen zu deuten. Die Entnahme und Sequenzanalyse einer nicht-hämatopoetischen Gewebeprobe der Patienten zur Bestätigung dieser Befunde ist ethisch nicht vertretbar,

da sich keine diagnostischen oder therapeutischen Konsequenzen anschliessen würden. Daher wurde die Annahme einer Keimbahnmutation durch die Untersuchung von zwei oder mehr unabhängigen Knochenmark- oder Blutproben aus dem Stadium der Remission gesichert.

Bei einem der beiden Patienten konnte jedoch im Widerspruch zu einer Keimbahnmutation die vorhandene Mutation nicht zum Zeitpunkt der Diagnose der Ersterkrankung nachgewiesen werden. Möglicherweise ist hier das mutierte Allel in den leukämischen Zellen der Ersterkrankung deletiert (LOH), so dass nur das *TP53*-Wildtyp-Allel in Erscheinung tritt. Diese Vermutung könnte mittels FISH überprüft werden, ebenso wie eine Probenverwechslung durch die Analyse einer unabhängigen diagnostischen Probe der Ersterkrankung ausgeschlossen werden könnte. Leider standen trotz intensiver Recherche keine Proben zu diesen Zwecken zur Verfügung.

Erbliche *TP53*-Mutationen sind häufig mit dem Auftreten eines Li-Fraumeni Syndroms (LFS) verbunden. Dies ist folgendermaßen definiert: Der Proband erleidet vor dem 45. Lebensjahr ein Sarkom. Ein Verwandter ersten Grades präsentiert vor dem 45. Lebensjahr eine nicht weiter spezifizierte Tumorerkrankung und ein weiterer Verwandter ersten oder zweiten Grades derselben Familienlinie zeigt entweder irgendeine Krebserkrankung vor dem 45. Lebensjahr oder ohne Altersbegrenzung ein Sarkom¹³⁶. Diese Definition wurde für das Li-Fraumeni-ähnliche Syndrom (engl. *Li-Fraumeni-like syndrome*, LFL) wie folgt erweitert: Der Proband weist irgendeine Tumorerkrankung im Kindesalter oder ein Sarkom, Hirntumor oder adrenokortikalen Tumor vor dem 45. Lebensjahr auf. Ein Verwandter ersten oder zweiten Grades zeigt zu irgendeinem Zeitpunkt das Bild eines typischen LFS-Tumors (betroffene Tumorentitäten s. Kapitel 1.2.4) und ein weiterer Verwandter ersten oder zweiten Grades derselben Familienlinie erleidet irgendeine Form der Krebserkrankung vor dem 60. Lebensjahr. Doch auch *de novo*-Mutationen bei Patienten ohne ein gehäuftes Auftreten von Krebserkrankungen in der Familie sind in der Literatur beschrieben¹³⁷⁻¹³⁹.

Anamnestisch gibt es bei beiden Patienten keine Hinweise auf ein gehäuftes Auftreten von Tumorerkrankungen in den betroffenen Familien. Dies deutet auf die Möglichkeit hin, dass die *TP53*-Mutationen in der Keimbahn dieser Patienten *de novo* entstanden sind. Eine genetische Untersuchung der Eltern zum Beweis dieser Annahme ist jedoch aus ethischen Gründen nicht durchführbar, da es eine nicht vertretbare Belastung der Familien darstellen würde.

In der von Li und Fraumeni geprägten Definition des Li-Fraumeni-Syndroms gehören Leukämien zu den Tumorentitäten, die ein häufiger Bestandteil dieses Syndroms sein können¹³⁶. Doch werden *TP53*-Keimbahnmutationen in der Literatur nur selten mit der akuten lymphoblastischen Leukämie direkt in Verbindung gebracht. Bis heute existieren sechs Veröffentlichungen, in denen eine ALL als Bestandteil eines LFS dokumentiert ist^{91, 100, 136-138, 140}. In allen geschilderten Fällen handelt es sich um Angehörige von Familien mit einem gehäuften Auftreten von anderen Tumorerkrankungen in der Anamnese. Das alleinige Auftreten einer ALL in Verbindung mit einer *TP53*-Mutation ohne entsprechende Tumoranamnese in der Familie ist dementsprechend eher als untypisch zu bewerten. Diese Annahme kann jedoch auch dadurch verfälscht werden, dass in Studien zu *TP53*-Mutationen bei der ALL und ihrem Rezidiv nur in wenigen Fällen der Keimbahnstatus der Patienten mit untersucht wurde. Von den in Tabelle 5.1 zitierten Rezidiv-Studien untersuchten nur zwei ihre Patienten auf mögliche Keimbahnmutationen^{91, 100}. Beide konnten unter den ALL-Rezidiven mit Mutation jeweils eins von vier bzw. zwei von sieben Rezidiven mit Keimbahn-*TP53*-Mutation ausmachen. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem Resultat der hier vorliegenden Untersuchung, in der zwei von sechs Patienten eine *TP53*-Keimbahnmutation zeigten.

TP53-Mutationen sind ein bei ALL-Rezidiven selten vorkommendes Ereignis. Im Fall des Vorhandenseins einer solchen Mutation scheint jedoch die Wahrscheinlichkeit, dass es sich um eine Keimbahnmutation handelt, deutlich erhöht zu sein. Interessanterweise handelt es sich bei den Keimbahnmutationen in der vorliegenden Analyse vermutlich um *de novo* entstandene Mutationen ohne typische LFS-Anamnese. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob Patienten mit ALL-Rezidiv und *TP53*-Keimbahnmutation als Subgruppe abweichend behandelt werden sollten.

Aus den klinischen Daten der Patienten lässt sich eine mögliche Therapieempfehlung für solche Patienten ableiten: Beide Patienten haben eine Knochenmarktransplantation (KMT) erhalten und befinden sich als einzige unter den Patienten mit *TP53*-Mutation weiterhin im Stadium der vollständigen kontinuierlichen Remission, obwohl angesichts der Keimbahnmutation eher eine ungünstige Krankheitsprognose zu erwarten gewesen wäre. Angesichts der geringen Zahl an Patienten mit *TP53*-Keimbahnmutation lassen sich keine statistischen Analysen wie die Berechnung des ereignisfreien Überlebens oder eine multivariate Regressionsanalyse für die Knochenmarktransplantation bei *TP53*-Keimbahnmutationen anschließen. Eine in Richtung KMT-Indikation gehende

Therapieempfehlung für S2-Patienten mit *TP53*-Keimbahnmutation müsste dementsprechend auf jeden Fall in einer prospektiven Studie validiert werden.

5.6 Mögliche therapeutische Konsequenzen aus den Untersuchungsergebnissen

Der p53-Signalweg mit seinen Wirkungen auf den Zellzyklus und die Apoptose-Induktion ist ein häufiges Ziel für Therapieansätze. Viele Chemotherapeutika greifen in den Zellzyklus ein und nehmen somit den p53-Weg in Anspruch. Problem sowohl bei der klassischen als auch bei der direkt an bestimmten Zielgenen angreifenden Tumor-Therapie sind *TP53*-Mutationen, die die Signalkaskade über p53 unmöglich machen. Untersuchungen mit ALL-Zelllinien haben gezeigt, dass *TP53*-Mutationen auch bei der akuten lymphoblastischen Leukämie eine Herabsetzung der Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika bewirken können¹⁴¹. Die vorliegende Untersuchung verdeutlicht jedoch, dass dies angesichts der geringen Inzidenz von *TP53*-Mutationen in dieser Krankheitsentität nicht der primäre Mechanismus einer Chemotherapeutikaresistenz bei ALL-Rezidiven sein kann.

Es gibt zwei verschiedene Arten von Therapeutika, die am p53-Signalweg angreifen: Eine Möglichkeit ist die Wiederherstellung der ursprünglichen Funktion von p53 durch an einen Vektor gekoppeltes Wildtyp-p53¹⁴²⁻¹⁴⁶. Dies ist jedoch nur beim Vorliegen von *TP53*-Mutationen sinnvoll, da diese einen Funktionsverlust des ursprünglichen Proteins bewirken. Die akute lymphoblastische Leukämie und ihr Rezidiv weisen nur eine geringe *TP53*-Mutationsrate auf. Deshalb macht ein großflächiger Einsatz dieser Therapeutika wenig Sinn.

Eine andere therapeutische Möglichkeit liegt in der Inhibierung der Interaktion zwischen p53 und Mdm2. Nutlins sind Cis-Imidazolin-Analoga, die die p53-Bindungstasche von Mdm2 blockieren. p53 kann nicht mehr an Mdm2 binden, die negative Rückkopplung durch Mdm2 ist aufgehoben. Die Nutlins führen so zu einer Steigerung der p53-Konzentration in der Zelle. Daraus folgt in allen bis jetzt untersuchten Zelltypen eine Inhibierung des Zellzyklus in der G1- und G2-Phase^{147, 148}.

Nutlins können ihre Wirkung nur entfalten, wenn der so genannte *p53-downstream pathway* intakt ist. Dies bedeutet einerseits, dass bei Zellen mit *TP53*-Mutation keine Nutlin-Wirkung hervorgerufen werden kann¹⁴⁸. Zugleich müssen auch alle weiteren

durch p53 induzierten Apoptosegene voll funktionsfähig sein. Da das Apoptose-Netzwerk eine hochkomplizierte Struktur darstellt, ist der Ausschluss von Defekten in diesem Signalweg schwierig. Es ist jedoch an bestimmten Zellarten, v.a. solchen mit einer Amplifizierung des *Mdm2*-Gens (z.B. Osteosarkom-Zelllinien), ein erhöhter Apoptose-Index nach Nutlin-Gabe festgestellt worden^{147, 148}.

Im Kontext anderer hämatologischer Krebserkrankungen sind die Mdm2-Antagonisten inzwischen an Zelllinien und primären Zellen getestet worden. Sowohl für die akute myeloische Leukämie (AML)¹⁴⁹ als auch für das multiple Myelom¹⁵⁰ konnten die Nutlins als Erfolg versprechende Therapeutika rekrutiert werden. Die AML-Zellen zeigten dabei eine höhere Sensitivität gegenüber den Nutlins als normale hämatopoetische Zellen.

Bei der Behandlung des Rezidivs der akuten lymphoblastischen Leukämie könnten die Nutlins angesichts der vorliegenden Ergebnisse ein Anwendungsgebiet finden. Es gibt nur einen geringen Prozentsatz an *TP53*-Mutationen, so dass die Hauptvoraussetzung für einen Nutlin-Einsatz gegeben ist. Des Weiteren ist inzwischen bekannt, dass in ALL-Zellen häufig eine Mdm2-Überexpression zu finden ist. Vor allem wurde diese in Verbindung mit einer schlechten Prognose oder einer Rezidivierung gefunden^{98, 151, 152}. Da Nutlins bei einer Überexpression von Mdm2 besonders wirksam werden können¹⁴⁸, scheinen ALL-Rezidive ein gutes Einsatzgebiet für Mdm2-Inhibitoren darzustellen.

6 Zusammenfassung

Mutationen des Tumorsuppressorgens *TP53* treten in über 50 Prozent aller onkologischen Erkrankungen auf und sind insbesondere bei soliden Tumoren häufig. Sie sind in vielen Fällen mit einer Verschlechterung des klinischen Verlaufs, einem schlechteren Ansprechen auf die Chemotherapie und einer verringerten Überlebenswahrscheinlichkeit assoziiert.

Bei der akuten lymphoblastischen Leukämie im Kindesalter sind *TP53*-Mutationen eher selten (1-5 Prozent). Die ALL ist die häufigste Krebserkrankung im Kindesalter mit einer Rezidivrate von 25 Prozent. Die Rezidive sind wegen der Entwicklung hochresistenter Leukämiezellen und der geringen Belastbarkeit der Patienten mit einer Überlebenswahrscheinlichkeit von nur 30 bis 40 Prozent verbunden. Beim Rezidiv der ALL im Kindesalter wird im Gegensatz zur Ersterkrankung allgemein angenommen, dass die *TP53*-Mutationsrate erhöht (bis zu 33 Prozent) und mit einer ungünstigen Prognose sowie einem schlechten Therapieergebnis der Patienten korreliert ist. Die zugrunde liegenden Studien zeigen jedoch tatsächlich heterogene Ergebnisse, die aufgrund kleiner, inhomogener Patientenkollektive häufig statistisch nicht gesichert sind.

In der vorliegenden Arbeit sollte daher an einem großen, repräsentativen Kollektiv von Patienten geprüft werden, wie häufig *TP53*-Mutationen beim ALL-Rezidiv tatsächlich auftreten und ob sie mit biologischen Charakteristika des Rezidivs sowie Prognose und Überleben der Patienten assoziiert sind. Angeregt wurde diese Fragestellung durch eine Arbeit von Kirschner-Schwabe et al¹⁰, die zeigte, dass prognostisch ungünstige, sehr früh nach der Erstdiagnose auftretende ALL-Rezidive durch eine erhöhte proliferative Kapazität der leukämischen Blasten gekennzeichnet sind. Da p53 ein wichtiger Bestandteil der Zellzykluskontrolle ist, und eine Beeinträchtigung seiner Funktion durch Mutation eine unkontrollierte Proliferation der Zellen zur Folge haben kann, sollte ein möglicher Zusammenhang mit *TP53*-Mutationen untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein repräsentatives Kollektiv von Patienten mit Erstrezidiv einer ALL (n=116) mittels DNA-Sequenzierung der Exons 5 bis 8 auf Mutationen im *TP53*-Gen analysiert. Bei insgesamt sechs der ALL-Rezidive wurden Mutationen gefunden, entsprechend einer Mutationsrate von fünf Prozent. Entgegen der allgemeinen Annahme ist somit der Anteil an *TP53*-Mutationen beim ALL-Rezidiv gegenüber der Ersterkrankung nicht wesentlich erhöht. Bei den identifizierten

Mutationen handelt es sich um fünf *missense*-Mutationen und eine Deletion, die sich auf die Exons 5, 7 und 8 verteilen. Es konnte keine signifikante Korrelation mit dem Zeitpunkt des Rezidivs oder anderen prognostischen Faktoren festgestellt werden, wenn auch die statistische Analyse auf Grund der kleinen Zahl an *TP53*-Mutationen nur eingeschränkte Aussagekraft hat. Es zeigte sich allerdings eine mögliche Assoziation mit dem Immunphänotyp einer prä-B-ALL ($P=0,015$). Der Anteil der Zellen in S- und G2/M-Phase liegt bei Patienten mit Mutation deutlich über dem Median der Vergleichsgruppe. Wenn auch *TP53*-Mutationen keine grundlegende Bedeutung beim ALL-Rezidiv haben, so spielen sie möglicherweise doch in einer kleinen Untergruppe von Patienten mit erhöhter proliferativer Blasten-Kapazität eine Rolle.

Bei zwei Patienten des untersuchten Kollektivs konnte eine heterozygote *TP53*-Keimbahnmutation diagnostiziert werden. Bis heute sind weltweit nur wenige ALL-Patienten in Verbindung mit einem Li-Fraumeni Syndrom genannt worden. Da bei beiden Patienten keine für Krebserkrankungen positive Familienanamnese erkennbar ist, handelt es sich vermutlich um neu entstandene Mutationen.

Keimbahnmutationen machen in der vorliegenden Analyse einen hohen Anteil an allen *TP53*-Mutationen aus (zwei von sechs Patienten). Dieser erhebliche Anteil wirft die Frage nach therapeutischen Konsequenzen für diese Subgruppe auf. Klinische Daten der untersuchten Patienten deuten an, dass eine Knochenmarktransplantation positive Auswirkungen auf die Prognose dieser Patienten mit *TP53*-Keimbahnmutation haben könnte.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass der p53-Signalweg bei der Mehrheit der ALL-Rezidive nicht durch Mutationen im *TP53*-Gen gestört ist. Dies eröffnet die Möglichkeit eines neuen therapeutischen Ansatzes: Kleinmolekulare Mdm2-Inhibitoren (Nutlins) steigern bei intaktem p53-Signalweg durch eine hemmende Wirkung auf Mdm2 die Aktivität von p53. Diese Therapeutika wurden bereits erfolgreich in anderen hämatologischen Erkrankungen getestet und stellen möglicherweise eine neue Therapieoption für das ALL-Rezidiv dar.

7 Literaturverzeichnis

- 1 German childhood cancer registry - annual report 2005 (Jahresbericht 2005 des Deutschen Kinderkrebsregisters). Kaatsch P: Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik, 2005. (Accessed March 22, 2007, at [http://www.kinderkrebsregister.de/.](http://www.kinderkrebsregister.de/))
- 2 Henze G, Von Stackelberg A. Relapsed acute lymphoblastic leukemia. In: Pui CH, ed. Childhood Leukemias. 2nd ed. Cambridge, USA: Cambridge University Press; 2006:473-86.
- 3 Tubergen DG, Bleyer A. The Leukemias. In: Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB, eds. Nelson Textbook of Pediatrics. 17th ed. Philadelphia, USA: Saunders; 2004:1694-8.
- 4 Schaefer HE, Riede UN, Herbst EW. Leukämien. In: Riede UN, Schaefer HE, eds. Allgemeine und spezielle Pathologie. Stuttgart, Germany: Thieme; 2001:544-52.
- 5 Schrappe M, Reiter A, Ludwig WD, et al. Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90. German-Austrian-Swiss ALL-BFM Study Group. Blood 2000;95(11):3310-22.
- 6 Amitage JO, Longo DL. Malignancies of lymphoid cells. In: Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, et al., eds. Harrison's Principles of Internal Medicine. 15th ed. Burr Ridge, USA: McGraw-Hill Professional; 2001:715-26.
- 7 Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. The morphological classification of acute lymphoblastic leukaemia: concordance among observers and clinical correlations. British journal of haematology 1981;47(4):553-61.
- 8 Foon KA, Gale RP. Immunologic classification of lymphoma and lymphoid leukemia. Blood reviews 1987;1(2):77-88.
- 9 Henze G. Maligne Non-Hodgkin-Lymphome. In: Gutjahr P, ed. Krebs bei Kindern und Jugendlichen. 5th ed. Köln: Deutscher Ärzte Verlag; 2004:328-46.
- 10 van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grumayer ER, et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. Lancet 1998;352(9142):1731-8.

- 11 Suryanarayan K, Hunger SP, Kohler S, et al. Consistent involvement of the bcr gene by 9;22 breakpoints in pediatric acute leukemias. *Blood* 1991;77(2):324-30.
- 12 Kamps MP, Murre C, Sun XH, Baltimore D. A new homeobox gene contributes the DNA binding domain of the t(1;19) translocation protein in pre-B ALL. *Cell* 1990;60(4):547-55.
- 13 Tkachuk DC, Kohler S, Cleary ML. Involvement of a homolog of *Drosophila trithorax* by 11q23 chromosomal translocations in acute leukemias. *Cell* 1992;71(4):691-700.
- 14 Chen CS, Sorensen PH, Domer PH, et al. Molecular rearrangements on chromosome 11q23 predominate in infant acute lymphoblastic leukemia and are associated with specific biologic variables and poor outcome. *Blood* 1993;81(9):2386-93.
- 15 Olah E, Balogh E, Kajtar P, Pajor L, Jakab Z, Kiss C. Diagnostic and prognostic significance of chromosome abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1997;824:8-27.
- 16 Rubnitz JE, Shuster JJ, Land VJ, et al. Case-control study suggests a favorable impact of TEL rearrangement in patients with B-lineage acute lymphoblastic leukemia treated with antimetabolite-based therapy: a Pediatric Oncology Group study. *Blood* 1997;89(4):1143-6.
- 17 Moricke A, Zimmermann M, Reiter A, et al. Prognostic impact of age in children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia: data from the trials ALL-BFM 86, 90, and 95. *Klinische Padiatrie* 2005;217(6):310-20.
- 18 Armstrong SA, Look AT. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2005;23(26):6306-15.
- 19 Gaynon PS, Qu RP, Chappell RJ, et al. Survival after relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia: impact of site and time to first relapse--the Children's Cancer Group Experience. *Cancer* 1998;82(7):1387-95.
- 20 Langlands K, Craig JI, Anthony RS, Parker AC. Clonal selection in acute lymphoblastic leukaemia demonstrated by polymerase chain reaction analysis of immunoglobulin heavy chain and T-cell receptor delta chain rearrangements. *Leukemia* 1993;7(7):1066-70.

- 21 Klumper E, Pieters R, Veerman AJ, et al. In vitro cellular drug resistance in children with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1995;86(10):3861-8.
- 22 Schroeder H, Garwicz S, Kristinsson J, Siimes MA, Wesenberg F, Gustafsson G. Outcome after first relapse in children with acute lymphoblastic leukemia: a population-based study of 315 patients from the Nordic Society of Pediatric Hematology and Oncology (NOPHO). *Medical and pediatric oncology* 1995;25(5):372-8.
- 23 Wheeler K, Richards S, Bailey C, Chessells J. Comparison of bone marrow transplant and chemotherapy for relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia: the MRC UKALL X experience. *Medical Research Council Working Party on Childhood Leukaemia. British journal of haematology* 1998;101(1):94-103.
- 24 Abshire TC, Buchanan GR, Jackson JF, et al. Morphologic, immunologic and cytogenetic studies in children with acute lymphoblastic leukemia at diagnosis and relapse: a Pediatric Oncology Group study. *Leukemia* 1992;6(5):357-62.
- 25 Henze G, Fengler R, Hartmann R, et al. Chemotherapy for bone marrow relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 1989;24 Suppl 1:S16-9.
- 26 Pui CH, Behm FG, Singh B, et al. Heterogeneity of presenting features and their relation to treatment outcome in 120 children with T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1990;75(1):174-9.
- 27 Rivera GK, Raimondi SC, Hancock ML, et al. Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukaemia with reinforced early treatment and rotational combination chemotherapy. *Lancet* 1991;337(8733):61-6.
- 28 Cazzaniga G, Biondi A. Molecular monitoring of childhood acute lymphoblastic leukemia using antigen receptor gene rearrangements and quantitative polymerase chain reaction technology. *Haematologica* 2005;90(3):382-90.
- 29 Eckert C, Biondi A, Seeger K, et al. Prognostic value of minimal residual disease in relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 2001;358(9289):1239-41.
- 30 Beyermann B, Adams HP, Henze G. Philadelphia chromosome in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia: a matched-pair analysis. *Berlin-Frankfurt-Munster Study Group. J Clin Oncol* 1997;15(6):2231-7.

- 31 Seeger K, Adams HP, Buchwald D, et al. TEL-AML1 fusion transcript in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. The Berlin-Frankfurt-Munster Study Group. *Blood* 1998;91(5):1716-22.
- 32 Einsiedel HG, von Stackelberg A, Hartmann R, et al. Long-term outcome in children with relapsed ALL by risk-stratified salvage therapy: results of trial acute lymphoblastic leukemia-relapse study of the Berlin-Frankfurt-Munster Group 87. *J Clin Oncol* 2005;23(31):7942-50.
- 33 Henze G, Fengler R, Hartmann R, et al. Six-year experience with a comprehensive approach to the treatment of recurrent childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL-REZ BFM 85). A relapse study of the BFM group. *Blood* 1991;78(5):1166-72.
- 34 Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 1979;278(5701):261-3.
- 35 Linzer DI, Levine AJ. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 1979;17(1):43-52.
- 36 Eliyahu D, Raz A, Gruss P, Givol D, Oren M. Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature* 1984;312(5995):646-9.
- 37 Jenkins JR, Rudge K, Currie GA. Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53. *Nature* 1984;312(5995):651-4.
- 38 Chow V, Ben-David Y, Bernstein A, Benchimol S, Mowat M. Multistage Friend erythroleukemia: independent origin of tumor clones with normal or rearranged p53 cellular oncogenes. *Journal of virology* 1987;61(9):2777-81.
- 39 Munroe DG, Rovinski B, Bernstein A, Benchimol S. Loss of a highly conserved domain on p53 as a result of gene deletion during Friend virus-induced erythroleukemia. *Oncogene* 1988;2(6):621-4.
- 40 Soussi T, Dehouche K, Beroud C. p53 website and analysis of p53 gene mutations in human cancer: forging a link between epidemiology and carcinogenesis. *Human mutation* 2000;15(1):105-13.

- 41 Strachan T, Read AP. Cancer Genetics. In: Strachan T, Read AP, eds. Human molecular genetics. 3rd ed. London, England: Garland Science; 2004:488-507.
- 42 Donehower LA, Bradley A. The tumor suppressor p53. *Biochimica et biophysica acta* 1993;1155(2):181-205.
- 43 Unger T, Nau MM, Segal S, Minna JD. p53: a transdominant regulator of transcription whose function is ablated by mutations occurring in human cancer. *The EMBO journal* 1992;11(4):1383-90.
- 44 Walker KK, Levine AJ. Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996;93(26):15335-40.
- 45 Pavletich NP, Chambers KA, Pabo CO. The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutation hot spots. *Genes & development* 1993;7(12B):2556-64.
- 46 el-Deiry WS, Kern SE, Pietenpol JA, Kinzler KW, Vogelstein B. Definition of a consensus binding site for p53. *Nature genetics* 1992;1(1):45-9.
- 47 Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* 1994;265(5170):346-55.
- 48 Jeffrey PD, Gorina S, Pavletich NP. Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms. *Science* 1995;267(5203):1498-502.
- 49 Pietenpol JA, Tokino T, Thiagalingam S, el-Deiry WS, Kinzler KW, Vogelstein B. Sequence-specific transcriptional activation is essential for growth suppression by p53. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994;91(6):1998-2002.
- 50 Hupp TR, Meek DW, Midgley CA, Lane DP. Activation of the cryptic DNA binding function of mutant forms of p53. *Nucleic acids research* 1993;21(14):3167-74.
- 51 Shaulsky G, Goldfinger N, Ben-Ze'ev A, Rotter V. Nuclear accumulation of p53 protein is mediated by several nuclear localization signals and plays a role in tumorigenesis. *Molecular and cellular biology* 1990;10(12):6565-77.

- 52 Ko LJ, Prives C. p53: puzzle and paradigm. *Genes & development* 1996;10(9):1054-72.
- 53 Sakaguchi K, Herrera JE, Saito S, et al. DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes & development* 1998;12(18):2831-41.
- 54 Shaw P, Freeman J, Bovey R, Iggo R. Regulation of specific DNA binding by p53: evidence for a role for O-glycosylation and charged residues at the carboxy-terminus. *Oncogene* 1996;12(4):921-30.
- 55 Okorokov AL, Ponchel F, Milner J. Induced N- and C-terminal cleavage of p53: a core fragment of p53, generated by interaction with damaged DNA, promotes cleavage of the N-terminus of full-length p53, whereas ssDNA induces C-terminal cleavage of p53. *The EMBO journal* 1997;16(19):6008-17.
- 56 Soussi T, Caron de Fromentel C, Mechali M, May P, Kress M. Cloning and characterization of a cDNA from *Xenopus laevis* coding for a protein homologous to human and murine p53. *Oncogene* 1987;1(1):71-8.
- 57 Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992;358(6381):15-6.
- 58 Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000;408(6810):307-10.
- 59 Levine AJ, Hu W, Feng Z. The P53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell death and differentiation* 2006;13(6):1027-36.
- 60 Xu Y. Regulation of p53 responses by post-translational modifications. *Cell death and differentiation* 2003;10(4):400-3.
- 61 Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 1997;387(6630):296-9.
- 62 Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 1997;387(6630):299-303.
- 63 Chen J, Lin J, Levine AJ. Regulation of transcription functions of the p53 tumor suppressor by the mdm-2 oncogene. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)* 1995;1(2):142-52.
- 64 Hofseth LJ, Hussain SP, Harris CC. p53: 25 years after its discovery. *Trends in pharmacological sciences* 2004;25(4):177-81.

- 65 Sengupta S, Harris CC. p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6(1):44-55.
- 66 Ohki R, Nemoto J, Murasawa H, et al. Reprimo, a new candidate mediator of the p53-mediated cell cycle arrest at the G2 phase. *The Journal of biological chemistry* 2000;275(30):22627-30.
- 67 Laronga C, Yang HY, Neal C, Lee MH. Association of the cyclin-dependent kinases and 14-3-3 sigma negatively regulates cell cycle progression. *The Journal of biological chemistry* 2000;275(30):23106-12.
- 68 Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nature reviews* 2002;2(8):594-604.
- 69 el-Deiry WS. Regulation of p53 downstream genes. *Seminars in cancer biology* 1998;8(5):345-57.
- 70 Olivier M, Eeles R, Hollstein M, Khan MA, Harris CC, Hainaut P. The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Human mutation* 2002;19(6):607-14.
- 71 Hartwell L. Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. *Cell* 1992;71(4):543-6.
- 72 Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1971;68(4):820-3.
- 73 Erber R, Conradt C, Homann N, et al. TP53 DNA contact mutations are selectively associated with allelic loss and have a strong clinical impact in head and neck cancer. *Oncogene* 1998;16(13):1671-9.
- 74 Varley JM, Thorncroft M, McGown G, et al. A detailed study of loss of heterozygosity on chromosome 17 in tumours from Li-Fraumeni patients carrying a mutation to the TP53 gene. *Oncogene* 1997;14(7):865-71.
- 75 McLure KG, Lee PW. How p53 binds DNA as a tetramer. *The EMBO journal* 1998;17(12):3342-50.
- 76 McLure KG, Lee PW. p53 DNA binding can be modulated by factors that alter the conformational equilibrium. *The EMBO journal* 1999;18(3):763-70.

- 77 Payne SR, Kemp CJ. Tumor suppressor genetics. *Carcinogenesis* 2005;26(12):2031-45.
- 78 Venkatachalam S, Shi YP, Jones SN, et al. Retention of wild-type p53 in tumors from p53 heterozygous mice: reduction of p53 dosage can promote cancer formation. *The EMBO journal* 1998;17(16):4657-67.
- 79 Li R, Sutphin PD, Schwartz D, et al. Mutant p53 protein expression interferes with p53-independent apoptotic pathways. *Oncogene* 1998;16(25):3269-77.
- 80 Blandino G, Levine AJ, Oren M. Mutant p53 gain of function: differential effects of different p53 mutants on resistance of cultured cells to chemotherapy. *Oncogene* 1999;18(2):477-85.
- 81 Dittmer D, Pati S, Zambetti G, et al. Gain of function mutations in p53. *Nature genetics* 1993;4(1):42-6.
- 82 Hsiao M, Low J, Dorn E, et al. Gain-of-function mutations of the p53 gene induce lymphohematopoietic metastatic potential and tissue invasiveness. *The American journal of pathology* 1994;145(3):702-14.
- 83 Varley JM. Germline TP53 mutations and Li-Fraumeni syndrome. *Human mutation* 2003;21(3):313-20.
- 84 Iacopetta B. TP53 mutation in colorectal cancer. *Human mutation* 2003;21(3):271-6.
- 85 Toyooka S, Tsuda T, Gazdar AF. The TP53 gene, tobacco exposure, and lung cancer. *Human mutation* 2003;21(3):229-39.
- 86 Borresen-Dale AL. TP53 and breast cancer. *Human mutation* 2003;21(3):292-300.
- 87 van Slooten HJ, van De Vijver MJ, Borresen AL, et al. Mutations in exons 5-8 of the p53 gene, independent of their type and location, are associated with increased apoptosis and mitosis in invasive breast carcinoma. *The Journal of pathology* 1999;189(4):504-13.
- 88 Peller S, Rotter V. TP53 in hematological cancer: low incidence of mutations with significant clinical relevance. *Human mutation* 2003;21(3):277-84.

- 89 Wattel E, Preudhomme C, Hecquet B, et al. p53 mutations are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematologic malignancies. *Blood* 1994;84(9):3148-57.
- 90 Agirre X, Novo FJ, Calasanz MJ, et al. TP53 is frequently altered by methylation, mutation, and/or deletion in acute lymphoblastic leukaemia. *Molecular carcinogenesis* 2003;38(4):201-8.
- 91 Blau O, Avigad S, Stark B, et al. Exon 5 mutations in the p53 gene in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia research* 1997;21(8):721-9.
- 92 Diccianni MB, Yu J, Hsiao M, Mukherjee S, Shao LE, Yu AL. Clinical significance of p53 mutations in relapsed T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1994;84(9):3105-12.
- 93 Fenaux P, Jonveaux P, Quiquandon I, et al. Mutations of the p53 gene in B-cell lymphoblastic acute leukemia: a report on 60 cases. *Leukemia* 1992;6(1):42-6.
- 94 Göker E, Waltham M, Kheradpour A, et al. Amplification of the dihydrofolate reductase gene is a mechanism of acquired resistance to methotrexate in patients with acute lymphoblastic leukemia and is correlated with p53 gene mutations. *Blood* 1995;86(2):677-84.
- 95 Jonvenaux P, Berger R. Infrequent mutations in the P53 gene in primary human T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1991;5(10):839-40.
- 96 Kawamura M, Ohnishi H, Guo SX, et al. Alterations of the p53, p21, p16, p15 and RAS genes in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia research* 1999;23(2):115-26.
- 97 Lanza C, Gaidano G, Cimino G, et al. p53 gene inactivation in acute lymphoblastic leukemia of B cell lineage associates with chromosomal breakpoints at 11q23 and 8q24. *Leukemia* 1995;9(6):955-9.
- 98 Marks DI, Kurz BW, Link MP, et al. Altered expression of p53 and mdm-2 proteins at diagnosis is associated with early treatment failure in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 1997;15(3):1158-62.
- 99 Preudhomme C, Dervite I, Wattel E, et al. Clinical significance of p53 mutations in newly diagnosed Burkitt's lymphoma and acute lymphoblastic leukemia: a report of 48 cases. *J Clin Oncol* 1995;13(4):812-20.

- 100 Felix CA, Nau MM, Takahashi T, et al. Hereditary and acquired p53 gene mutations in childhood acute lymphoblastic leukemia. *The Journal of clinical investigation* 1992;89(2):640-7.
- 101 Gump J, McGavran L, Wei Q, Hunger SP. Analysis of TP53 mutations in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 2001;23(7):416-9.
- 102 Hsiao MH, Yu AL, Yeargin J, Ku D, Haas M. Nonhereditary p53 mutations in T-cell acute lymphoblastic leukemia are associated with the relapse phase. *Blood* 1994;83(10):2922-30.
- 103 Megonigal MD, Rappaport EF, Nowell PC, Lange BJ, Felix CA. Potential role for wild-type p53 in leukemias with MLL gene translocations. *Oncogene* 1998;16(10):1351-6.
- 104 Nomdedeu JF, Lete I, Baiget M, et al. Mutational analysis of p53 in 16 cases of acute lymphoblastic leukemia and Burkitt's lymphoma. *Haematologica* 1997;82(5):550-4.
- 105 Tang JL, Tien HF, Lin MT, Chen PJ, Chen YC. Frequent p53 mutation in relapsed acute lymphoblastic leukemia with cytogenetic instability: a longitudinal analysis. *Anticancer research* 1998;18(2B):1273-8.
- 106 Zhou M, Gu L, Abshire TC, et al. Incidence and prognostic significance of MDM2 oncoprotein overexpression in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2000;14(1):61-7.
- 107 Zhu YM, Foroni L, McQuaker IG, Papaioannou M, Haynes A, Russell HH. Mechanisms of relapse in acute leukaemia: involvement of p53 mutated subclones in disease progression in acute lymphoblastic leukaemia. *British journal of cancer* 1999;79(7-8):1151-7.
- 108 Imamura J, Miyoshi I, Koeffler HP. p53 in hematologic malignancies. *Blood* 1994;84(8):2412-21.
- 109 Krug U, Ganser A, Koeffler HP. Tumor suppressor genes in normal and malignant hematopoiesis. *Oncogene* 2002;21(21):3475-95.

- 110 Kirschner-Schwabe R, Lottaz C, Todling J, et al. Expression of late cell cycle genes and an increased proliferative capacity characterize very early relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res* 2006;12(15):4553-61.
- 111 Saiki RK, Scharf S, Faloona F, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985;230(4732):1350-4.
- 112 Soussi T. p53 alterations in human cancer: more questions than answers. *Oncogene* 2007;26(15):2145-56.
- 113 Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1977;74(12):5463-7.
- 114 John HA, Birnstiel ML, Jones KW. RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 1969;223(5206):582-7.
- 115 Pardue ML, Gall JG. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1969;64(2):600-4.
- 116 GenBank X54156. National Center for Biotechnology Information, 2007. (Accessed February 5, 2007, at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=35213>.)
- 117 Antonarakis SE. Recommendations for a nomenclature system for human gene mutations. Nomenclature Working Group. *Human mutation* 1998;11(1):1-3.
- 118 Carbone D, Chiba I, Mitsudomi T. Polymorphism at codon 213 within the p53 gene. *Oncogene* 1991;6(9):1691-2.
- 119 Strachan T, Read AP. *Molecular Pathology*. In: Strachan T, Read AP, eds. *Human molecular genetics*. 3rd ed. London, England: Garland Science; 2004:462-85.
- 120 Amrani N, Sachs MS, Jacobson A. Early nonsense: mRNA decay solves a translational problem. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7(6):415-25.
- 121 Hernandez S, Lopez-Knowles E, Lloreta J, et al. FGFR3 and Tp53 mutations in T1G3 transitional bladder carcinomas: independent distribution and lack of association with prognosis. *Clin Cancer Res* 2005;11(15):5444-50.

- 122 Meng L, Lin L, Zhang H, Nassiri M, Morales AR, Nadji M. Multiple mutations of the p53 gene in human mammary carcinoma. *Mutation research* 1999;435(3):263-9.
- 123 Oscier DG, Gardiner AC, Mould SJ, et al. 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(4):1177-84.
- 124 Wada M, Bartram CR, Nakamura H, et al. Analysis of p53 mutations in a large series of lymphoid hematologic malignancies of childhood. *Blood* 1993;82(10):3163-9.
- 125 Newcomb EW. P53 gene mutations in lymphoid diseases and their possible relevance to drug resistance. *Leukemia & lymphoma* 1995;17(3-4):211-21.
- 126 Lowe SW, Bodis S, McClatchey A, et al. p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science* 1994;266(5186):807-10.
- 127 Cimino G, Lanza C, Elia L, et al. Multigenetic lesions in infant acute leukaemias: correlations with ALL-1 gene status. *British journal of haematology* 1997;96(2):308-13.
- 128 Kato S, Han SY, Liu W, et al. Understanding the function-structure and function-mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003;100(14):8424-9.
- 129 Dearth LR, Qian H, Wang T, et al. Inactive full-length p53 mutants lacking dominant wild-type p53 inhibition highlight loss of heterozygosity as an important aspect of p53 status in human cancers. *Carcinogenesis* 2007;28(2):289-98.
- 130 Ponten F, Berg C, Ahmadian A, et al. Molecular pathology in basal cell cancer with p53 as a genetic marker. *Oncogene* 1997;15(9):1059-67.
- 131 Wada H, Asada M, Nakazawa S, et al. Clonal expansion of p53 mutant cells in leukemia progression in vitro. *Leukemia* 1994;8(1):53-9.
- 132 Monti P, Campomenosi P, Ciribilli Y, et al. Tumour p53 mutations exhibit promoter selective dominance over wild type p53. *Oncogene* 2002;21(11):1641-8.
- 133 Gaidano G, Ballerini P, Gong JZ, et al. p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991;88(12):5413-7.

- 134 Kustanovich AM, Savitskaja TV, Bydanov OI, Belevtsev MV, Potapnev MP. Aberrant expression of tumor suppressor genes and their association with chimeric oncogenes in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia research* 2005;29(11):1271-6.
- 135 Raimondi SC, Behm FG, Roberson PK, et al. Cytogenetics of pre-B-cell acute lymphoblastic leukemia with emphasis on prognostic implications of the t(1;19). *J Clin Oncol* 1990;8(8):1380-8.
- 136 Li FP, Fraumeni JF, Jr., Mulvihill JJ, et al. A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer research* 1988;48(18):5358-62.
- 137 Chompret A, Brugieres L, Ronsin M, et al. P53 germline mutations in childhood cancers and cancer risk for carrier individuals. *British journal of cancer* 2000;82(12):1932-7.
- 138 McIntyre JF, Smith-Sorensen B, Friend SH, et al. Germline mutations of the p53 tumor suppressor gene in children with osteosarcoma. *J Clin Oncol* 1994;12(5):925-30.
- 139 Speiser P, Gharehbaghi-Schnell E, Eder S, et al. A constitutional de novo mutation in exon 8 of the p53 gene in a patient with multiple primary malignancies. *British journal of cancer* 1996;74(2):269-73.
- 140 Varley JM, McGown G, Thorncroft M, et al. Germ-line mutations of TP53 in Li-Fraumeni families: an extended study of 39 families. *Cancer research* 1997;57(15):3245-52.
- 141 Lam V, McPherson JP, Salmena L, et al. p53 gene status and chemosensitivity of childhood acute lymphoblastic leukemia cells to adriamycin. *Leukemia research* 1999;23(10):871-80.
- 142 Cristofanilli M, Krishnamurthy S, Guerra L, et al. A nonreplicating adenoviral vector that contains the wild-type p53 transgene combined with chemotherapy for primary breast cancer: safety, efficacy, and biologic activity of a novel gene-therapy approach. *Cancer* 2006;107(5):935-44.
- 143 Peng Z. Current status of gendicine in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers. *Human gene therapy* 2005;16(9):1016-27.

- 144 Shimada H, Matsubara H, Shiratori T, et al. Phase I/II adenoviral p53 gene therapy for chemoradiation resistant advanced esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer science* 2006;97(6):554-61.
- 145 Tolcher AW, Hao D, de Bono J, et al. Phase I, pharmacokinetic, and pharmacodynamic study of intravenously administered Ad5CMV-p53, an adenoviral vector containing the wild-type p53 gene, in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* 2006;24(13):2052-8.
- 146 Foster BA, Coffey HA, Morin MJ, Rastinejad F. Pharmacological rescue of mutant p53 conformation and function. *Science* 1999;286(5449):2507-10.
- 147 Tovar C, Rosinski J, Filipovic Z, et al. Small-molecule MDM2 antagonists reveal aberrant p53 signaling in cancer: implications for therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006;103(6):1888-93.
- 148 Vassilev LT, Vu BT, Graves B, et al. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 2004;303(5659):844-8.
- 149 Kojima K, Konopleva M, Samudio IJ, et al. MDM2 antagonists induce p53-dependent apoptosis in AML: implications for leukemia therapy. *Blood* 2005;106(9):3150-9.
- 150 Stuhmer T, Chatterjee M, Hildebrandt M, et al. Nongenotoxic activation of the p53 pathway as a therapeutic strategy for multiple myeloma. *Blood* 2005;106(10):3609-17.
- 151 Gustafsson B, Axelsson B, Gustafsson B, Christensson B, Winiarski J. MDM2 and p53 in childhood acute lymphoblastic leukemia: higher expression in childhood leukemias with poor prognosis compared to long-term survivors. *Pediatric hematology and oncology* 2001;18(8):497-508.
- 152 Zhou M, Yeager AM, Smith SD, Findley HW. Overexpression of the MDM2 gene by childhood acute lymphoblastic leukemia cells expressing the wild-type p53 gene. *Blood* 1995;85(6):1608-14.

8 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ALL	Akute lymphoblastische Leukämie
APAF-1	engl. <i>apoptotic protease-activating factor 1</i>
ARG	Arginin
ASP	Aspartat
BAL	biphänotypische, hybride ALL
B-ALL	B-Zell-ALL
Bax	engl. <i>Bcl-2-associated X protein</i>
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
c-ALL	engl. <i>common-ALL</i> (Subtyp der B-Vorläufer-Zell-ALL)
CCR	engl. <i>continuous complete remission</i> , anhaltende komplette Remission
CDK	engl. <i>cyclin-dependent kinase</i> , cyclinabhängige Kinase
CR	engl. <i>complete remission</i> , komplette Remission
CR2	zweite komplette Remission
DAPI	4.6-Di-amidino-2-Phenylindol
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
d.h.	das heißt
DNA	engl. <i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFS	engl. <i>event-free survival</i> , ereignisfreies Überleben
engl.	englisch
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
g.	engl. <i>genomic reference sequence</i> , genomische Referenzsequenz
G	Guanin
GLN	Glutamin
GLU	Glutamat
GLY	Glycin

HPLC	engl. <i>high performance liquid chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeitchromatographie
H ₂ O	Wasser
k.A.	keine Angaben möglich
KM	Knochenmark
KMT	Knochenmarktransplantation
Kortikale T-ALL	Kortikale T-Zell-ALL (Zwischenstufe zwischen Prä-T- und T-ALL)
LFL	engl. <i>Li-Fraumeni-like syndrome</i> , Li-Fraumeni-ähnliches Syndrom
LNR	Laufende Patientenummer
LSF	engl. <i>Li-Fraumeni syndrome</i> , Li-Fraumeni Syndrom
LOH	engl. <i>loss of heterozygosity</i> , Verlust der Heterozygotie
LSI	engl. <i>locus specific identifier</i> , lokusspezifische Sonde
L ₃ -ALL	Burkitt-Form der ALL
Mdm2	engl. <i>mouse double minute 2</i>
MdmX	engl. <i>mouse double minute X</i>
MRD	engl. <i>minimal residual disease</i> , minimale residuelle Leukämie
Mt-p53	mutiertes p53
n.d.	engl. <i>not done</i> , nicht durchgeführt
NOXA	lateinisches Wort für „Schädigung“
Nt	Nukleotid
OT	Objektträger
p53	Protein 53
Patnr	Patientenummer
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PHE	Phenylalanin
prä-B-ALL	Subtyp der B-Vorläufer-Zell-ALL
prä-T-ALL	T-Vorläufer-Zell-ALL
pro-B-ALL	entspricht prä-prä-B-ALL
PUMA	engl. <i>p53-upregulated modulator of apoptosis</i>
RNA	engl. <i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten

SER	Serin
T	Thymin
T-ALL	T-Zell-ALL
<i>TP53</i>	Tumorprotein 53
TRP	Tryptophan
u.a.	unter anderem
UV-Strahlung	ultraviolette Strahlung
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
Wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

9 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

10 Danksagung

Herrn PD Dr. Dr. Karl Seeger danke ich für die Überlassung des Themas, für die Möglichkeit, mit dieser Doktorarbeit erste Einblicke in die pädiatrische Onkologie zu erhalten, das Interesse am Fortgang der Arbeit, die Bereitschaft zur Diskussion und die stets herzliche Betreuung.

Herrn Prof. Dr. Dr. Günter Henze danke ich für die Möglichkeit, die Doktorarbeit in seiner Klinik durchführen zu können, und für die Bereitschaft zur kritischen Durchsicht der Arbeit.

Ganz besonders danken möchte ich Frau Dr. Renate Kirschner-Schwabe für die wissenschaftlich exzellente und menschlich so nette Betreuung dieser Arbeit. Sie hat mich durch alle Höhen und Tiefen begleitet und stand mir trotz vielfältiger anderer Verpflichtungen immer mit Rat und Tat zur Seite.

Ebenfalls danken möchte ich Frau Dr. Cornelia Eckert, die mich durch ihre menschlich so wertvolle Art immer wieder aufgebaut und mir zudem die Begeisterung für das Fragenstellen vermittelt hat.

Diese Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne die Unterstützung folgender Menschen, denen ich von ganzem Herzen danken möchte: Gabriele Körner für die fachkundige und menschliche Unterstützung in allen Labor- und Lebenslagen. Claudia Hanel, Jutta Proba, Wilhelmine Keune, Sabine Bobbe und Ute Schwiem für ihre nette Art und ihre tatkräftige Hilfe, die mir das Einleben und die Einarbeitung im Labor leicht gemacht haben und mir das Labor in dieser Zeit zu einem zweiten Zuhause haben werden lassen.

Herzlichen Dank an Lorenz Bastian und Kerstin Hasse für die vielen abendlichen Gespräche und die interessanten Diskussionen (nicht nur über die Doktorarbeit).

Meinen Eltern danke ich für ihre Unterstützung während des Studiums und der Promotion, ihre Unkompliziertheit sowie für ihr Verständnis dafür, dass ich meinen eigenen Weg gehen muss.

Meinem Mann David möchte ich danken für seine Geduld mit mir während der Zeit der Doktorarbeit, seine konstruktive Art und für alles, was er für uns getan hat und jeden Tag tut.

11 Erklärung

Ich, Claudia Ute van Schewick, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Mutationsanalyse des *TP53*-Gens bei Rezidiven der akuten lymphoblastischen Leukämie“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

14. November 2007

Claudia van Schewick