

Charakterisierung der Deletionsregion in Chromosom 17p und
Identifikation von HIC1 als neues Tumorsuppressorgen
in diffusen großzelligen B-Zell Lymphomen

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg



vorgelegt von
Heike Stöcklein
aus
Werneck

Würzburg 2007

Eingereicht am:

27.06.2007

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Prof. Dr. M. Müller

1. Gutachter :

PD Dr. med. G. Ott

2. Gutachter:

Prof. Dr. M. Scharl

Tag des Promotionskolloquiums:

28.11.2007

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1.	Definition und Epidemiologie des diffusen großzelligen B-Zell-Lymphoms	1
1.2.	Klinisches Erscheinungsbild	1
1.3.	Morphologie und Immunphänotyp	1
1.4.	Therapie	2
1.5.	Molekulargenetik	3
1.5.1.	Deregulierung der Apoptose	3
1.5.2.	Deregulierung der Zellzyklus-Kontrolle	4
1.6.	Die Rolle des Tumorsuppressorgens TP53 in DLBCL	6
1.6.1.	Der p53 Signalweg	6
1.6.2.	TP53-Inaktivierung in DLBCL	8
1.6.3.	Inaktivierung von p53 durch Alternativmechanismen	9
1.7.	TP53-unabhängige Deletionen auf Chromosom 17p13.3	9
1.8.	Zielsetzung	11

2. Material

2.1.	Untersuchungsmaterial	12
2.2.	Chemikalien, Kits und Lösungen	12
2.3.	Puffer	14
2.4.	Medien	16
2.5.	Zellen, Zelllinien und Plasmide	17
2.6.	Laborgeräte	17
2.7.	Datenbanken und Software	18

3. Methoden

3.1. Zytogenetische Untersuchungen

3.1.1.	Anfertigung von Zellkulturen aus Patientenmaterial (Lymphknoten)	19
3.1.2.	Kulturabbruch	19
3.1.3.	Giemsa-Bändern mit Trypsin	20
3.1.4.	Auswertung	20

3.2. Fluoreszenz in situ-Hybridisierung (FISH)

3.2.1.	Selektion der Klone für die Hybridisierung von Chromosom 17p	20
3.2.2.	Bakterienanzucht und Plasmidisolierung	21
3.2.3.	Verifizierung der BAC- und PAC-Klone	21
3.2.4.	Markierung genomischer BAC- und PAC-DNA durch Nick-Translation	21

3.2.5. Fluoreszenz in situ-Hybridisierung an kultivierten Zellen	22
3.3. Präparation und Analyse von DNA	
3.3.1. Phenol-Chloroform-Extraktion	24
3.3.2. DNA-Extraktion aus viablen Zellen	24
3.3.3. DNA-Extraktion aus Blut	24
3.3.4. Bestimmung der Konzentration und Integrität der DNA	25
3.3.5. Polymerasen-Kettenreaktion (PCR)	26
3.3.6. Sequenzanalyse genomischer DNA	26
3.3.7. Quantitative Real-time PCR (Q-PCR)	27
3.3.8. Analyse des DNA-Methylierungsstatus	29
3.4. Präparation und Analyse von RNA	
3.4.1. Routinemäßige Methoden bei der Arbeit mit RNA	30
3.4.2. Extraktion von RNA aus Frischgewebe	30
3.4.3. Bestimmung der Konzentration und Integrität der RNA	31
3.4.4. cDNA-Synthese	31
3.4.5. FASAY – „Functional Analysis of Separated Alleles in Yeast“ - und Split Assay	32
3.5. Immunhistochemische Untersuchungen von Proteinen	
3.5.1. Immunhistochemische Färbungen an Paraffinmaterial	35
3.5.2. Validierung der Antikörper	35
3.5.3. Erstellung eines „Array“-Blockes und Anfertigung von „Array“-Schnitten	36
3.6. Statistik	36
4. Ergebnisse	
4.1. Untersuchung des TP53-Status in diffusen großzelligen B-Zell Lymphomen	37
4.1.1. Deletionen in Chromosom 17p und aberrante Expression von p53-Protein	37
4.1.2. TP53-Mutationen – Sequenzanalyse genomischer DNA	38
4.1.3. Funktionelle Analyse von p53 mittels FASAY	38
4.1.4. Charakterisierung der TP53-Mutationen	40
4.1.5. Heterozygoter TP53-Inaktivierungsstatus	41
4.1.6. Korrelation von p53-Expression und Mutation des TP53-Gens	41
4.1.7. „Single Nucleotide Polymorphism 309“ (SNP309) des MDM2-Promoters	42
4.1.8. Funktionalität des Transkriptionsfaktors p53 in DLBCL mit monoallelischer Inaktivierung von TP53 (+/-)	42
4.1.9. Untersuchung von p53-Regulatoren auf Proteinebene	45
4.2. FISH-Analyse von Chromosom 17p in diffusen großzelligen B-Zell Lymphomen	49
4.2.1. Verifizierung und Spezifität der BAC- und PAC-Klone	50
4.2.2. Deletionsstatus von Chromosom 17p in DLBCL ohne TP53-Deletion	51

a) Analyse von DLBCL mit Wildtyp-TP53 (+/+)	51
b) Analyse von DLBCL mit monoallelischer TP53-Mutation (+/- mut)	52
4.2.3. Selektion von BAC-/PAC-Klonen für die chromosomalen Regionen 17p13.2 und 17p13.3	52
4.2.4. Minimal-deletierte Region (MDR) in DLBCL ohne TP53-Deletion	53
4.2.5. Deletionsstatus von Chromosom 17p in DLBCL mit TP53-Deletion	55
4.3. Detaillierte Analyse von HIC1 in diffusen großzelligen B-Zell Lymphomen	57
4.3.1. Validierung der HIC1-Deletion mittels quantitativer real-time PCR (Q-PCR)	57
4.3.2. Methylierungsstatus des HIC1-Promoters	59
4.3.3. HIC1-Inaktivierungsstatus	60
4.4. Korrelation des TP53- und HIC1-Status mit dem Überleben	61
5. Diskussion	
5.1. Deletionen in Chromosom 17p sind nicht zwangsweise mit Mutationen des TP53-Gens assoziiert	65
5.2. Sequenzanalyse genomischer DNA versus FASAY – Erhöhte Frequenz der TP53-Mutationsdetektion mittels FASAY	66
5.3. Inaktivierung des verbliebenen TP53-Alleles durch dominant-negative TP53-Mutation?	67
5.4. Mutationen des TP53-Gens sind mit der aberranten Expression von p53-Protein assoziiert	68
5.5. Inaktivierung von p53-Protein durch posttranslationale Modifikation oder Alternativmechanismen?	69
5.6. Inaktivierung des Tumorsuppressors HIC1 in DLBCL	72
5.7. HIC1 als potentiell Tumorsuppressorgen in DLBCL	74
5.8. Ausblick	76
6. Zusammenfassung	77
Summary	78
7. Literaturverzeichnis	79
8. Anhang	92
9. Abkürzungsverzeichnis	101
Danksagung	104

Publikationen und Beiträge zu Tagungsbänden	105
Lebenslauf	107
Erklärung	108

1. Einleitung

1.1 Definition und Epidemiologie des diffusen großzelligen B-Zell Lymphoms

Das diffuse großzellige B-Zell Lymphom (DLBCL) ist eine aggressive lymphatische Neoplasie ausgehend von B-Lymphozyten. Es bildet eine eigenständige Entität innerhalb der Non-Hodgkin-Lymphome der B-Zell-Reihe (B-NHL). In westlichen Ländern ist das DLBCL mit 30-40% das am häufigsten vorkommende B-NHL; in Entwicklungsländern ist die Frequenz der Neuerkrankungen höher. DLBCL entstehen in der Regel *de novo* (primäre DLBCL), können allerdings auch als Transformation aus einem indolenten Lymphom (z.B. chronische, lymphatische Leukämie; folliculäres Lymphom) hervorgehen (sekundäre DLBCL). Ein signifikanter Risikofaktor ist eine zugrunde liegende Immundefizienz ¹.

DLBCL treten vor allem im höheren Lebensalter auf; der Altersmedian liegt im siebten Lebensjahrzehnt. Allerdings können auch andere Altersgruppen, insbesondere Kinder, betroffen sein. Männer erkranken etwas häufiger als Frauen. Innerhalb der letzten Jahre war eine Zunahme von Neuerkrankungen auch unabhängig von einer HIV-Infektion zu verzeichnen ¹.

1.2. Klinisches Erscheinungsbild

Das DLBCL stellt sich als aggressiv verlaufendes Lymphom dar, welches mit raschem Tumorwachstum assoziiert ist. DLBCL entstehen nicht nur nodal in Lymphknoten, sondern treten in bis zu 40% auch primär extranodal auf, insbesondere in der Magenschleimhaut. Der Intestinaltrakt, aber auch Haut, zentrales Nervensystem, Knochen, Weichgewebe, Lunge, Niere, Leber, Waldeyer-Rachenring und Milz charakterisieren weitere extranodale Manifestationsorte. Eine primäre Präsentation im Knochenmark und im peripheren Blut ist eher selten zu verzeichnen ¹.

1.3. Morphologie und Immunphänotyp

DLBCL zeigen typischerweise ein diffuses Wachstumsmuster, welches die normale Architektur der betroffenen nodalen oder extranodalen Gewebe aufhebt. Eine Ausbreitung der Tumorzellen über den gesamten Lymphknoten kann beobachtet werden, wobei auch eine partielle, interfollikuläre oder sinusoidale Infiltration anzutreffen ist ¹.

Die Heterogenität der DLBCL wird im Auftreten verschiedener zytomorphologischer Varianten deutlich, bei denen insbesondere zentroblastische, immunoblastische und großzellige anaplastische Lymphome vom B-Typ unterschieden werden können ¹.

Zentroblasten sind mittelgroße bis große Zellen mit einem schmalen, basophilen Zytoplasma, rundlichem Zellkern mit multiplen, peripher gelegenen Nukleoli oder gelappten (multilobulierten) Kernen (Abb. 1). Immunoblasten sind definiert als große Zellen mit

breitem basophilem Zytoplasma und einem runden Zellkern, sowie einem großen, zentralen, solitären Nukleolus (Abb. 1). Bei zentroblastischen Lymphomen kann das Infiltrat per definitionem mit bis zu 90% Immunoblasten untermischt sein ².

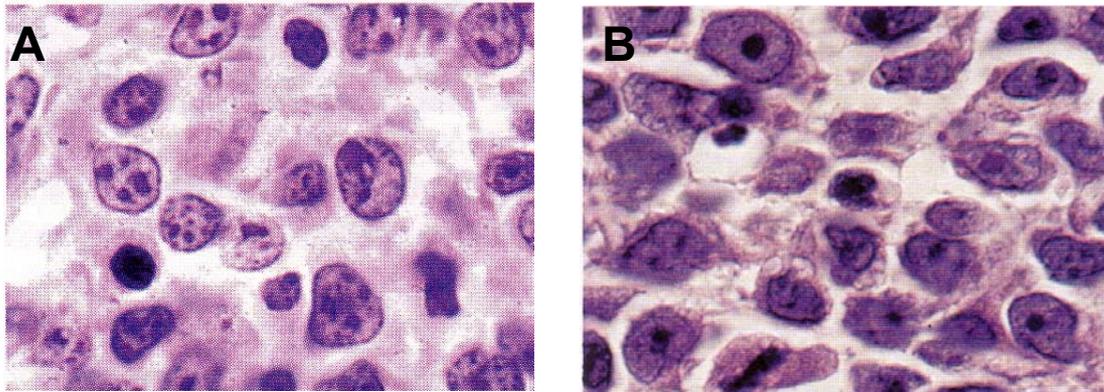


Abbildung 1: Zytomorphologische Varianten des DLBCL (Hämatoxylin-Eosin-Färbung): zentroblastische Morphologie (A) und immunoblastische Morphologie (B) (nach ¹).

Immunphänotypisch zeigen alle DLBCL Eigenschaften einer reifen B-Zell-Neoplasie: charakteristisch ist die Expression der B-Zell-Marker CD19, CD20, CD22 sowie CD79a. Das Antigenprofil der zentroblastischen und immunoblastischen Lymphome ist ähnlich. Neben den genannten B-Zell-Antigenen exprimieren die Zellen überwiegend Oberflächenimmunoglobuline vom Typ M ².

1.4. Therapie

Hochmaligne Lymphome können prinzipiell auch im fortgeschrittenen Stadium geheilt werden. Die Standardchemotherapie erfolgt nach dem CHOP-Schema, das aus der kombinierten Gabe von Doxorubicin, Cyclophosphamid, Vincristin und Prednison besteht. Durch diese Behandlung können bei zwei Drittel der Patienten komplette Remissionen erreicht werden. Dauerhaft geheilt werden kann allerdings nur die Hälfte dieser Patienten ^{3,4}. Durch die Einführung der zellulären Immuntherapie und der Behandlung mit monoklonalen Antikörpern, wie z.B. dem Anti-CD20-Antikörper Rituximab, wird sich die Therapie hochmaligner B-Zell-Lymphome in naher Zeit wandeln ⁵. Die Strategie geht dahin, spezifischere Antikörper zu entwickeln, die nur die Tumorzellen, nicht jedoch normale Zellen erkennen. Die therapeutischen Antikörper können mit Toxinen oder Radionukliden gekoppelt werden, um Tumorzellen selektiv zu zerstören. Hierfür ist eine Kenntnis molekularer Vorgänge essentiell, die mit der Transformation und mit der Tumorprogression assoziiert sind.

1.5. Molekulargenetik

Die Pathogenese von DLBCL ist mit einer Akkumulation von klonalen, genetischen Aberrationen assoziiert, die häufig Regulatoren der Apoptose und/oder des Zellzyklus betreffen. Die Heterogenität, die in DLBCL hinsichtlich der Morphologie, des klinischen Verlaufs und dem Ansprechen auf therapeutische Maßnahmen zu beobachten ist, lässt Rückschlüsse auf die Entstehung einer malignen Transformation in unterschiedlichen Entwicklungsstadien der B-Lymphozyten zu.

Mit Hilfe der Mikroarray-Technik konnte bestätigt werden, dass DLBCL in zumindest zwei verschiedene Subtypen unterteilt werden können, deren jeweiliges Genexpressionsprofil charakteristisch für verschiedene Stadien der B-Zell-Differenzierung ist. Während die Expressionssignatur einer Gruppe mit der von B-Lymphozyten des Keimzentrums vergleichbar ist („Germinal center B-cell like DLBCL“: GCB), zeigt die andere Gruppe ein Genexpressionsmuster, das mit dem aktivierter B-Lymphozyten im peripheren Blut übereinstimmt („Activated B-cell like DLBCL“: ABC). In DLBCL vom ABC-Typ liegt zudem eine Expression von Genen vor, die charakteristisch für Plasmazellen ist, was ihren möglichen Ursprung in Post-Keimzentrumslymphozyten verdeutlicht. Der dritte DLBCL-Subtyp, das primäre mediastinale (PM) DLBCL, zeigt ein dem ABC-DLBCL ähnliches Genexpressionsprofil und ist darüber hinaus durch die verminderte Genexpression von B-Zell-Rezeptor-Komponenten charakterisiert^{7,8}. Lymphome des GCB-Typs sind mit einer besseren Prognose assoziiert als ABC-DLBCL. Hinsichtlich der Überlebensdauer unterscheiden sich PM-DLBCL, trotz des ABC-ähnlichen Expressionsmusters, hingegen nicht wesentlich von GCB-DLBCL^{7,8}.

1.5.1. Deregulierung der Apoptose

Apoptotische Signalwege stellen ein häufiges Ziel genetischer Aberrationen in der Entstehung von Lymphomen dar. Der programmierte Zelltod wird entweder über einen intrinsischen, mitochondrialen oder einen extrinsischen, Todesrezeptor-vermittelten Signalweg gesteuert⁹. Beide Signalwege werden über die Aktivierung von Caspasen sowie durch die intrazelluläre Konzentration von pro- und anti-apoptotischen Proteinen gelenkt^{9,10}. Diese entscheidet darüber ob die Zelle überlebt, oder in die Apoptose übergeht.

Die Keimzentrumsreaktion, in der die Selektion von B-Lymphozyten erfolgt, ist mit einer erhöhten Apoptosefrequenz assoziiert. Sie stellt daher einen besonders häufigen Angriffspunkt in der Pathogenese der DLBCL dar. Normale Zellen exprimieren in diesem Stadium der B-Zell-Differenzierung keine Proteine, welche die Apoptose inhibieren^{11,12}. In 30-50% der DLBCL ist hingegen eine Überexpression des antiapoptotischen BCL2-Proteins

zu verzeichnen ¹, welches zur Verschiebung des intrazellulären Gleichgewichts von Apoptoseregulatoren führt und somit ein Überleben von Tumorzellen gewährleistet.

Die BCL2-Überexpression kann sowohl in einer Genamplifikation ¹³⁻¹⁷, wie auch in der Translokation t(14;18)(q32;q21) ^{18,19} begründet sein. Diese Translokation entsteht infolge von DNA-Doppelstrangbrüchen während der Rekombination von Immunglobulin (Ig)-Genen. Hierbei wird das BCL2-Gen auf Chromosom 18q21 in die Region des Ig-Schwerkettengens (IgH) auf Chromosom 14q32 verlagert und gelangt unter die Kontrolle des Transkriptionsverstärkers (Enhancer) für die IgH-Region. Daraus resultiert eine erhöhte BCL2-Transkription ^{18,19}.

In 17-20% von DLBCL findet sich eine Translokation t(14;18) (Abb. 2), die ausschließlich im GCB-Typ der DLBCL nachzuweisen ist ^{6,20-22}. Die Überexpression von BCL2- Protein kann hingegen sowohl in ABC- als auch in GCB-DLBCL auftreten .

Einen weiteren Angriffspunkt der Deregulation des apoptotischen Signalwegs stellen Transkriptionsfaktoren der NF-κB-Familie dar, die das Überleben einer Zelle durch die Induktion von anti-apoptotischen Proteinen steuern ²³. In normalen, nicht apoptotischen Zellen, bleibt zytoplasmatisches NF-κB durch die Komplexbildung mit inhibitorischen NF-κB-Proteinen (IκB) in seiner inaktiven Form bestehen. Durch verschiedene Signalwege kann eine IκB-Kinase aktiviert werden, welche zur Phosphorylierung und Degradierung von IκB-Proteinen führt. Daraufhin erfolgt die Freisetzung von NF-κB-Proteinen, die in den Nukleus transferiert werden, um dort die Transkription von Targetgenen zu initiieren ²⁴. Eine konstitutive Aktivierung von NF-κB führt zur Überexpression von anti-apoptotischen Proteinen, wie z.B. c-Rel, BCL2 und c-flip, und somit zum Überleben von Tumorzellen ²³. Eine erhöhte Expression von NF-κB-Zielgenen konnte in ABC-ähnlichen, nicht jedoch in GCB-DLBCL nachgewiesen werden ²⁴.

1.5.2. Deregulierung der Zellzyklus-Kontrolle

Neben der defekten Apoptose-Regulation können Lymphomzellen durch die Störung der Zellzyklus-Kontrolle weitere Wachstumsvorteile erlangen, die in der unkontrollierten Proliferation von Tumorzellen resultieren ¹⁰.

Die Progression des Zellzyklus von der G₁- zur S-Phase wird in eukaryotischen Zellen im wesentlichen von einem Komplex aus regulatorischen D-Cyclinen (Cyclin D1, D2 und D3) und Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) gesteuert ^{25,26}. Der proliferationsfördernde CyclinD/CDK-Komplex wird durch eine Reihe von CDK-Inhibitoren, wie z.B. p21^{CIP1}, p27^{KIP1}, p16^{INK4a} und p14^{ARF} gehemmt. Diese CDK-Inhibitoren werden ihrerseits durch Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise c-MYC, und Tumorsuppressoren, wie z.B. TP53, reguliert. Diese komplexe, kritische Schnittstelle zwischen der G₁- und S-Phase des Zellzyklus stellt einen weiteren Angriffspunkt genetischer Alterationen in DLBCL dar ¹⁰.

So hat beispielsweise der Transkriptionsrepressor BCL6 einen wesentlichen Einfluss auf die Zellzyklus-Progression. Zu seinen Targetgenen gehören u.a. der CDK-Inhibitor p27^{KIP1} sowie der Tumorsuppressor TP53, die den G₁-Arrest des Zellzyklus vermitteln und somit einen wesentlichen Einfluss auf die Zellzyklus-Kontrolle haben ^{27,28}.

Translokationen in Chromosom 3q, die den genetischen Locus von BCL6 betreffen, stellen die Aberrationen dar, die in DLBCL mit 30-40%iger Wahrscheinlichkeit am häufigsten auftreten ^{29,30} (Abb. 2). Die Translokation findet überwiegend im regulatorischen 5'-Bereich des Gens statt ³¹ und führt zur Substitution des BCL6-Promoters ³². Der häufigste Translokationspartner ist das Immunglobulinschwerkettengen (IgH) in Chromosom 14q32, aber auch die Loci der Ig-Leichtketten in Chromosom 2p12 und 22q11 können von einer Translokation betroffen sein ³¹. Diese Alterationen sind mit einer BCL6-Überexpression assoziiert. Neben den Translokationen können auch Mutationen ³³, sowie Genamplifikationen von BCL6 ¹⁷ zur erhöhten Expression führen. Eine Überexpression von BCL6 findet sich vornehmlich in Zellen des Keimzentrums ^{34,35} und ist daher mit dem GCB-Subtyp assoziiert, kann jedoch auch in ABC-DLBCL nachgewiesen werden .

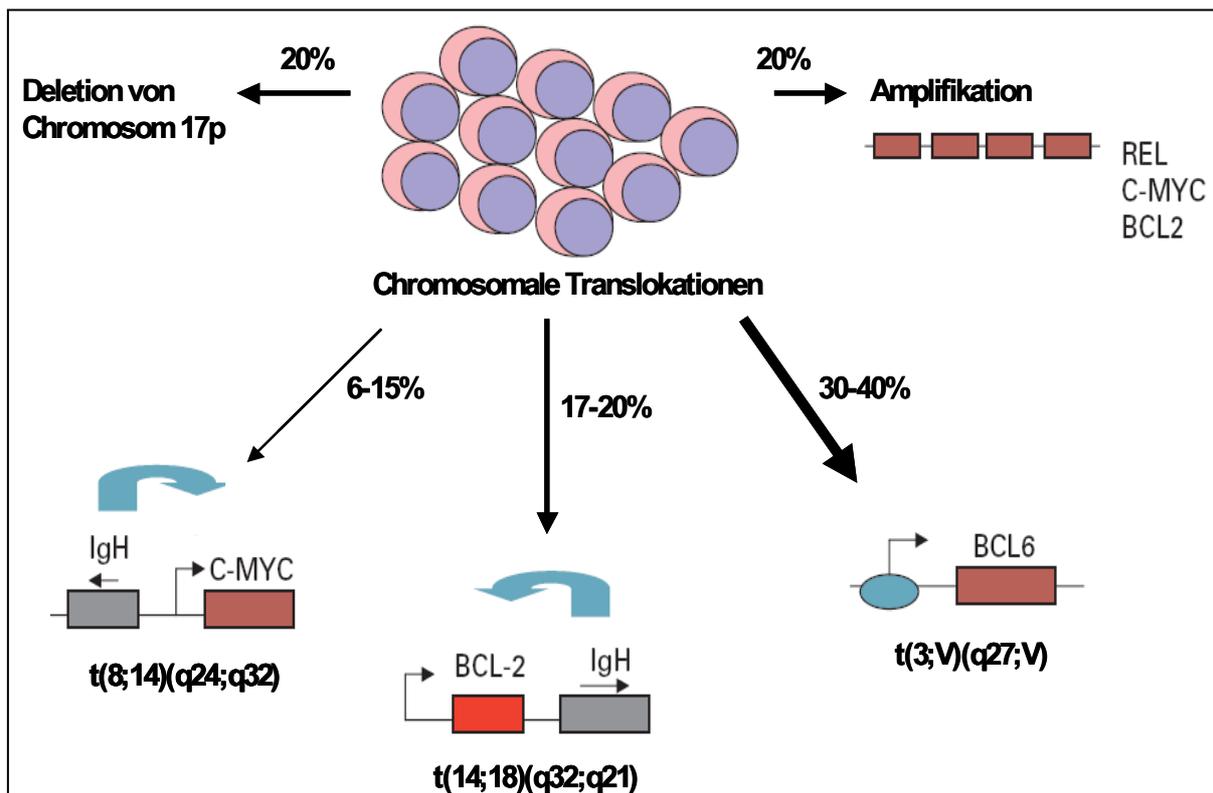


Abb. 2 : Schematische Darstellung der wesentlichen genetischen Aberrationen in DLBCL (nach ³⁶).

Einen weiteren Angriffspunkt in der Progression von DLBCL stellt das Onkogen c-MYC dar. Eine erhöhte Expression kann in bis zu 15% dieser Lymphome nachgewiesen werden, die aus einer Translokation t(8;14)(q24;q32) oder aus der Amplifikation von 8q24 resultieren ^{10,14,16} (Abb. 2). Der Transkriptionsfaktor c-MYC reguliert die Zellzyklus-

Progression durch die Induktion von Cyclin D1, Cyclin D2, und CDK4, sowie durch Inhibierung von p21^{CIP1} und p27^{KIP1} 10. Eine c-MYC-Überexpression ist mit einer erhöhten Zellproliferation assoziiert. Eine Alteration von c-MYC ist insbesondere in extranodalen Lymphomen, in HIV-assoziierten DLBCL, sowie in 98% aller Burkitt-Lymphome zu finden 1,37-39.

1.6. Die Rolle des Tumorsuppressorgens TP53 in DLBCL

Die in DLBCL relativ häufig vorkommenden Translokationen und Genamplifikationen führen durch die Überexpression von Onkogenen zur Deregulierung der Apoptose (BCL2) und des Zellzyklus (BCL6, c-MYC). Die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (TSG) ist ebenfalls an der Progression von DLBCL beteiligt 36.

Eine Deletion von Chromosom 17p, welches den genetischen Locus von TP53 in 17p13.1 beinhaltet, findet sich in 15-20% der DLBCL 36 (Abb. 2). Der Transkriptionsfaktor TP53 hat eine zentrale Stellung in der Regulation des Zellzyklus-Arrestes und in der Induktion von apoptotischen Signalwegen und trägt wesentlich zur Erhaltung der genomischen Stabilität bei 40-42.

1.6.1. Der p53 Signalweg

Unter physiologischen Bedingungen ist die Konzentration von p53 Protein nur sehr niedrig 43. Erst infolge einer DNA-Schädigung erfolgt die durch Kinasen initiierte Aktivierung von ATM und CHK2, die ihrerseits durch Phosphorylierung von regulativen p53-Resten zur Stabilisierung des Proteins führen 44,45. Der Tumorsuppressor kann anschließend den Zellzyklus-Arrest initiieren, um Zeit für die Reparatur der geschädigten DNA bereitzustellen. Die Regulation des Zellzyklus wird durch die p53-vermittelte Induktion der p21^{CIP1}-Expression gesteuert, welche als CDK-Inhibitor die Kinaseaktivität des CDK2/CyclinE-Komplexes neutralisieren kann. Aufgrund einer fehlenden Phosphorylierung bleibt der Transkriptionsfaktor E2F, als direktes Target des CDK2/CyclinE-Komplexes, an pRB gebunden. Erst die Freisetzung von E2F führt zur Induktion von Targetgenen, die an der Progression von G₁ zu S-Phase beteiligt sind 46 (Abb. 3).

Ist die Zelle irreversibel geschädigt, vermittelt p53 die Aktivierung des pro-apoptotischen Proteins BAX. Letzteres führt durch Verschiebung des intrazellulären BAX/BCL2-Gleichgewichts zur Initiierung des programmierten Zelltodes 47-49. Eine durch BAX induzierte Porenbildung in der mitochondrialen Membran führt zur Freisetzung von Cytochrom C und durch die Aktivierung eines Caspase-gesteuerten Signalweges zur Apoptose 50 (Abb. 3).

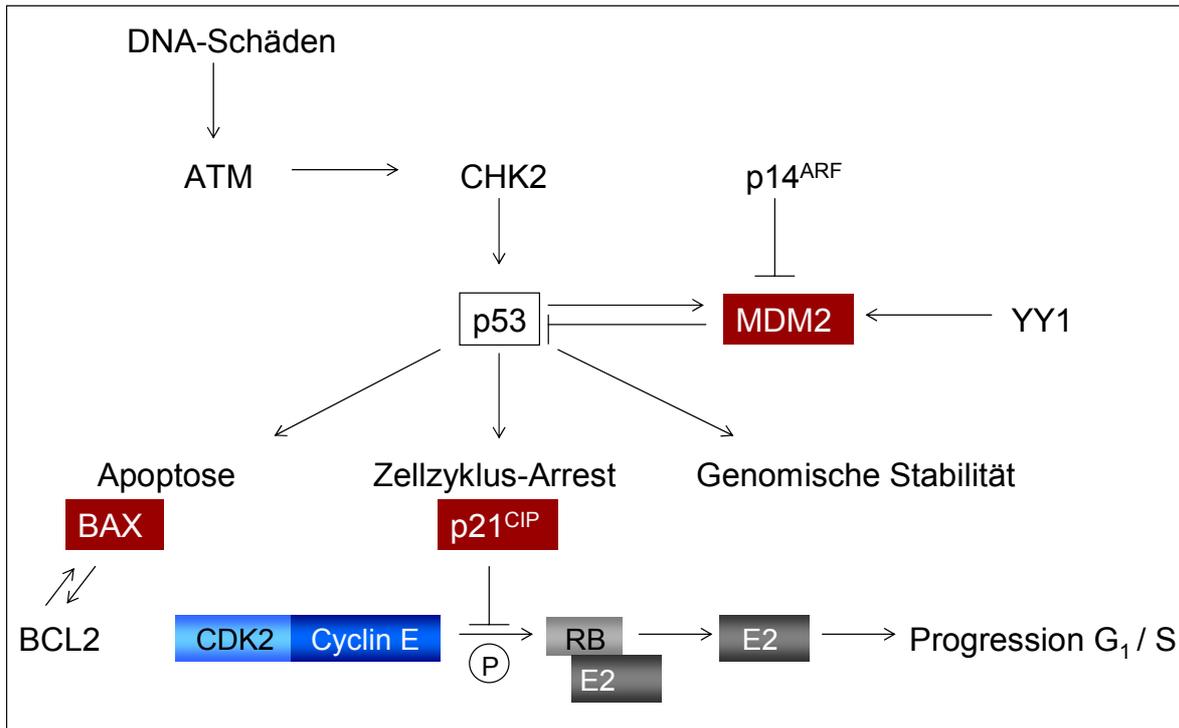


Abb. 3: Schematische Übersicht über den p53-Signalweg, der zur Initiierung von Apoptose oder zur Induktion von Zellzyklus-Arrest führt.

Ein weiteres p53-Targetgen ist die E3-Ubiquitinligase MDM2⁵¹, die in einer negativen Feedback-Regulation⁵² zur Ubiquitinierung von p53 und anschließender Degradierung des Proteins führt^{53,54}. Somit wird die p53-Konzentration in ungeschädigten Zellen gering gehalten. Infolge einer DNA-Schädigung kann der durch MDM2-vermittelten Degradierung des Proteins entgegengewirkt werden, was entweder durch p53-Phosphorylierung, oder durch die Induktion von p14^{ARF} vermittelt wird. P14^{ARF} bewirkt durch die Bindung an MDM2 dessen Transport in den Nukleolus und wirkt daher ebenfalls stabilisierend auf p53-Protein⁵⁵⁻⁵⁷ (Abb. 3).

Während p14^{ARF} einen positiven Effekt auf die p53-Stabilisierung zeigt, kann der Transkriptionsfaktor Yin Yang 1 (YY1) durch die Komplexierung von MDM2 und p53 die Degradierung von p53 beschleunigen. Eine Überexpression von YY1 ist somit mit einem sofortigen Abbau des p53-Proteins assoziiert⁵⁸.

1.6.2. TP53-Inaktivierung in DLBCL

Nach dem klassischen „two-hit“-Modell von Knudson agieren TSG rezessiv, d.h. zur Tumorprogression ist die Inaktivierung beider Allele erforderlich⁵⁹ (Abb. 4).

Der durch Deletion bedingte Verlust von Chromosom 17p, welches den TP53-Lokus beinhaltet, ist häufig mit der Mutation des zweiten TP53-Allels assoziiert, was zur vollständigen Inaktivierung der p53-Funktionalität führt⁶⁰⁻⁶³.

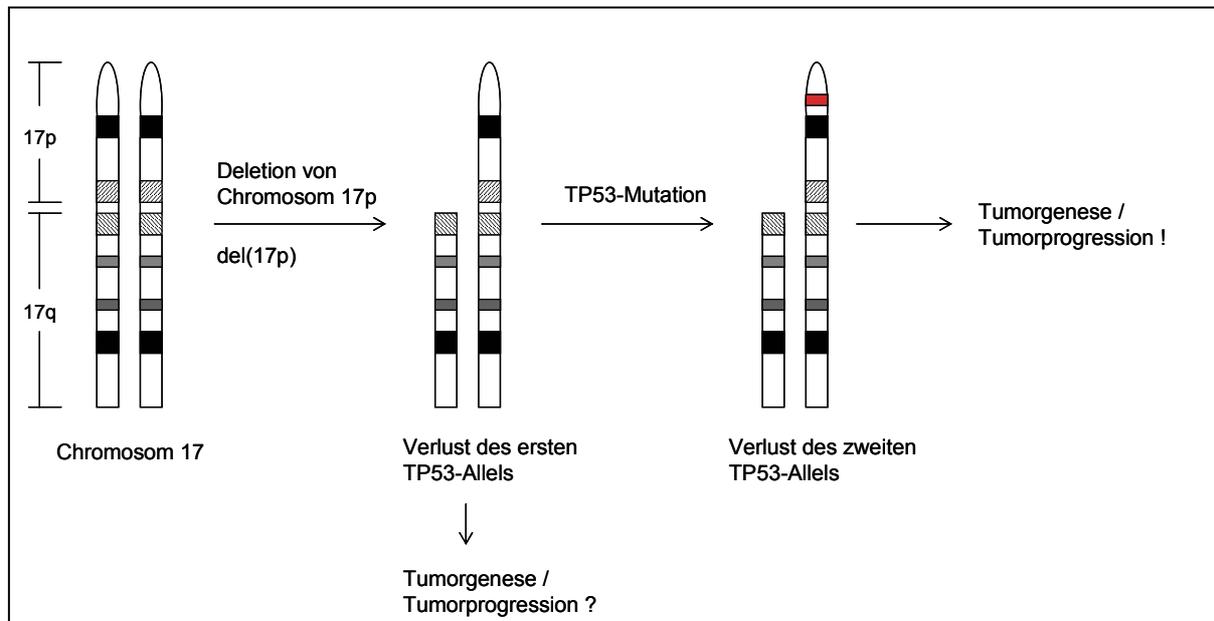


Abbildung 4: Übersicht über die klassische „two-hit“-Hypothese zur Inaktivierung von TSG, die auf statistischen Analysen von Knudson basiert ⁵⁹ (rot: durch Mutation inaktiviertes zweites TP53-Allel).

Alterationen von TP53 konnten auch in malignen Lymphomen nachgewiesen werden. Allerdings wurde bei der Analyse von TP53 entweder auf den Verlust von Chromosom 17p ^{14,64,65} oder auf das Auftreten von Mutationen des TP53-Gens ⁶⁶⁻⁷² fokussiert.

So konnte bislang eine Deletionsfrequenz von Chromosom 17p, einschließlich des TP53-Lokus, in etwa 15-20% der DLBCL ermittelt werden ^{1,36} wobei in der Regel der gesamte kurze Arm des Chromosoms von einer Deletion betroffen ist ⁷³⁻⁷⁷.

Demgegenüber treten Mutationen von TP53 in 17-25% aller B-NHL auf ^{10,36} und betreffen überwiegend die zentrale DNA-bindende Domäne des TP53-Gens.

Die immunhistochemische Färbung von p53-Protein, ein in der Routinediagnostik angewandtes Verfahren zur Detektion von TP53-Mutationen, macht sich den Effekt der häufig mutierten zentralen DNA-Abschnitte des Gens zu Nutzen. Etwa 95% aller Mutationen treten in dieser zentralen Region von TP53 auf ⁷⁸ und führen zum Funktionsverlust des Transkriptions-faktors, wovon auch die Transkription von MDM2 betroffen ist ^{79,80}. Aufgrund fehlender MDM2-vermittelter Ubiquitinierung und Degradierung von p53, erfolgt eine Akkumulation des aberranten Proteins im Nukleus, die mittels immunhistochemischer Färbungen nachgewiesen werden kann ⁸¹.

1.6.3. Inaktivierung von p53 durch Alternativmechanismen

Während eine Inaktivierung von TP53 in ca. 50% aller humanen Neoplasien auftritt ^{79,80}, ist die Frequenz von TP53-Alterationen in malignen Lymphomen mit 15-25% niedriger. Es ist demnach nicht auszuschließen, dass der p53-Signalweg in DLBCL durch

Alternativmechanismen, unabhängig von TP53-Deletion oder -Mutation, beeinflusst werden kann.

Aktives p53 ist Gegenstand vieler komplexer posttranslationaler Modifikationen, die sich nachhaltig auf die Stabilität von p53-Protein und somit auf die Expression von p53-Targetgenen auswirken. Zu diesen Veränderungen zählt insbesondere die kovalente Addition funktionaler Gruppen an das p53 Protein. Zu den häufigsten posttranslationalen Modifikationen von p53 gehören die Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten, sowie die Ubiquitinierung von Lysinresten ^{43,82}.

Die Degradierung des p53-Proteins durch einen Ubiquitin-abhängigen Prozess wird primär durch die E3-Ubiquitinligase MDM2 vermittelt ⁵⁴. Die Amplifikation von MDM2, wie sie in mindestens 7% aller humanen Tumoren unabhängig von TP53-Alterationen beschrieben wurde, stellt einen der häufigsten Alternativmechanismus einer TP53-Inaktivierung dar ⁸³. Auch in malignen Lymphomen konnte die Überexpression von MDM2-Protein nachgewiesen werden ⁸⁴.

Infolge von DNA-Schäden findet durch die Aktivierung verschiedener Proteinkinasen die Phosphorylierung von p53-Serin- und Threoninresten statt ⁴³, die die Stabilisierung des Proteins gewährleistet ⁸⁵. Zahlreiche Proteinkinasen die eine aktivierende Wirkung auf p53 ausüben, konnten bislang beschrieben werden ^{43,82}, darunter auch CHK2 ⁴⁴, dessen Inaktivierung ebenfalls mit der Tumorprogression in B-NHL assoziiert werden konnte ^{86,87}. Neben der direkten posttranslationalen Modifikation von p53 Protein sind weitere Faktoren bekannt, die die Stabilität des Proteins indirekt beeinflussen, wie beispielsweise eine Deregulation von YY1 ⁵⁸. Eine erhöhte Konzentration von YY1-Protein wurde in hämatologischen Neoplasien beschrieben ⁸⁸.

Zahlreiche weitere Mechanismen konnten mit der Inaktivierung von p53 *in vitro* assoziiert werden, wie z.B. die Acetylierung, Sumoylierung, Neddylierung und Methylierung von Lysinresten ^{43,82}, die bislang jedoch nicht mit einer Progression maligner Lymphome assoziiert wurden.

1.7. TP53-unabhängige Deletionen in Chromosom 17p13.3

Neben der Inaktivierung von p53-Positiv-, bzw. der Überexpression von Negativ-Regulatoren, hat auch die Suche nach weiteren TSG auf Chromosom 17p in letzter Zeit immer größere Bedeutung gewonnen. So konnte eine von TP53 unabhängige Deletion der telomerwärts zu TP53 gelegenen Chromosomenbande 17p13.3 in einer Vielzahl humaner Tumorerkrankungen beschrieben werden, z.B. in Colon-, Mamma- und Ovarialkarzinomen ⁸⁹⁻⁹¹, in Tumoren der Lunge und des Gehirns ^{92,93}. Auch in hämatologischen Neoplasien, wie z.B. in einigen Fällen akuter myeloischer Leukämien, akuter

lymphoblastischer Leukämien, chronisch lymphatischer Leukämien und maligner Lymphome wurde das Auftreten von 17p13.3-Deletionen bereits nachgewiesen⁹⁴.

Dass bei der Deletion von Chromosom 17p in der Regel der gesamte kurze Arm des Chromosoms vom Verlust betroffen ist, konnte in DLBCL bislang mehrfach gezeigt werden⁷³⁻⁷⁷. Es stellt sich daher die Frage, ob TP53 in Chromosom 17p13.1 das alleinige Ziel dieser Aberration darstellt, oder ob weitere Tumorsuppressor-Kandidaten betroffen sind. Neben verschiedenen potentiellen Tumorsuppressorgenen, wie z.B. HIC1⁹⁵, DPH2L1 (OVCA1) und OVCA2⁹⁶, ROX/MNT⁹⁷, LOST1⁹⁸ und YWHAE⁹⁹, ist die Region 17p13.3 auch für die Lokalisation von micro-RNAs, wie z.B. miR-132 und miR-212 (<http://microna.sanger.ac.uk/>) bekannt und bietet daher, abgesehen von TP53, weitere Angriffspunkte für genomische Aberrationen.

1.8. Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Bedeutung einer Deletion von Chromosom 17p in DLBCL, sowie der Charakterisierung des TP53-Status, dessen genetischer Locus der chromosomalen Bande 17p13.1 zugeordnet ist. Obwohl eine 17p-Deletion vielfach mit der Mutation des TP53-Gens assoziiert werden konnte, ist die detaillierte Analyse beider TP53-Allele in DLBCL bislang unvollständig.

Bereits im Vorfeld der vorliegenden Arbeit ermöglichten zytogenetische Untersuchungen, sowie Fluoreszenz in situ Hybridisierungen mit TP53-lokusspezifischen Sonden, den Nachweis von 17p- und TP53-Deletionen in DLBCL.

Analog der „two-hit“-Hypothese nach Knudson, erfolgten immunhistochemische Färbungen von p53-Protein, um den Mutationsstatus des zweiten TP53-Allels zu untersuchen. Wider Erwarten wurde in den untersuchten DLBCL eine Diskrepanz zwischen einer 17p-Deletion und der Expression von aberrantem p53-Protein gezeigt, was auf eine nicht vollständige Inaktivierung des TSG TP53 hindeutet.

Eine weitere ausführliche Untersuchung des TP53-Mutationsstatus in DLBCL sollte zunächst mittels direkter Sequenzanalyse durchgeführt werden. Da bei der Analyse genomischer DNA allerdings der Tumorzellgehalt einen limitierenden Faktor darstellt, wurde neben der konventionellen Sequenzanalyse eine weitere Methode angewandt, die auf dem Nachweis von TP53-Mutationen auf funktionaler Ebene basiert (FASAY: „functional analysis of separated alleles in yeast“) ^{100,101}.

Auch Alternativmechanismen, die die Aktivität von p53 unabhängig von einer TP53-Deletion und/oder -Mutation beeinflussen, sollten mittels immunhistochemischer Färbungen von p53-Regulatoren auf Proteinebene untersucht werden.

Darüber hinaus konnte in DLBCL zwar vielfach die Deletion des gesamten kurzen Arms von Chromosom 17 gezeigt werden ⁷³⁻⁷⁷, allerdings blieb bislang ungeklärt, ob weitere Tumorsuppressorkandidaten von dieser Deletion betroffen sind. Im zweiten Teil der Arbeit sollten deshalb detaillierte Deletionsanalysen von Chromosom 17p durchgeführt werden, um mögliche weitere TSG zu identifizieren.

2. Material

2.1. Untersuchungsmaterial

Für die hier vorliegende Studie wurden 172 Fälle von diffus-großzelligen B-Zell Lymphomen (DLBCL) retrospektiv untersucht. Das Gewebematerial stammte aus dem Referenzzentrum für Lymphknotenpathologie des Instituts für Pathologie der Universität Würzburg. Von allen 172 Fällen lagen zytogenetische Analysen, sowie immunhistochemische Färbungen von p53 Protein vor, die bereits in den Jahren 1990 bis 2004 erhoben wurden. Die weitere Analyse von TP53 und HIC1 erfolgte im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit an insgesamt 55 der 172 DLBCL. Durch immunhistochemische Färbung von BCL6, MUM1 und CD10 kann eine Unterteilung der DLBCL in ABC- und GCB-Typ erfolgen¹⁰². Von den 55 DLBCL zeigten 27 Fälle einen GCB-Immunphänotyp, 19 Fälle konnten dem ABC-Subtyp zugeordnet werden. Kein immunhistochemisches Profil hinsichtlich des ABC- und GCB-Subtyps wurde in neun DLBCL durchgeführt. Klinische Daten lagen von 40 der 55 DLBCL vor.

2.2 Chemikalien, Kits und Lösungen

ABsolute QPCR SYBR Green Rox Mix (#AB-1100)	ABgene, Hamburg
Anti-MDM2 Mouse mAb (IF2) (#OP46-20UG)	Merck Biosciences, Darmstadt
Anti-p21WAF1 Mouse mAb (EA10) (#OP64-100UG)	Merck Biosciences, Darmstadt
Anti-RbIgG (H+L) (gt) Fluorescein	Axxora, Lörrach
Anti-Streptavidin-Biotin	Axxora, Lörrach
BAC- / PAC- Klone	Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung, RZPD, Berlin
Bax (P-19) (#SC-526)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Big Dye Terminator v3.1 (#4337456)	Applied Biosystems, Darmstadt
BioNick™ Labeling System (#18247015)	Invitrogen, Karlsruhe
Biotin-16-dUTP	Roche, Mannheim
Blocking Reagent	Roche, Mannheim
iScript cDNA Synthesis (#1708890)	Bio-Rad, München
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Colcemid	Gibco Invitrogen Cooperation, Karlsruhe
Cot Human DNA	Roche, Mannheim
Digoxigenin-11-dUTP	Roche, Mannheim
DNA Größenstandard 100 bp	MBI-Fermentas, St. Leon-Roth
DNA Größenstandard 1 kb	MBI-Fermentas, St. Leon-Roth
DNA Low Mass Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
dNTP-Mix	MBI-Fermentas, St. Leon-Roth

EZ DNA Methylation-Gold Kit™	Zymo Research, HISS Diagnostics, Freiburg
Fetal Bovine Serum	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Gentamycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hi-Di™ Formamid (#4311320)	Applied Biosystems, Darmstadt
HindIII	MBI-Fermentas, St. Leon-Roth
Histostain™-Plus (#85-9043)	Zymed, San Francisco, California, USA
HotStarTaq DNA Polymerase (#203203)	Qiagen, Hilden
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
LB Medium, LB Agar	Roche, Mannheim
Loading Dye Solution	MBI-Fermentas, St. Leon-Roth
Magnesiumchlorid 25 mM	MBI-Fermentas, St. Leon-Roth
Metaphase CGH Target Slides (#30-806010)	Vysis, Firma Abbott, Wiesbaden
Mouse Monoclonal Anti-Digoxigenin Clone DI-2	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
NucleoBond PC20 (#740571.100)	Machery-Nagel, Düren
p53 Mouse Anti-Human (Klon DO-7)	DakoCytomation, Hamburg
PCR-Puffer 10x	MBI-Fermentas, St. Leon-Roth
Penicillin-Streptomycin Solution	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Pepsin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Proteinase K	Roche, Mannheim
Primer	MWG, Ebersberg
QIAamp® DNA Mini Kit (#1023701)	Qiagen, Hilden
Rb a Mo Immunoglobulins/FITC F(ab´)2	DakoCytomation, Hamburg
Rapid Gel Extraction System (#11456-027)	Marligen, Ijamsville, USA
RNA-Größenstandard	Ambion, Cambridgeshire, UK
RPMI-1640 (with L-Glutamine / HEPES)	PAA, Cölbe
Sephadex G50	Amersham Biosciences, Freiburg
Sheared Salmon sperm DNA	Roche, Mannheim
TaqPolymerase	MBI-Fermentas, St. Leon-Roth
Target Retrieval® (#S1699)	DakoCytomation, Hamburg
Texas Red Streptavidin	Axxora, Lörrach
Trizol®Reagenz	Gibco Invitrogen Corporation, Karlsruhe
Trypsin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Universal Methylated Human DNA Standard	Zymo Research, HISS Diagnostics, Freiburg
Vectashield Mounting Medium	Axxora, Lörrach
Vysis CEP 17 Spectrum Green	Vysis, Firma Abbott, Wiesbaden

YY1 (H-10) (#SC-7341)

Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

Verbrauchsmaterialien wurden von der Fa. Sarstedt, Nürnberg verwendet. 96-well-PCR-Platten wurden von der Firma ABgene, Surrey, UK, bezogen. Hier nicht aufgeführte, handelsübliche Chemikalien wurden bei den Firmen AppliChem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) erworben.

2.3. Puffer

a) Puffer für zytogenetische Untersuchungen und Fluoreszenz in situ Hybridisierung

Sörensen-Puffer:	3,6 g KH_2PO_4 4,14 g Na_2HPO_4 ad 2000 ml H_2O
10 x Puffer für Nick-Translation:	500 mM Tris-HCl pH 7.2 100 mM MgSO_4 1 mM DTT
Hybridisierungsmix:	50% Formamid 10% Dextransulfat 2 x SSC
1% Paraformaldehyd:	10 ml 10% Paraformaldehyd 85 ml 1 x PBS 5 ml 1 M MgCl_2
TNB Blocking Puffer:	0,5 g Blocking Reagent (Roche) 10 ml 10 x TN Puffer ad 100 ml H_2O
10 x TN Puffer:	1 M Tris-HCl (pH 7,5) 1,5 M NaCl ad 1000 ml H_2O

b) Puffer für die Extraktion von DNA

DNA-Isolationspuffer:	75 ml 1 M NaCl 5 ml Tween20 50 ml 0,5 M EDTA ad 1000 μl H_2O
-----------------------	--

Zell-Lyse-Puffer: 0,3 M Saccharose
 10 mM Tris-HCl (pH 7,5)
 5 mM MgCl₂
 1% Triton X-100
 ad 1000 ml H₂O

Dropping Puffer : 0,075 M NaCl
 0,024 EDTA
 ad 1000 µl H₂O

c) Puffer für Agarosegele

TAE-Puffer (50x) 242 g Tris in 500 ml H₂O
 100 ml 0,5 M Na₂EDTA pH 8,0
 57,1 ml Eisessig
 ad 1000 ml H₂O

Blaumarker für RNA 500 µl Loading Dye Solution (Fermentas)
 36 µl 37% Formaldehyd
 154,2 µl Formamid
 200 µl FA Gel Puffer
 231 µl 100% Glycerin

RNA Sample Buffer 10 ml Formamid
 3,5 ml 37% Formaldehyd
 1 ml 10x FA Gel Puffer
 1 ml RNase freies H₂O

Gel Puffer 200 mM MOPS
 50 mM Natriumacetat
 10 mM EDTA
 pH-Wert mit 1 M NaOH auf pH 7 eingestellt

d) Puffer für FASAY / Split Assay

Lysepuffer 0,5 ml lytisches Enzym aus *Trichoderma Harzianium*
 (Sigma)
 5 µl RNase A (10 mg/ml)
 10 µl 0,5 M EDTA

0,5 µl β-Mercaptoethanol

2.4. Medien

LB-Medium

25 g Trockenmedium in 1 l H₂O

20 min bei 121°C und 103 kPa autoklavieren

LB-Agar

40 g LB-Agar in 1 l H₂O

20 min bei 121°C und 103 kPa autoklavieren

Nach Abkühlung bis auf ca. 60°C wurden Chloramphenicol/Kanamycin zum flüssigen Agar hinzugegeben. Anschließend wurde der Agar auf Kulturschalen verteilt; nach dem Erstarren bei RT wurden die Kulturschalen bei 4°C gelagert.

YPDA-Vollmedium

1% Hefeextrakt

2% Pepton

2% Dextrose

200 µg/ml Adenin

ad 300 ml H₂O

SC-- Medium

0,67% Hefe-Nitrogen Base

2% Glucose

2,5% Agar

37,5 ml Aminosäure-Mix

Aminosäure-Mix

L-Alanin

L-Arginin

L-Asparagin

L-Aspartat

L-Cystein

L-Glutamin

L-Glutaminsäure

L-Glycin

L-Histidin

Myo-Inositol

L-Isoleucin

L-Lysin

L-Methionin
 L-Phenylalanin
 L-Prolin
 L-Serin
 L-Threonin
 L-Tryptophan
 L-Tyrosin
 Uracil
 L-Valin.....je 0,5 g
 0,05 g p-Aminobenzoesäure
 3,75 µg/ml Adenin

2.5. Zellen, Zelllinien und Plasmide

RAJI	humanes Burkitt Lymphom DSMZ no: ACC 319
yIG397	Dr. Jana Smardova, Department of Pathology, Brno, CZ (Flaman et al, PNAS USA 92:3963-3967, 1995)
pSS16	Dr. Jana Smardova, Department of Pathology, Brno, CZ (Flaman et al, PNAS USA 92:3963-3967, 1995)

2.6. Laborgeräte

Autoklaven	MM Vakulab S3000 H+P Labortechnik Varioklav 75S
DNA-Gelelektrophoresekammern	Biorad / Roth
Fluoreszenz-Mikroskop	Zeiss ebq100
Geldokumentation	Herolab UVT-28 SE Mitsubishi P91
Heizblock/Thermomixer	HLC Haep Labor Consult HBT 130 Eppendorf Thermomixer comfort
Inkubationsschränke	Heraeus thermiconP®
Kryostat	Medim Universal Micratome Cryostat DDM-P500
Kühlzentrifugen	Eppendorf 5417R Heraeus Sepatech Biofuge 15R
pH-Meter	WTW pH 330
Pipetierhilfe	Brand Accu-Jet®
Präzisionswaage	Ohaus Adventurer™

Sequenzierautomat	Applied Biosystems ABI Prism® 3100 – Avant Genetic Analyzer
Spektralphotometer	Amersham Biosciences GeneQuant pro
Stanze	Beecher Instruments Micro-Array Technology
Sterilbank	Heraeus Hera safe
TaqMan	ABI Prism®7900 HAT Sequence detection System
Thermocycler	Eppendorf Mastercycler personal Eppendorf Mastercycler gradient
Trockenschrank	Memmer Trockenschrank
Vortex	Scientific Industries Vortex Genie 2
Wasserbäder	Heinse-Ziller GFL 1086 Köttermann Labortechnik

2.7. Datenbanken und Software

BAC- und PAC-Klone	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/clone/
Chromas, Version 1.45	http://www.technelysium.com.au/
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
NCBI-BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
NCBI MapViewer	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi
Oligonucleotid-Design	http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi
TP53-Datenbanken	http://www-p53.iarc.fr/index.html

3. Methoden

3.1. Zytogenetische Untersuchungen

3.1.1. Anfertigung von Zellkulturen aus Patientenmaterial (Lymphknoten)

Zur Inkulturnahme von Lymphozyten, wurde der Lymphknoten in einem sterilen Netz in eine Petrischale gegeben und abhängig von der Größe mit 10-20 ml Kulturmedium (RPMI-1640) versetzt. Durch Quetschen des Lymphknotens mit einer sterilen Pinzette, konnten Lymphozyten aus dem Zellverband gelöst werden, während größere Bestandteile im Netz zurückblieben. Anschließend wurde das Kulturmedium in ein 10 ml Röhrchen überführt und bei RT 10 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand komplett abgenommen und die Zellen abhängig von der Größe des Zellpellets in 5-10 ml Kulturmedium resuspendiert. Zum Auszählen der Zellen wurden 20 µl der Zellsuspension mit 180 µl Trypanblau versetzt, durch vortexen gemischt und in der Zählkammer ausgewertet. Abhängig von der Diagnose erfolgte die Zugabe der erforderlichen Stimulantien (Tab. 11, Anhang) und Inkubation der Kultur bei 37°C.

3.1.2. Kulturabbruch

Der Abbruch der Zellkultur erfolgte durch die Zugabe von 100 µl Colcemid und anschließendem Inkubieren bei 37°C. Nach 30-minütiger Inkubationszeit wurde die Zellkultur in ein 10 ml-Kulturröhrchen überführt und bei RT 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde bis zum unteren Markierungsrand abgenommen und verworfen, das Pellet in 0,075 M KCl resuspendiert und für 20 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte ein 10-minütiger Zentrifugationsschritt bei 1000 rpm. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Die Zellen wurden dann unter vortexen tropfenweise mit eisgekühltem Carnoy-Material (Methanol:Essigsäure 3:1) fixiert und erneut bei RT 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Nach Abpipettieren des Überstands wurde der Fixierungsschritt wiederholt, bis der Überstand klar war.

Zur Herstellung eines Standards für die darauffolgende Chromosomenbänderung wurden 5 Tropfen der in Carnoy-Material fixierten Zellen auf einen OT getropft und getrocknet. Nach dem Trockenvorgang wurde der OT 3 min in Giemsa angefärbt. Mit 10-facher Vergrößerung konnten dann unter dem Mikroskop die Metaphasen ausgezählt werden.

Abhängig von der Anzahl der Metaphasen erfolgte abschließend das weitere Austropfen der Zellsuspension. Die OT wurden bei 56°C im Trockenofen 3-5 Tage getrocknet.

3.1.3. Giemsa-Bändern mit Trypsin

Fünf ml Giemsa wurden durch einen Faltenfilter in eine Küvette gegossen und auf 100 ml mit Sörensen-Puffer aufgefüllt. Für den Trypsinverdau wurden 50 mg Trypsin in 100 ml PBS gelöst. Um eine optimale Trypsin G-Bänderung zu erhalten, wurde zunächst nur ein OT für 30 sec in die Trypsinlösung gestellt, anschließend in PBS durch leichtes Schwenken gewaschen und schließlich 6 min in der Giemsalösung gefärbt. Nach dem Waschen mit H₂O wurde der OT getrocknet. Die Bänderung konnte dann unter dem Mikroskop beurteilt werden, um Aussagen über die Länge der Trypsin-Behandlung treffen zu können. Abhängig von Unter- bzw. Übertrypsinierung konnte die Länge des Trypsin-Verdaus in 5 Sekunden-Abständen gesteigert oder vermindert werden.

3.1.4. Auswertung

Zur Visualisierung und Auswertung wurde die Software von Meta Systems (isis in situ imaging system) verwendet.

3.2. Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung dient dem Nachweis von DNA- bzw. RNA-Sequenzen in Gewebe- und Zellpräparaten. Die Methode basiert auf der spezifischen Hybridisierung mit einer, mit fluoreszierenden Farbstoffen markierten, Nukleinsäure-Sonde mit der komplementären zellulären DNA bzw. RNA auf einem Gewebeschnitt. Als Sonden werden spezifische DNA-Sequenzen in einen Vektor eingebaut, der dann in Wirtszellen amplifiziert werden kann. Als Vektoren dienen u.a. künstliche Bakterien- oder Phagenchromosome (BAC: „Bacterial Artificial Chromosome“; PAC: „Phage 1 Artificial Chromosome“).

Die Zweifarben-FISH (Dual-Color-FISH) ermöglicht den gleichzeitigen Nachweis von zwei DNA-Sequenzen unterschiedlicher Genabschnitte durch die Verwendung von lokusspezifischen DNA-Sonden, die an verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe konjugiert sind.

3.2.1. Selektion der Klone für die Hybridisierung von Chromosom 17p

Die verwendeten BAC und PAC Klone für den kurzen Arm von Chromosom 17 wurden aus der NCBI-Datenbank ausgewählt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/clone>) und sind Bestandteil der „Contig“-Region NT_010718, die die chromosomale Region von 17p13.1 bis 17p13.3 mit sich überlappenden Klonen abdeckt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?taxid=9606&chr=17>). Die Klone wurden aus den Bibliotheken RPCIB753 oder RPCIP704 des Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung (RZPD, Berlin) bestellt. Eine genaue Aufstellung der Klone, sowie die zugehörigen Wachstumsbedingungen finden sich in Tabelle 2 im Anhang.

3.2.2. Bakterienanzucht und Plasmidisolierung

Die Bakterienanzucht und Plasmidisolierung zur Herstellung der Sonden für die Hybridisierung von Chromosom 17p wurden gemäß Standardtechniken durchgeführt. Dazu wurden die entsprechenden Klone zunächst unter Antibiotika-Selektion in Luria-Bertani (LB)-Medium angezogen. Anschließend erfolgte eine Lyse in NaOH/SDS in Gegenwart von RNase A^{103,104} um die Bakterien aufzuschließen. Die Plasmid-DNA wurde dann über eine Silica-Säule gemäß dem "Low Copy Plasmid Purification Protocol" des verwendeten Isolations-Kits (Machery-Nagel) rückgewonnen und aufgereinigt.

3.2.3. Verifizierung der BAC- und PAC-Klone

Zur Verifizierung wurde die nach Plasmidisolierung gewonnene BAC-/PAC-DNA mittels „Sequence Tagged Site“ (STS)-Markern in der PCR amplifiziert. Die jeweiligen BAC-spezifischen STS-Primer wurden aus der NCBI-Datenbank ausgewählt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/clone/>). Eine Auflistung aller verwendeten STS-Oligonukleotide findet sich in Tabelle 3 im Anhang. Der Reaktionsmix für einen einfachen PCR-Ansatz enthielt 30 ng genomische DNA, 1,5 U Taq Polymerase (Fermentas), je 200 µM dNTP, 2,5 mM MgCl₂ und je 0,1 µM Oligonukleotid in einem Reaktionsvolumen von 20 µL. Die PCR wurde in einem automatischen Thermocycler (Eppendorf, Gradient) mit folgenden Zyklen durchgeführt: Initiale Denaturierung bei 95°C (2 min); anschließend folgten 30 Zyklen mit Denaturierung bei 94°C (30 sec), Annealing bei 56°C – 60°C (30 sec), Extension bei 72°C (60 sec). Abschließend erfolgte eine finale Extension bei 72°C (5 min).

Um ein reproduzierbares genetisches Profil zu erstellen, wurden die BAC-/PAC-Klone mit dem Restriktionsenzym HindIII verdaut. In ein Reaktionsvolumen von 25 µl wurden 1 µg DNA, 1 µl 10 U/µl HindIII, sowie 2,5 µl 10xPuffer eingesetzt. Der Restriktionsverdau erfolgte für 15 h bei 37°C. Im Anschluss wurden 10 µl des Reaktionsansatzes auf ein 0,6%iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch bei 50 V aufgetrennt.

3.2.4. Markierung genomischer BAC- und PAC-DNA durch Nick-Translation

Bei der Nick-Translation¹⁰⁵ setzt die DNase Einzelstrangeinschnitte (nicks) in die DNA. Die Polymerase I entfernt die alten Nukleotide und ersetzt diese bei einer Synthesereaktion mit neuen markierten und unmarkierten Nukleotiden.

Zur Markierung werden mit Biotin- und Digoxigenin-gekoppelte dUTPs verwendet, die nach der Hybridisierungsreaktion mit Avidin- bzw. Antidigoxigenin-konjugierten Farbstoffen detektiert werden.

a) Biotin-Markierung

Die Markierung der Plasmid-DNA mit Biotin erfolgte mit einem Nick-Translation-Kit (Invitrogen). Hierzu wurde 1 µg DNA eingesetzt und analog dem Protokoll des Herstellers mit 5 µl 10 x dNTP-Biotin-Mix, 5 µl Enzym-Mix und H₂O (ad 50 µl) zugegeben. Der Ansatz wurde bei 16°C für 40 min inkubiert. Die Größe der DNA-Fragmente wurde anschließend mittels DNA-Gelelektrophorese überprüft, um die Inkubationszeit individuell zu verlängern. Durch die Zugabe von 5 µl Stop-Puffer konnte die Reaktion beendet werden.

b) Digoxigenin-Markierung

Zur Markierung der Sonden mit Digoxigenin-16-dUTP (Roche) wurde zunächst ein Nukleotid-Mix hergestellt, der aus je 0,25 mM dATP, dCTP, dGTP, sowie 0,1 mM dTTP und 0,1 mM dig-16-dUTP bestand. 5 µl des Nukleotid-Mix, 5 µl β-Mercaptoethanol, 5 µl 10 x Puffer wurden mit 1 µg DNA und 5 µl Enzym-Mix (0,5 U/µl DNA Polymerase I, 0,007 U/µl DNase I) versetzt und auf 50 µl mit H₂O aufgefüllt. Anschließend konnte die Probe bei 16°C für 40 min inkubiert werden. Nach ausreichender Inkubationszeit und Kontroll-Gelelektrophorese wurde die Reaktion mit 2 µl 0,2 M EDTA beendet.

c) Ethanol-Fällung

Im Anschluss an die Nick-Translation wurde die markierte DNA durch Zugabe von 2 µl Sheared Salmon sperm DNA (10 mg/ml, Eppendorf), 6 µl Cot DNA (1 µg/µl, Roche) und 1/10 Volumen 3 M Natrium-Acetat, sowie des 2,5-fachen Volumens 100% Ethanol bei -70°C gefällt. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit konnte die Probe bei 4°C für 30 min bei 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen werden. Das trockene DNA-Pellet wurde dann in 30 µl Hybridisierungsmix resuspendiert und bei 37°C für 30 min inkubiert.

3.2.5. Fluoreszenz in situ Hybridisierung an kultivierten Zellen

a) Präparation der Objektträger und Hybridisierung

Die Untersuchung aller DLBCL-Fälle erfolgte an kultivierten Zellen, die in Methanol-Eisessig (3:1) fixiert vorlagen. Das Material wurde auf einen OT getropft und bei RT getrocknet. Durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70% / 90% / 100%) erfolgte die Entwässerung des OT. Nach Trocknung wurde der OT mit 5 mg Pepsin (in 0,01 N NaOH) bei 38°C inkubiert, anschließend mit 1 x PBS gewaschen und mit 1% Paraformaldehyd fixiert. Es erfolgte erneut ein Wasch-Schritt des OT in PBS und die Entwässerung durch die aufsteigende Alkoholreihe. Nach Zugabe der markierten BAC-/PAC-Sonden, wurde die DNA bei 80°C für 10 min denaturiert. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht in einer feuchten Hybridisierungskammer bei 37°C.

b) Detektion

Nach einer 16-stündigen Hybridisierung erfolgte das Waschen des OT in 0,2 x SSC / 0,05% Tween20 für 2 min bei 72°C. Der Waschvorgang wurde anschließend zweimal wiederholt. Um unspezifische Bindung der Antikörper zu vermeiden, wurde der OT für 45 min bei 37°C mit TNB-Puffer vorbehandelt. Anschließend erfolgte die Detektion mit den entsprechenden Antikörpern und den assoziierten Fluorochromen. Biotinylierte Sonden wurden mit Texas Red-Streptavidin, biotinyliertem Goat-anti-Streptavidin und Texas Red-Streptavidin (Axxora) detektiert. Die Amplifikation der Digoxigenin-markierten Sonden erfolgte mit monoklonalen Mouse anti-Digoxigenin (Sigma), FITC-konjugiertem Rabbit-anti-Mouse Immunglobulin (Dako) und FITC-konjugiertem Goat-anti-Rabbit Immunglobulin (Axxora). Alle Antikörper wurden gemäß Angaben der Hersteller in TNB-Puffer verdünnt.

Nach Zugabe der jeweiligen Antikörper erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei 37°C, anschließend wurde der OT zweimal für 10 min in 1 x TN Puffer gewaschen. Nach dem letzten Wasch-Schritt wurde der OT durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und abschließend bei RT getrocknet. Nach Gegenfärbung des Materials mit DAPI wurde der OT zur optimalen Visualisierung mit Vectashield Mounting Medium (Axxora) eingebettet.

c) Fluoreszenz-Mikroskopie

Die Begutachtung des hybridisierten Materials erfolgte an einem mit Texas Red-, FITC-DAPI- und Triple-Filtern ausgestatteten Fluoreszenz-Mikroskop. Zur Visualisierung und Auswertung wurde die Software von Meta Systems (isis in situ imaging system) verwendet.

d) Auswertung

Um die Spezifität der Sonden zu überprüfen wurden Hybridisierungen mit kommerziellen Metaphasen-Präparationen der Firma Abbott durchgeführt.

Zur Detektion von Deletionen wurde in Präparaten von Lymphknoten mit reaktiver Lymphadenitis ein Schwellenwert (Cut off) ermittelt. Hierfür erfolgten Hybridisierungen aller BAC-/PAC-Sonden mit dem nicht-tumorösen Material. Nach Auswertung von 100 intakten Lymphozyten, wurde der Cut off-Wert für eine Deletion als Mittelwert aller Zellen mit einem Signal, abzüglich dreifacher Standardabweichung bestimmt (Tab. 4, Anhang).

Zur Auswertung aller nachfolgenden Hybridisierungen von Tumormaterial wurden jeweils die Signale von mindestens 100 Zellen beurteilt. Lag der Anteil der ausgewerteten Lymphozyten mit nur einem Signal über dem Cut off-Wert, galt der Tumor als positiv für eine Deletion.

3.3. Präparation und Analyse von DNA

3.3.1. Phenol-Chloroform-Extraktion

Mit einem Kryotom wurden je nach Größe des Frischgewebestückes 20-25 20 µm dicke Schnitte angefertigt. Die Proben wurden vor und nach dem Schneiden auf Trockeneis bei -78°C gelagert.

Zur DNA-Extraktion aus den Gewebesschnitten wurden 500 µl DNA-Isolationspuffer und 40 µl Proteinase K (20 mg/ml) zugegeben. Die Suspension wurde zwei Tage bei 55°C inkubiert.

Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 1 ml Phenol pro 500 µl-Ansatz. Im Invertierschüttler wurden die Proben 25 min bei RT gewaschen und anschließend bei RT zentrifugiert (10 min, 10000 rpm). Die wässrige DNA-Phase wurde in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und der Phenol-Arbeitsschritt wurde wiederholt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 500 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) sowie 500 µl Phenol. Die Proben wurden erneut für 25 min bei RT im Invertierschüttler inkubiert und nachfolgend bei RT abzentrifugiert (10 min, 10000 rpm). Die wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt, mit 500 µl Chloroform versetzt, im Invertierschüttler bei RT 25 min inkubiert und zuletzt zentrifugiert (10 min, 10000 rpm). Optional konnte der Chloroform-Waschschritt wiederholt werden. Zur abschließenden DNA-Fällung wurde die Probe mit 1/10 Volumen 3 M Natrium-Acetat und 2,5-fachen Volumen 100% Ethanol versetzt und bei -20°C 30 min inkubiert. Die Pelletierung erfolgte durch Zentrifugieren bei 4°C (15 min, 13000 rpm). Das DNA-Pellet wurde mit 75% Ethanol gewaschen und erneut abzentrifugiert. Abschließend erfolgte die Trocknung bei RT. Die DNA wurde in 50 µl TE-Puffer resuspendiert.

3.3.2. DNA-Extraktion aus viablen Zellen

Zur DNA-Extraktion aus viablen Zellen (Raji Zelllinie) wurde der QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen) verwendet. Die Aufarbeitung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

3.3.3. DNA-Extraktion aus Blut

Zur Bereitstellung von Negativ-Kontrollen, wurde aus dem Vollblut fünf gesunder Probanden genomische DNA isoliert. Hierbei wurden 10 ml Blut mit 40 ml Zell-Lyse-Puffer versetzt, leicht geschwenkt und 10 min bei 4°C inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt zur Pelletierung der Zellen bei 4°C (10 min, 3000 rpm), anschließend wurde der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 20 ml Zell-Lyse-Puffer resuspendiert, 10 min bei 4°C inkubiert und erneut bei 4°C abzentrifugiert (10 min, 3000 rpm). Nach Verwerfen des Überstandes erfolgte die Zugabe von 2,5 ml Dropping Puffer, 125 µl 10% SDS, sowie 1 mg Proteinase K, zum Zellpellet. Die Probe wurde über Nacht bei 55°C inkubiert. Anschließend

wurde die Probe mit 2,5 ml Dropping Puffer und 5 ml Phenol versetzt, im Invertierschüttler bei 4°C für 20 min inkubiert und anschließend bei 4°C abzentrifugiert (10 min, 3000 rpm). Nach Überführung der wässrigen Phase in ein neues 15 ml-Reaktionsgefäß, konnten 5 ml Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (75:24:1) zugegeben und die Probe bei 4°C erneut zentrifugiert werden (10 min, 3000 rpm). Die wässrige Phase wurde abgenommen, in ein neues Gefäß überführt, mit 5 ml Chloroform versetzt und bei 4°C abzentrifugiert (10 min, 3000 rpm). Nach Abnehmen der wässrigen Phase erfolgte die DNA-Fällung durch Zugabe von 500 µl 3 M Natrium-Acetat sowie 10 ml 96% Ethanol und einem leichten Schwenken der Probe. Mit steriler Impföse wurde die DNA aus der Probe entnommen, bei RT getrocknet und abschließend in 250-500 µl TE-Puffer resuspendiert.

3.3.4. Bestimmung der Konzentration und Integrität der DNA

a) Photometrische Messung

Die Konzentration der DNA wurde photometrisch durch die Messung der Absorption (OD: optische Dichte) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Eine A₂₆₀-Einheit entspricht hierbei einer Konzentration von 50 µg/ml Gesamt-DNA. Die DNA wurde für die Messung 1:80 mit H₂O verdünnt. Die Konzentration der Probe errechnet sich bei einer Schichtdicke der Küvette von 1 cm aus folgender Formel:

$$c = OD_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

c = Konzentration der DNA in der Probe

OD₂₆₀ = Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm

Mit dem Quotienten aus OD₂₆₀ und OD₂₈₀ konnte die Reinheit der DNA abgeschätzt werden.

b) DNA-Gelelektrophorese

Die Integrität der DNA wurde mittels Gelelektrophorese im Agarosegel und anschließender Ethidiumbromidfärbung bestimmt. Die intakte genomische DNA sollte im Bereich von > 1 kb liegen und bleibt aufgrund ihrer Größe z.T. bereits in den Geltaschen hängen. Bei der Analyse wurde stets ein DNA-Größenstandard mitgeführt.

Die elektrophoretische Probenaufftrennung erfolgte im Agarosegel bei 100 V. Anschließend wurden die DNA-Banden nach Färbung in verdünnter Ethidiumbromidlösung unter UV-Licht beurteilt.

3.3.5. Polymerasen-Kettenreaktion (PCR)

a) TP53

Die Untersuchung des TP53-Gens erfolgte mittels Amplifikation aller Exons im Bereich der kodierenden Sequenz des Gens. Hierbei wurden Exon 2 und 3, sowie Exon 5 und 6, als auch Exon 7 bis 9 zusammengefasst. Eine Einzelamplifikation erfolgte bei Exon 4, 10 und 11. Eine Auflistung aller verwendeten TP53-Primer zur Amplifikation genomischer DNA, sowie die zugehörigen Annealing-Temperaturen, finden sich in Tabelle 5 und 7 im Anhang.

Der Reaktionsmix für einen einfachen PCR-Ansatz enthielt 30 ng genomische DNA, 1,5 U Taq Polymerase (Fermentas), je 200 μ M dNTP, 2,5 mM $MgCl_2$ und je 0,1 μ M Oligonukleotid in einem Reaktionsvolumen von 20 μ l. Die PCR wurde in einem automatischen Thermocycler (Eppendorf, Gradient) mit folgenden Zyklen durchgeführt: Initiale Denaturierung bei 95°C (2 min); anschließend folgten 35 Zyklen mit Denaturierung bei 94°C (30 sec), Annealing bei 56,5°C – 59,1°C (30 sec), Extension bei 72°C (60 sec). Abschließend erfolgte eine finale Extension bei 72°C (5 min).

Der einfache Reaktionsmix für eine anschließende „Semi-Nested“-PCR, zur erneuten Amplifikation des PCR-Produktes, wurde wie oben beschrieben zusammen pipettiert, mit 1 μ l 1:10 verdünnter Vorläufer-PCR versetzt und im automatischen Thermocycler amplifiziert.

b) MDM2

Die Untersuchung des MDM2 „Single Nucleotide Polymorphism“ an Position 309 (SNP309) des MDM2-Promoters erfolgte, wie bereits beschrieben, mittels Amplifikation der MDM2-Promotersequenz und anschließender Sequenzanalyse des gebildeten Produkts¹⁰⁶.

3.3.6. Sequenzanalyse genomischer DNA (nach¹⁰⁷)

a) Aufreinigung des PCR-Produktes

Das mittels PCR amplifizierte Produkt wurde auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen; zur Größenbestimmung wurde ein Größenstandard mitgeführt. Unter UV-Licht wurde das PCR-Produkt anhand seiner Größe identifiziert und mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten. Die Aufreinigung erfolgte mit dem „Rapid Gel Extraktion“ System von Marligen analog dem Protokoll des Herstellers. Die DNA wurde zuletzt mit 25 μ l TE-Puffer von der Silica-Säule eluiert.

Die Konzentration der aufgereinigten DNA wurde durch Gelelektrophorese mit dem Mengenstandard „DNA-Low-Mass-Ladder“ (Invitrogen) bestimmt.

b) Sequenzier-PCR

Analog den Herstellerangaben (Applied Biosystems) enthielt der einfache Reaktionsansatz folgende Komponenten:

Cycle Mix 3.1 (Applied Biosystems)	2 µl
1 pmol/µl Primer	1,6 µl
DNA	10 ng
H ₂ O	ad 10 µl

Die Reaktionsbedingungen für die PCR-Amplifikation wurden entsprechend den Herstellerangaben gewählt. Eine Übersicht der für die Sequenzierreaktion verwendeten Oligonukleotide findet sich in Tabelle 6 und 7 im Anhang.

c) **Aufreinigung der Sequenzier-PCR über Sephadex-Säulen**

Im Anschluss an die Sequenzier-PCR wurden die Proben mit einer G50 Sephadex-Säule aufgereinigt, um verbliebene dNTPs und Oligonukleotide zu entfernen. Eine 100 µl Pipettenspitze mit Filter wurde abgeschnitten und in einem perforierten Deckel auf ein 1,5 ml Reaktionsgefäß aufgeschraubt. Die Spitze wurde oberhalb des Filters bis zum oberen Rand mit Sephadex-Lösung befüllt und 5 min bei 3000 rpm zentrifugiert, der Durchfluss wurde verworfen. In ein neues Reaktionsgefäß wurde 1 µl Natrium-Acetat (1/10 des Volumens der Sequenzier-PCR) und 50 µl 100% Ethanol (5-faches Volumen der Sequenzier-PCR) pipettiert. Die Sephadex-Säule wurde aufgeschraubt, mit den Proben beladen und 3 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Nun wurde die Säule verworfen, ein geschlossener Deckel aufgeschraubt und die Probe zum Ausfällen der DNA gevortext. Die Probe wurde durch Zentrifugation (5 min, 14000 rpm) pelletiert, bei 50°C für 10 min getrocknet und in 20 µl Hi-Di™-Formamid (Applied Biosystems) aufgenommen. Vor dem Start der Sequenzierung wurden die Proben für 10 min bei 70°C denaturiert.

Die Sequenzanalyse wurde mit dem Sequenzierautomaten ABI PRISM® 3100 Avant Genetic Analyzer von Applied Biosystems/HITACHI nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

d) **Analyse der Sequenzen**

Die Auswertung erfolgte mit der Software „DNA Sequencing Analysis Software™ Version 5.1“ des Herstellers, sowie mit der frei erhältlichen Chromas Software, Version 1.45 (<http://www.technelysium.com.au/>). Die erhaltenen Sequenzen wurden mithilfe des „Basic Logical Alignment Search Tools“ von NCBI verglichen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

3.3.7. **Quantitative Real-time PCR (Q-PCR)**

a) **Prinzip der Real-time PCR**

Das Prinzip der quantitativen Real-time PCR ist die kontinuierliche Messung des über die Reaktionszeit akkumulierenden PCR-Produktes. Dies wird durch die Verknüpfung der zyklisch ansteigenden Menge des PCR-Produktes mit einem Fluoreszenzsignal ermöglicht. Die Intensität der emittierten Fluoreszenz ist proportional zur Menge des synthetisierten

PCR-Produktes. Je höher die Ausgangszahl der Zielsequenz ist, desto früher (niedrigere Zyklenzahl) findet man eine den Schwellenwert übersteigende Menge des Amplifikationsproduktes. Als Richtwert für diesen Schwellenwert nimmt man die Zykluszahl, bei der sich das Fluoreszenzsignal zum ersten Mal deutlich vom Hintergrund abhebt; dieser Schwellenwert wird als C_T -Wert (threshold cycle) bezeichnet. Die PCR ist dann am Beginn des exponentiellen Anstiegs der PCR-Produktmenge. Die Unterschiede der Proben bei diesem Schwellenwert (C_T -Wert) geben Auskunft über die Ausgangsmenge der Zielsequenz in der Probe^{108,109}.

Durch die kontinuierliche Messung der emittierten Fluoreszenz in jedem Zyklus der PCR kann die exponentielle Phase der Reaktion identifiziert werden. Die exponentielle Phase der PCR muss für die quantitative Messung bekannt sein, da in dieser Phase die Amplifikationseffizienz näherungsweise konstant ist. Die exponentielle Phase der PCR wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$X_n = X_0 \times (1 + E_A)^n$$

- X_n Anzahl der Zielmoleküle zum Zeitpunkt (Zyklus) n der Reaktion
- X_0 Anzahl der Zielmoleküle zum Zeitpunkt 0
- E_A Effizienz der Amplifikationsreaktion
- n Anzahl der Zyklen

b) Detektion von genomischen Deletionen

Zur Detektion genomischer Deletionen von TP53 und HIC1 wurde eine quantitative Real-time PCR auf DNA-Ebene durchgeführt. Als Ausgangsmaterial diente hierbei genomische DNA von Tumorpatienten aus Frischmaterial. Basierend auf Ergebnissen komparativer genomischer Hybridisierungen (CGH) an DLBCL-Fällen, wurden zwei Referenzgene ausgewählt (β 2-Mikroglobulin: B2M; Hämoglobin B: HBB), die in chromosomalen Regionen ohne ausgeprägte numerische Alterationen lokalisiert sind (vgl. Tab.8, Anhang). Eine Aufstellung aller verwendeten Oligonukleotide findet sich in Tabelle 8 im Anhang. Aus peripherem Blut fünf gesunder Probanden, sowie aus drei Lymphknoten mit reaktiver Lymphadenitis, wurde DNA extrahiert, die als Negativkontrollen eingesetzt wurden. Für jede dieser Kontrollen wurde die Ratio aus der TP53- und HIC1- Amplifikation relativ zur Amplifikation der Referenzgene B2M und HBB berechnet. Aus den Werten der Negativkontrollen konnte eine Cut off-Ratio ermittelt werden, die mit den relativen Werten der Tumorproben verglichen werden konnte, um Deletionen auf genomischer Ebene im Tumorgewebe nachzuweisen. Der Cut off für eine Deletion wurde für jedes Gen als Mittelwert abzüglich dreifacher Standardabweichung bestimmt. Eine Tumorprobe, deren

relative Amplifikationsratio unter dem Cut off-Wert des jeweiligen TSG lag, wurde als Träger einer genomischen Deletion für dieses Gen erachtet.

3.3.8. Analyse des DNA-Methylierungsstatus

a) Prinzip der DNA-Methylierung

In höheren Eukaryoten findet die Methylierung genomischer DNA an Cytosinresten statt, die in 5'-Richtung eines Guanosinrestes, in einem sogenannten CpG-Dinukleotid, liegen. Diese Modifikation dient der Regulation der Genexpression, insbesondere wenn CpG-reiche Regionen (CpG-Inseln) in der Promoterregion der betreffenden Gene vorkommen. Während CpG-Inseln von Genen, die auf autosomalen Chromosomen lokalisiert sind, in der Regel vor Methylierung geschützt sind, konnte gezeigt werden, dass die Methylierung von CpG-Inseln mit der transkriptionellen Inaktivierung von Genen auf den X-Chromosomen von Frauen assoziiert ist.

Eine aberrante Methylierung allerdings, konnte mit der Immortalisierung und Transformation von Zellen in Zusammenhang gebracht werden, die an der Tumorprogression beteiligt sein können. Häufige Zielgene aberranter DNA-Methylierung sind TSG, deren epigenetische Veränderungen in einer verminderten Genexpression resultieren.

Zur Untersuchung des HIC-1-Methylierungsstatus wurde eine Bisulfit-Behandlung der Tumor-DNA mit einer anschließenden methylierungsspezifischen PCR durchgeführt.

b) Bisulfit-Behandlung

Durch die Behandlung der DNA mit Bisulfit werden unmethylierte Cytosinreste zu Uracil konvertiert, während methylierte Cytosinreste unverändert bleiben. Eine anschließende Desulphonierung bewirkt die Umschreibung von Uracil zu Thymin.

Die Bisulfit-Behandlung der Kontroll- und Tumor-DNA erfolgte mit Hilfe des „EZ DNA Methylation-Gold Kit™“ (Zymo Research) analog dem Protokoll des Herstellers. Pro Reaktion wurden 500 ng DNA eingesetzt.

Um die Effizienz der Bisulfit-Behandlung zu überprüfen, wurde jeweils ein Standard mitgeführt. Der „Universal Methylated Human DNA Standard“ (Zymo Research) wurde analog den Angaben des Herstellers bei jeder Reaktion eingesetzt.

c) Methylierungsspezifische PCR (MS-PCR) (nach ¹¹⁰)

Im Anschluss an die Bisulfit-Behandlung wurde die DNA mittels PCR amplifiziert. Durch die Entwicklung spezifischer Oligonukleotide konnte zwischen methylierter und unmethylierter DNA unterschieden werden, die sich aus den Sequenzunterschieden der Bisulfit-Behandlung ergaben. Es wurden Primer für die 5'-untranslatierten Region (5'-UTR) von HIC1 (Exon 1a) verwendet, die bereits beschrieben wurden ¹¹¹ (Tab. 10, Anhang). Die Amplifikation der mit

Bisulfit behandelten DNA erfolgte in einem 25 µl Reaktionsansatz mit 1,5 mM MgCl₂ (Qiagen), je 200 µM dNTP, 10 pmol/µl der jeweiligen Primer und 2,5 U HotStar Taq DNA Polymerase (Qiagen). Nach einer initialen Denaturierung (95°C, 15 min) folgten 35 Zyklen mit Denaturierung bei 94°C (30 sec), Annealing bei 58,5°C bis 60,7°C (30 sec) und Extension bei 72°C (30 sec). Abschließend erfolgte eine finale Extension bei 72°C (5 min). Die MS-PCR wurde in einem automatischen Thermocycler (Eppendorf, Gradient) durchgeführt.

Die Bisulfit behandelte DNA von fünf gesunden Probanden, sowie von fünf Lymphknoten mit reaktiver Lymphadenitis dienten als Negativkontrolle, während die konvertierte DNA von Raji Zelllinien als Positivkontrolle verwendet wurden.

Die MS-PCR-Produkte wurden in einem 3%igem Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Das Auftragen eines Größenstandards ermöglichte die Identifizierung der Produkte.

3.4. Präparation und Analyse von RNA

3.4.1. Routinemäßige Methoden bei der Arbeit mit RNA

Routinemäßig wurden bei allen Arbeiten mit RNA Kontakt- und Arbeitsflächen zunächst mit RNase zap gesäubert und stets Einmalhandschuhe getragen. Beim Anfertigen der Gewebeschnitte wurden alle verwendeten Werkzeuge mit NaOH, sowie anschließend mit Ethanol und H₂O abgespült. Wann immer möglich war, wurden sterile Einmalartikel (mit dem Zusatz RNase-frei) verwendet.

3.4.2. Extraktion von RNA aus Frischgewebe

Mit einem Kryotom wurden je nach Größe des Gewebestückes 10-20 je 15 µm dicke Schnitte angefertigt. Die Proben wurden vor und nach dem Schneiden auf Trockeneis bei -78°C gelagert.

Die RNA-Isolierung wurde mit Trizol[®] Reagenz durchgeführt, welche auf der Methode von Chomzynski und Sacchi ¹¹² basiert. Zu jeder Probe wurden 1000 µl Trizol[®] Reagenz hinzugefügt; anschließend wurden die Proben mittels Spritze und Kanüle homogenisiert (Kanülengrößen 20G, 22G, 23G, 26G, 27G). Die weitere Aufarbeitung erfolgte nach der Anleitung des Herstellers. Die RNA-Pellets wurden luftgetrocknet und je nach Größe in 15-30 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert, zunächst einige Minuten bei RT und anschließend zur raschen und vollständigen Resuspension 10 min bei 65°C inkubiert. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

3.4.3. Bestimmung der Konzentration und Integrität der RNA

a) Photometrische Messung

Die Konzentration der RNA wurde photometrisch durch die Messung der Absorption (OD; optische Dichte) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Eine A₂₆₀-Einheit entspricht hierbei einer Konzentration von 40 µg/ml Gesamt-RNA. Die RNA wurde für die Messung 1:70 mit 10 mM Tris/HCl (pH7) verdünnt. Die Konzentration der unverdünnten Probe errechnet sich bei einer Schichtdicke der Küvette von 1 cm aus folgender Formel:

$$c = OD_{260} \times 40 \text{ µg/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

c = Konzentration der RNA in der unverdünnten Probe

OD₂₆₀ = Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm

b) RNA-Gelelektrophorese

Die Integrität der RNA wurde mittels Gelelektrophorese im Agarosegel und anschließender Ethidiumbromidfärbung bestimmt. Mittels der ribosomalen RNA-Banden 28s und 18s konnte eine Aussage über die Integrität der RNA getroffen werden. Es wurde stets ein RNA-Größenstandard mitgeführt.

Um Sekundärstrukturen der RNA zu denaturieren, wurde zu den aufzutragenden Proben formaldehydhaltiger Laufpuffer und Blaumarker zugegeben und die Proben für 10 min bei 70°C erhitzt. Die Proben wurden in einem 1%igen Agarosegel bei 100 V elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die RNA-Banden nach Färbung in verdünnter Ethidiumbromidlösung unter UV-Licht beurteilt.

3.4.4. cDNA-Synthese

Da RNA-Moleküle nicht als Matrize in der PCR eingesetzt werden können, müssen diese zunächst durch eine reverse Transkription in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden.

Für die cDNA-Synthese wurde der „iScript cDNA Synthesis Kit“ (BioRad) verwendet. Dieses System beinhaltet MuLV Reverse Transkriptase und Zufallsprimer (Random Hexamers). Der Reaktionsansatz erfolgte analog den Angaben des Herstellers.

Die cDNA-Synthese wurde in einem Eppendorf Thermocycler mit Deckelheizung nach den Herstelleranweisungen durchgeführt. Die Proben wurden anschließend bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

3.4.5. FASAY - “Functional Analysis of Seperated Alleles in Yeast“ (nach ^{100,101}) - und Split Assay (nach ¹¹³)

a) Prinzip des FASAY und „Split Assay“

Bei der FASAY-Analyse handelt es sich um eine Methode zum Nachweis von TP53-Mutationen auf funktionaler Ebene. Aus Frischmaterial extrahierte RNA wird in cDNA umgeschrieben und die zentrale Region des TP53 Gens kann mittels PCR amplifiziert werden. Hefezellen des Stamms yIG397 werden anschließend mit dem PCR-Produkt und dem linearen Expressionsvektor pSS16, der LEU2 (Leucin) als Selektionsmarker enthält, kotransformiert. Durch homologe Rekombination wird das PCR-Produkt in den Hefezellen in den Vektor kloniert, was zu einer konstitutiven Expression von p53 Protein führt. Der Hefestamm yIG397 ist LEU2- und ADE2 (Adenin)-defizient und verfügt über ein integriertes Plasmid mit offenem ADE2-Leserahmen, welcher unter der Kontrolle eines Minimalpromoters und p53-RGC-Bindungsstellen steht. Hefezellen die mit einem Wildtyp-p53-kodierenden Plasmid transformiert wurden, können ADE2 exprimieren und zeigen daher auf Selektionsmedium reguläres Wachstum der Kolonien (weiße Kolonien). Dagegen wird ADE2 in Zellen, die über mutiertes p53 verfügen, nicht synthetisiert. Aufgrund der Akkumulation eines Intermediats des Adeninmetabolismus, zeigen die Kolonien eingeschränktes Wachstum mit Rotfärbung (Abb. 5).

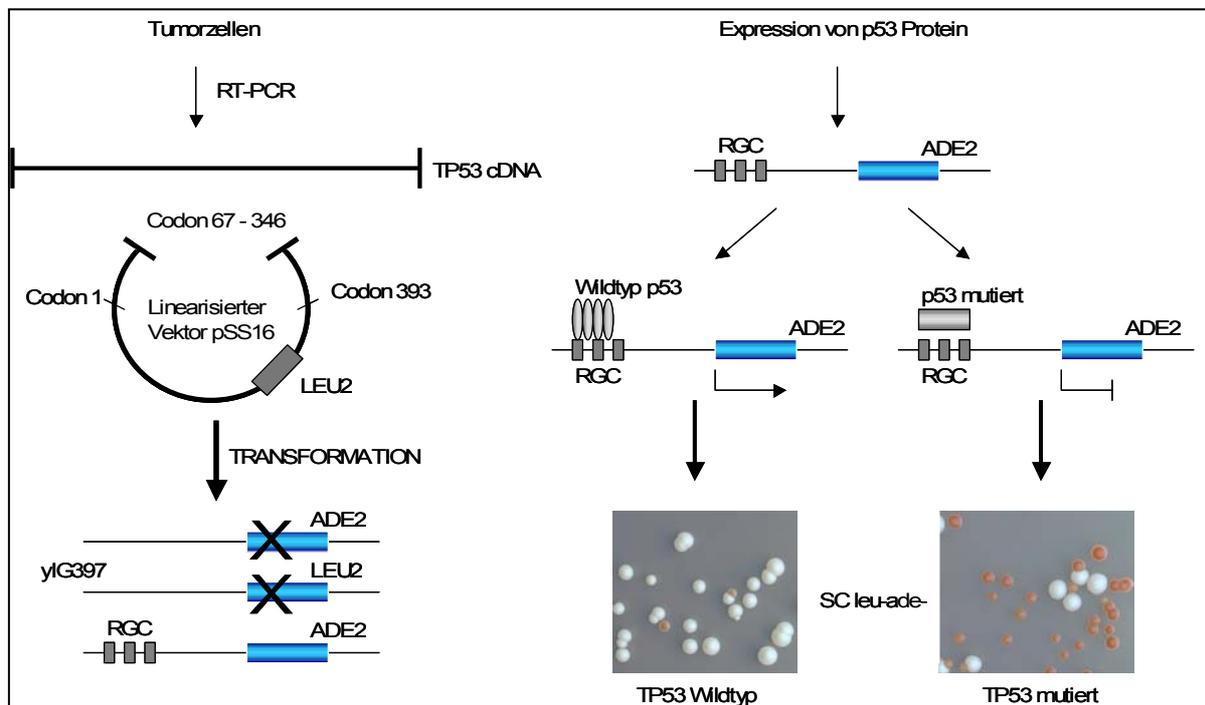


Abbildung 5: Schematische Übersicht über das Prinzip des FASAY zur Untersuchung der p53-Funktionalität (nach ¹¹⁴).

Eine modifizierte Version des FASAY stellt der sogenannte „Split Assay“ dar, der die separate Analyse der 5'- und 3'-Hälften des TP53-Gens ermöglicht. Mit Ausnahme der

initialen PCR, bei der die Amplifikation der jeweiligen Hälften erfolgt, wurde der Split Assay analog der FASAY-Untersuchungen durchgeführt.

Der „Split Assay“ wurde insbesondere bei schlechter RNA-Qualität angewendet, da die resultierenden Produkte im Vergleich zur FASAY-Analyse kleiner, und somit einfacher zu amplifizieren sind.

b) Amplifikation von TP53-cDNA

Bei der Analyse des TP53-Gens mittels FASAY/Split Assay wurde in cDNA umgeschriebene RNA, die aus Frischmaterial isoliert wurde, verwendet. Die zentrale Region von TP53 (Codon 67 bis 346) wurde mit den entsprechenden Oligonukleotiden mittels PCR amplifiziert. Die Amplifikation von TP53 im FASAY erfolgte mit den Primern P3 und P4 (Tab. 9, Anhang). Beim Split Assay wurden für die Analyse der 3'-Hälfte von TP53 die Oligonukleotide P3 und P17 verwendet. Die 5'-Hälfte des TP53-Gens wurde mit den Primern P4 und P16 amplifiziert (Tab. 9, Anhang). Der einfache Reaktionsansatz bestand aus folgenden Komponenten:

10 x Pfu Puffer	2 µl
DMSO	2 µl
50 µl/ml Primer FOR	2 µl
50 µl/ml Primer REV	2 µl
10 mM dNTP-Mix	1 µl
1 µg cDNA	2 µl
Pfu Polymerase	0,4 µl
H ₂ O	8,6 µl

Die PCR wurde in einem automatischen Thermocycler (Eppendorf, Gradient) mit folgenden Zyklen durchgeführt: Initiale Denaturierung bei 95°C (5 min); anschließend folgten 35 Zyklen mit Denaturierung bei 94°C (30 sec), Annealing bei 65°C (60 sec), Extension bei 72°C (80 sec). Abschließend erfolgte eine finale Extension bei 72°C (5 min).

Das PCR-Produkt wurde durch gelelektrophoretische Auftrennung im 1%igen Agarosegel identifiziert. Für die Transformation der Hefezellen wurden 5-10 µl des PCR-Reaktionsansatzes eingesetzt.

c) Aufzucht des Hefestamms yIG397

Die Aufzucht des Hefestammes yIG397 erfolgte durch die Überimpfung einer Hefekolonie in 5 ml YPDA-Vollmedium. Bei 30°C wurde die Flüssigkultur 12 h unter leichtem Schütteln (150 rpm) inkubiert. Von der Übernachtskultur wurden am nächsten Tag 1,3 ml in einen 50 ml-Kolben mit frischem YPDA-Medium überführt und bei 30°C weiter inkubiert. Durch Messung der Zelldichte bei 600 nm, konnte zu verschiedenen Zeitpunkten das Wachstum

der Zellen überprüft werden. Die Transformation wurde durchgeführt, nachdem eine OD_{600} von 0,8 erreicht war.

Zunächst erfolgte hierbei die Pelletierung der Hefezellen durch Zentrifugation bei RT (5 min, 5000 rpm). Anschließend wurden die Zellen in 50 ml H_2O resuspendiert, bei RT zentrifugiert (5 min, 5000 rpm) und in 10 ml H_2O aufgenommen. Um die spätere Aufnahme des Expressionsvektors zu gewährleisten, wurden die Zellen nach Zentrifugation bei RT (5 min, 5000 rpm) mit 5 ml Lithium-Acetat/TE-Puffer (LiAc/TE) vorbehandelt. Die Zellen wurden bei RT erneut abzentrifugiert und in 250 μ l LiAc/TE gelöst.

d) Transformation der Hefezellen

Abhängig von der Intensität des Produktes im Agarosegel, wurden 5-15 μ l PCR-Produkt für die Transformation des Hefestamms γ IG397 verwendet, die mit 50 ng linealisiertem Expressionsvektor pSS16 und 5 μ l 10 mg/ml salmon sperm DNA versetzt wurden. Der Suspension wurden 300 μ l PEG/LiAc/TE zugegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 30°C (150 rpm) wurden die Proben 15 min einer Temperatur von 42°C ausgesetzt. Abschließend erfolgte die Pelletierung der Zellen bei RT (10 sec, 14000 rpm). Die transformierten Zellen wurden in 200 μ l H_2O aufgenommen und in unterschiedlichen Konzentrationen (180 μ l, 20 μ l, 5 μ l) auf SC-- Platten ausgestrichen. Das Wachstum der Zellen erfolgte für 2 bis 3 Tage bei 35°C.

e) Auswertung

Nach ausreichendem Wachstum der Hefezellen, wurden rot- und weißgewachsene Kolonien auf der Inkubationsplatte gezählt. Ein Fall wurde für eine TP53-Mutation als positiv gewertet, wenn der Anteil der roten Kolonien mehr als 10% der Gesamtzellen ausmachte.

f) cDNA-Isolierung aus TP53-transformierten Hefezellen

Um die im FASAY erhobenen Aussagen über TP53-Mutationen zu verifizieren, erfolgte die Sequenzanalyse der aus den Hefezellen isolierten TP53-cDNA.

Zunächst wurden daher 8-10 rotgewachsene Kolonien von der Inkubationsplatte gepickt und in je 2,5 ml SC-- Medium bei 30°C inkubiert. Bei RT wurden die Zellen abzentrifugiert (1 min, 14000 rpm), anschließend in 0,5 ml Lysepuffer resuspendiert und bei 30°C inkubiert. Nach 30 min erfolgte die Zugabe von 200 μ l Proteinase K (4 mg/ml) und ein weiterer Inkubationsschritt von 10 min bei 65°C. Zum Waschen der DNA wurden 700 μ l Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (75:24:1) zugegeben, anschließend wurde die Probe kurz gevortext und schließlich abzentrifugiert (2 min, 14000 rpm). Es erfolgte die Zugabe von 500 μ l Chloroform, kurzes Vortexen und erneutes Abzentrifugieren der Probe (2 min, 14000 rpm). Zur Fällung der DNA wurde die Probe mit 1000 μ l 96% Ethanol versetzt, bei -20°C

45 min inkubiert und bei 4°C zentrifugiert (15 min, 14000 rpm). Das DNA-Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und erneut abzentrifugiert. Abschließend erfolgte die Resuspension der DNA in 40 µl TE-Puffer.

Die Sequenzier-PCR und die darauf folgende Sequenzanalyse von TP53-cDNA erfolgte analog den oben beschriebenen Protokollen mit dem Sequenzierautomaten ABI PRISM® 3100 Avant Genetic Analyzer von Applied Biosystems/HITACHI. Für die Sequenzanalyse von FASAY-Klonen wurden die Primer P3 und P4 für die Sequenzier-PCR eingesetzt, während bei der Analyse von Split Assay-Klonen jeweils P3/P17 oder P4/P16 angewendet wurden.

3.5. Immunhistochemische Untersuchungen von Proteinen

3.5.1. Immunhistochemische Färbungen an Paraffinmaterial

Paraffinschnitte wurden in Xylol entparaffiniert und durch eine absteigende Alkoholreihe rehydriert. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase wurden die Schnitte 10 min mit 30% Peroxid (50 µl in 70 ml Methanol) behandelt und anschließend die hitzevermittelte Epitop-Demaskierung mit 10 mM Citratpuffer (pH 7,0) oder mit Target Retrieval® (DakoCytomation, Hamburg) im Schnellkochtopf durchgeführt. Die Schnitte wurden dann mit entsprechend verdünnten Primäantikörpern eine Stunde bei RT inkubiert und anschließend dreimal 5 min in PBS gewaschen. Die Immunperoxidase-basierte Detektion wurde mit dem Histostain™-Plus Kit (Zymed, USA) entsprechend dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Zymed Kit verwendet das Streptavidin-Avidin-basierte Detektionssystem mit 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) als Chromogen.

3.5.2. Validierung der Antikörper

Um die bestmögliche Konzentration und Vorbehandlung der Antikörper zu ermitteln, und um die zelluläre Lokalisation des zu untersuchenden Proteins zu bestimmen, wurden die Antikörper zunächst an Positivkontrollen eingestellt. Eine Übersicht über alle verwendeten Antikörper, sowie den optimierten Bedingungen, findet sich in Tabelle 12 im Anhang.

Die Paraffin-Schnittpräparate von fünf Lymphknoten mit reaktiver Lymphadenitis dienten als Negativkontrolle. Die Kontrollen wurden analog den zu untersuchenden Tumor-Präparaten mit dem jeweiligen Antikörper gefärbt und ausgewertet, wobei die Anzahl positiver Zellen gezählt wurde.

Bei der Untersuchung der p53-Expression wurde die Färbung als positiv gewertet, wenn mehr als 20% der Zellen eine positive nukleäre Färbung zeigten.

Die Ermittlung der Proteinexpression von CHK2, MDM2, p21 und YY1 erfolgte durch die Bestimmung der mittleren Expression (% positiv gefärbter Zellen) \pm dreifacher Standardabweichung in Präparaten von fünf Lymphknoten mit reaktiver Lymphadenitis, die dann mit der Proteinexpression im Tumorgewebe verglichen werden konnte.

3.5.3. Erstellung eines „Array“-Blockes und Anfertigung von „Array“-Schnitten

Zunächst wurden von allen zu untersuchenden Fällen anhand der HE-Färbung ein Areal ausgewählt, das ausreichend Tumorzellen enthielt. Mit einem „Manual tissue puncher“ (Arrayer) der Firma Beecher Instruments (Silver Spring, Maryland, USA) wurden anschließend pro Fall mindestens drei 0,6 mm dicke Stenzen aus in Paraffin eingebettetem Lymphomgewebe entnommen und in einen eigenen Empfängerblock im Abstand von 1 mm eingebracht. Vom „Array“-Block wurden mit einem herkömmlichen Microtom 1 μ m dicke Schnittpräparate angefertigt. Die Schnitte wurden anschließend auf silanisierte Objektträger aufgezogen und für ca. eine Woche im Brutschrank bei 56°C getrocknet, um das Abschwimmen der Stenzen beim nachfolgenden Färben zu vermeiden.

Insgesamt 35 DLBCL wurden mittels immunhistochemischen Färbungen untersucht. Ein Arrayblock wurde von 25/35 Fällen angefertigt. Bei den restlichen 10 Fällen war die Gewebefläche des Paraffinpräparats allerdings zu klein um Stenzen für einen Arrayblock zu erhalten. Daher wurden Einzelschnitte angefertigt, die analog zu den gestanzten Fällen immunhistochemisch gefärbt wurden.

3.6. Statistik

Überlebensanalysen wurden mittels Kaplan-Meier untersucht. Statistische Korrelationen wurden mit dem Log Rank Test ermittelt und galten auf dem Niveau von $p < 0,05$ als signifikant.

Der Zusammenhang von zwei unabhängigen Faktoren, wie z.B. der Proteinexpression von bekannten p53-Regulatoren sowie der Vergleich von HIC1- und TP53-Status, wurden mittels Fisher's Exaktem Test oder Chi-Quadrat-Test bestimmt. Der Mittelwertvergleich der Proteinexpression im Normalgewebe versus Tumorgewebe erfolgte mittels t-Test und einfaktorieller ANOVA. Auch hier galten Korrelationen auf dem Niveau von $p < 0,05$ als signifikant.

Für alle Analysen wurde die SPSS Software Version 12.0 (SPSS Inc. Chicago IL) verwendet.

4. Ergebnisse

4.1. Untersuchung des TP53-Status in diffusen großzelligen B-Zell Lymphomen (DLBCL)

4.1.1. Deletionen in Chromosom 17p und aberrante Expression von p53-Protein

Insgesamt 172 DLBCL wurden bereits in den Jahren 1990 bis 2004 zytogenetisch analysiert. Dabei konnte in 34 von 172 Fällen (19,8%) eine monoallelische Deletion von Chromosom 17p [del(17p)] detektiert werden (Abb. 6A). Da die chromosomale Bande 17p13.1 den genetischen Lokus des TSG TP53 beinhaltet, wurden Fluoreszenz in situ Hybridisierungen (FISH) mit TP53-lokusspezifischen Sonden durchgeführt, um den Verlust des TP53-Gens zu validieren. Eine Deletion von TP53 konnte in 28/34 17p-deletierten DLBCL nachgewiesen werden (Abb. 6B), was auf eine TP53-unabhängige Deletion in Chromosom 17p in 6/34 Fällen hindeutete (Tab. 1, Anhang). In insgesamt 138/172 DLBCL wurde mittels Zytogenetik keine Aberration von Chromosom 17p nachgewiesen.

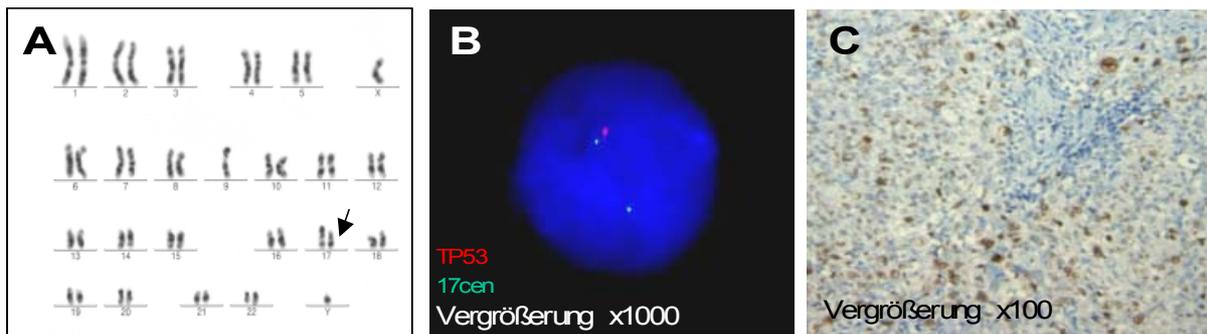


Abbildung 6: Karyotyp eines DLBCL mit einer Deletion im kurzen Arm von Chromosom 17p (A). Bei der Zweifarbigen-FISH wurde eine Kohybridisierung mit lokusspezifischen Sonden für TP53 (rot) und Centromer 17 (17cen) (grün) durchgeführt. Ein einzelnes Signal für TP53 legt das Vorliegen einer monoallelischen TP53-Deletion nahe (B). Immunhistochemische Überexpression von p53 Protein (C).

Da die Überexpression von p53 Protein als Indikator für eine Mutation des TP53-Gens gilt⁸¹, wurden alle 28 DLBCL mit monoallelischer TP53-Deletion, in Analogie zu Knudson's „two-hit“-Hypothese, mittels immunhistochemischer Färbungen von p53 untersucht. Ein positives Färbemuster konnte in 16/28 Fälle nachgewiesen werden (Abb. 6C), während in 12/28 DLBCL keine erhöhte Expression von p53 vorlag (Tab. 1, Anhang). Um die Diskrepanz zwischen der Deletion des TP53-Lokus und einer fehlenden Überexpression von p53 Protein in 12/28 Fällen aufzuklären, wurden Sequenzanalysen von allen 28 Fällen mit monoallelischer TP53-Deletion, sowie von den sechs DLBCL mit zytogenetischer del(17p), ohne gleichzeitige Deletion des TP53-Lokus, durchgeführt. Als Kontrollgruppe wurden aus dem Kollektiv von 138 DLBCL ohne zytogenetische Aberration von Chromosom 17p zufällig 21 Fälle ausgewählt. Immunhistochemische Färbungen von p53 lagen sowohl für die 21

Fälle ohne TP53-Deletion, als auch für die 6 DLBCL mit zytogenetischer del(17p) ohne gleichzeitigen Verlust des TP53-Lokus vor: Ein positives Färbemuster konnte in 6/27 Fällen nachgewiesen werden, während in 21/27 keine Überexpression von p53-Protein detektiert werden konnte (Tab. 1, Anhang).

4.1.2. TP53-Mutationen – Sequenzanalyse genomischer DNA

Um die aberrante Expression von p53-Protein mit der Mutation des TP53-Gens zu korrelieren, wurden entsprechende Analysen durchgeführt. Die Untersuchung der 55 Fälle erfolgte zunächst durch konventionelle Sequenzanalyse genomischer DNA, die aus Tumor-Frischgewebe extrahiert wurde.

Zur Untersuchung des TP53-Mutationsstatus wurde die vollständige kodierende Sequenz des Gens von Exon 2 bis 11 analysiert. Repräsentative Ergebnisse der Sequenzanalyse genomischer DNA, in Zusammenhang mit der Überexpression von p53-Protein, sind in Tabelle 1 zusammengefasst:

	p53+	p53-	gesamt
TP53 WT	11	33	44
TP53 MUT	11	0	11
gesamt	22	33	55

Tabelle 1: Übersicht über die Mutationsfrequenz des TP53-Gens im Vergleich zur Expression von p53-Protein (WT: Wildtyp; MUT: mutiert; p53+: Nukleäre Expression von p53-Protein in $\geq 20\%$ der Zellen; p53-: Expression von p53-Protein in $< 20\%$ der Zellen).

In den 55 untersuchten DLBCL konnten in 11 Fällen (20%) Mutationen nachgewiesen werden, die jeweils Exon 5 bis 8 betrafen (vgl. Tab. 3), und die alle mit einer aberranten Expression von p53-Protein assoziiert waren. In den verbliebenen 11 Fällen mit positiver p53-Färbung konnte mittels Sequenzanalyse keine Mutationen in den Exons 2 bis 11 detektiert werden (Tab. 1).

Keiner der 33 Fälle mit fehlender Überexpression von p53-Protein wies bei der Sequenzanalyse von Exon 2 bis 11 eine Mutation des TP53-Gens auf (Tab. 1).

4.1.3. Funktionelle Analyse von p53 mittels FASAY („Functional Analysis of Separated Alleles in Yeast“)

Da nur in 50% der Fälle (11/22) mit aberranter p53-Expression eine gleichzeitige Mutation des TP53-Gens nachgewiesen werden konnte, wurden einzelne DLBCL mittels FASAY untersucht. Da die Methode auf der Transformation von Hefezellen basiert, ermöglicht

FASAY den Nachweis von TP53-Mutationen selbst in Proben, die nur über einen geringen Anteil von mutierten Tumorzellklonen verfügen.

Durch den farblichen Unterschied der transformierten Hefekolonien konnte Wildtyp TP53 von mutiertem TP53 unterschieden werden. Während Hefezellen, die normales TP53 exprimierten, weiße Kolonien bildeten, zeigten die Zellen, die über mutiertes TP53 verfügten, die Formation rotgefärbter Kolonien. Ein Fall wurde für eine TP53-Mutation als positiv gewertet, wenn der Anteil von roten Hefekolonien mehr als 10% der Gesamtkolonien ausmachte (Abb. 7A).

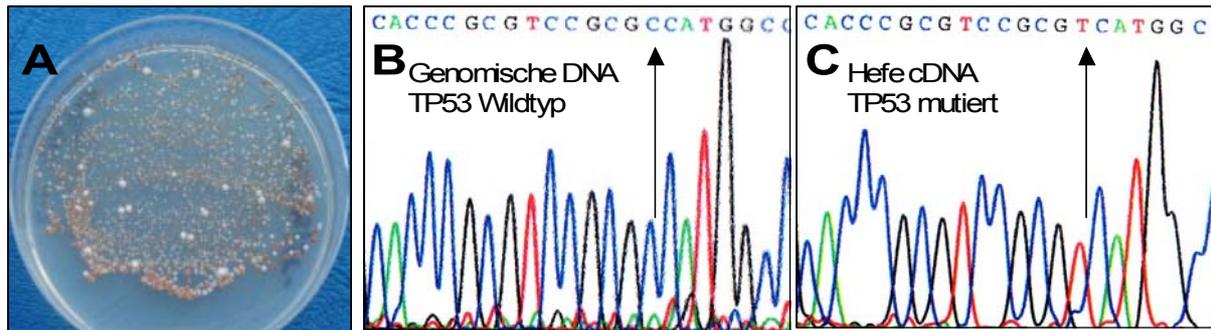


Abbildung 7: Mit mutiertem TP53 transformierte Hefezellen des Stamms yIG397 (A). Vergleich zwischen Sequenzanalyse genomischer DNA (B) und Sequenzanalyse von cDNA-Klonen nach FASAY-Analyse (C).

Insgesamt wurden 39 Fälle mittels FASAY untersucht, wobei 15 der 39 DLBCL eine positive immunhistochemische p53-Färbung zeigten. Eine Überexpression von p53-Protein war in 24 Fällen nicht nachweisbar (Tab. 2A). Mittels FASAY konnte in 16 von 39 Fällen (41%) eine TP53-Mutation nachgewiesen werden (Tab. 2A). Die Verifizierung einer TP53-Mutation erfolgte in 13/16 Fällen durch die cDNA-Extraktion aus mindestens zehn rotgefärbten Kolonien, die durch direkte Sequenzanalyse untersucht werden konnten (Tab. 1, Anhang). Zwölf der 16 TP53-mutierten Fälle zeigten eine aberrante Expression von p53-Protein (Tab. 2A). Im Gegensatz zur direkten Sequenzanalyse von genomischer DNA konnte mittels FASAY auch in 4 von 24 Fällen (16,7%) eine TP53-Mutation nachgewiesen werden, trotz fehlender Überexpression von p53-Protein (Tab. 2A).

A FASAY

	p53+	p53-	gesamt
TP53 WT	3	20	23
TP53 MUT	12	4	16 (41%)
gesamt	15	24	39

B DNA-Sequenzanalyse

	p53+	p53-	gesamt
TP53 WT	8	24	32
TP53 MUT	7	0	7 (18%)
gesamt	15	24	39

Tabelle 2: Direktvergleich der mittels FASAY (A) und direkter Sequenzanalyse genomischer DNA (B) untersuchten 39 DLBCL hinsichtlich TP53-Mutationsfrequenz (WT: Wildtyp; MUT: mutiert; p53+: Expression von p53-Protein in $\geq 20\%$ der Zellen; p53-: Expression von p53-Protein in $< 20\%$ der Zellen).

Mittels herkömmlicher Sequenzanalyse genomischer DNA konnte in den 39 DLBCL, die mit beiden Methoden untersucht wurden, in 7 von 15 p53-positiven Fällen (insg. 7/39; 18%) eine TP53-Mutation detektiert werden (Tab. 2B und Tab. 1, Anhang). Mittels FASAY zeigten 12 von 15 Fällen (insg. 16/39; 41%) eine Mutation des TP53-Gens bei gleichzeitiger Überexpression von p53-Protein (Tab. 2A und Tab. 1, Anhang). Die Detektionsfrequenz war mittels FASAY demnach um mehr als 50% erhöht.

4.1.4. Charakterisierung der TP53-Mutationen

Mutationen des TP53-Gens konnten also mittels Sequenzanalyse genomischer DNA und/oder FASAY in insgesamt 20 von 55 DLBCL detektiert werden. In 17/20 Fällen wurden 19 TP53-Mutationen in der Sequenzanalyse nachgewiesen, während drei Fälle lediglich mittels FASAY ohne anschließende cDNA-Sequenzanalyse untersucht wurden (Tab. 1, Anhang).

In 15/19 Fällen (79%) handelte es sich um Missense-Mutationen. Darüber hinaus konnte in 2/19 Fällen (10,5%) je eine Deletion von 21 bp und 1 bp im TP53-Gen gezeigt werden. In 2 weiteren Fällen (10,5%) wurden stille Mutationen beobachtet, die nicht zum Aminosäure-Austausch führten (Tab. 3).

Fall-Nr	TP53-Mutation (DNA)	TP53-Mutation (FASAY- cDNA)	Lokalisation	Codon-Austausch	Aminosäure-Austausch	TP53-Mutation
21	Nein	Ja	Cod 324 Ex9	GAT à TAT	Asp à Tyr	D324Y
22	Ja	Ja	Cod 232 Ex7	ATC à AGC	Ile à Ser	I232S
23	Ja	Ja	Cod 249 Ex7	AGG à ATG	Arg à Met	R249M
23	Ja	Ja	Cod 295 Ex8	CCT à CCC	Pro à Pro	
27	Ja		Cod 176 Ex5	TGC à TGG	Cys à Trp	C176W
43	Ja		Cod 266 Ex8	GGA à GAA	Gly à Glu	G266E
44	Ja	Ja	Cod 266 Ex8	GGA à GAA	Gly à Glu	G266E
45	Nein	Ja	Cod 125 Ex5	21bp deletion		
46	Ja	Ja	Cod 179 Ex5	CAT à CGT	His à Arg	H179R
47	Ja		Cod 248 Ex7	CGG à TGG	Arg à Trp	R248W
48	Nein	Ja	Cod 189 Ex6	1bp deletion		
49	Ja		Cod 173 Ex5	GTG à ATG	Val à Met	V173M
50	Ja	Ja	Cod 282 Ex8	CGG à TGG	Arg à Trp	R282W
51	Ja	Ja	Cod 205 Ex6	TAT à TGT	Tyr à Cys	Y205C
52	Nein	Ja	Cod 222 Ex6	CCG à CCA	Pro à Pro	
52	Nein	Ja	Cod 344 Ex10	CTG à CGG	Leu à Arg	L344R
53	Nein	Ja	Cod 159 Ex5	GCC à GTC	Ala à Val	A159V
54	Ja		Cod 181 Ex5	CGC à CAC	Arg à His	R181H
55	Nein	Ja	Cod 159 Ex5	GCC à GTC	Ala à Val	A159V

Tabelle 3: Übersicht über Mutationen von TP53 in den mittels direkter Sequenzanalyse und FASAY untersuchten DLBCL.

Die mit 89,5% (17/19) am häufigsten mutierte Region war die DNA-Bindungsdomäne (Exon 5 bis 8), während in nur 10,5% (2/19) DNA-Abschnitte außerhalb Exon 5 bis 8 von Mutationen betroffen waren (Tab. 3).

4.1.5. Heterozygoter TP53-Inaktivierungsstatus

Von 20 der 55 DLBCL mit einer Mutation des TP53-Gens, konnte eine gleichzeitige TP53-Deletion in 13/20 Fällen nachgewiesen werden, was eine biallelische Inaktivierung von TP53 (-/-) in diesen Fällen nahe legte (24%; 13/55) (Abb. 8). Sieben der 20 TP53-mutierten Fälle wiesen keine gleichzeitige Deletion des TP53-Gens auf. Darüberhinaus zeigten 15 DLBCL eine monoallelische TP53-Deletion ohne Mutation des verbleibenden Allels, was auf eine heterozygote TP53-Inaktivierung (+/-) in diesen 22/55 Fällen (40%) hindeutete (Abb. 8). In 20/55 DLBCL (36%) war weder eine Deletion von Chromosom 17p, noch eine TP53-Mutation nachweisbar (TP53+/+) (Abb.8).

Das Auftreten einer del(17p) war mit der Mutation des TP53-Gens, sowie mit der Überexpression des p53-Proteins assoziiert ($p=0.009$ und $p=0.010$, Fisher's Exakt Test).

Eine Alteration des TP53-Status war nicht auf GCB- oder ABC-DLBCL beschränkt ($p=1.000$, Fisher's Exakt Test), sondern lag in beiden Subtypen gleichermassen verteilt vor.

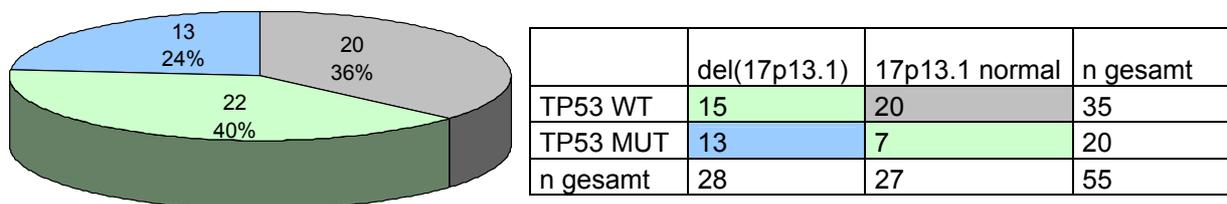


Abbildung 8: TP53-Inaktivierungsstatus in 55 analysierten DLBCL. Wildtyp (WT)-TP53 (TP53+/+) in 20/55 Fällen (36%) (grau). Monoallelische TP53-Inaktivierung (TP53+/-) in 22/55 Fällen (40%) (grün). In 15/22 DLBCL trat eine monoallelische Deletion, in 7/22 eine monoallelische Mutation auf. Eine homozygote Inaktivierung von TP53 lag (TP53-/-) in 13/55 Fällen vor (24%) (blau).

4.1.6. Korrelation von p53-Expression und Mutation des TP53-Gens

Eine Überexpression von p53-Protein wurde in 22/55 DLBCL (40%) nachgewiesen, während die übrigen 33 Fälle (60%) kein positives immunohistochemisches Färbemuster aufwiesen (Tab. 1, Anhang).

Von 22 DLBCL mit einer p53-Überexpression, konnte in 16 Fällen (73%) eine TP53-Mutation detektiert werden, während 6 der 22 Fälle (27%) trotz p53-Überexpression keine Mutation des TP53-Gens aufwiesen. Darüber hinaus wurde in 4/33 DLBCL (12%) ohne positive Färbung von p53-Protein eine TP53-Mutation nachgewiesen (Tab. 1, Anhang). Die aberrante Expression von p53-Protein war signifikant mit einer Mutation des TP53-Gens assoziiert ($p=0.0001$, Fisher's Exakt Test).

4.1.7. „Single Nucleotide Polymorphism 309“ (SNP309) des MDM2-Promoters

Eine mögliche Erklärung für das Auftreten einer TP53-Mutation ohne gleichzeitige Überexpression von p53-Protein in den oben genannten 4/33 DLBCL (12%), liefert möglicherweise der kürzlich entdeckte SNP309: Es konnte gezeigt werden, dass der Nucleotid-Austausch von T → G an Position 309 des MDM2-Promoters (SNP309) zu einer erhöhten Affinität des Transkriptionsfaktors SP1 zu MDM2 und somit zu einer verstärkten Expression sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene führt ¹⁰⁶. Eine erhöhte MDM2-Proteinexpression könnte die Degradierung von p53-Protein zur Folge haben.

In keinem der vier untersuchten DLBCL konnte mittels direkter Sequenzanalyse der MDM2-Promoterregion ein homozygoter SNP309 (G/G) nachgewiesen werden. Stattdessen zeigten drei Fälle das Auftreten eines heterozygoten SNP309 (T/G), während ein Fall die Wildtyp-Sequenz des MDM2-Promoters (T/T) aufwies.

Zur Untersuchung eines möglichen Effekts des heterozygoten SNP309 auf Proteinebene wurden immunhistochemische Färbungen von MDM2-Protein durchgeführt. In keinem der Fälle konnte eine im Vergleich zu normalem lymphoiden Gewebe erhöhte MDM2-Expression detektiert werden (Tab. 4). Während in Lymphknoten mit reaktiver Lymphadenitis durchschnittlich 12% der Keimzentrumszellen positiv gefärbt waren (vgl. Tab. 7), wurde eine positive Färbung von MDM2-Protein in den hier untersuchten vier DLBCL in 0,6 bis 5% der Zellen detektiert (Tab. 4).

Fall-Nr.	SNP309	MDM2 IHC [%]
24	T/G	-
25	T/G	0,6
53	T/G	<5
55	T/T	<1

Tabelle 4: Auftreten verschiedener SNP309-Genotypen im Vergleich zu immunhistochemischen Färbungen von MDM2-Protein in % der Zellen (MDM2 IHC %). Wildtypsequenz ohne Nucleotidaustausch an Position 309 (T/T); heterozygoter SNP309 mit einem T → G Austausch in nur einem Allel (T/G).

4.1.8. Funktionalität des Transkriptionsfaktors p53 in DLBCL mit monoallelisch inaktiviertem TP53 (+/-)

Da in insgesamt 22 DLBCL eine monoallelische TP53-Inaktivierung (+/-) vorlag, wurde die Expression der p53-Zielgene p21 und MDM2 untersucht, um Aussagen über die Funktionalität des verbliebenen Allels zu treffen. Vier typische p53-Expressionsmuster, die mit der Expression von p21 und MDM2 assoziiert sind wurden in der Literatur beschrieben ⁷² (Tab. 5).

p53-Expression	p21-Expression	MDM2-Expression	TP53- / p53- Status
p53-	p21-	MDM2-	TP53 Wildtyp
p53-	p21+	MDM2-	p53-unabhängige Induktion von p21
p53+	p21-	MDM2-	TP53 mutiert
p53+	p21+	MDM2+	TP53 Wildtyp

Tabelle 5: Übersicht über die verschiedenen p53-Phänotypen in Abhängigkeit von p21- und MDM2-Expression.

Insgesamt 5/7 DLBCL mit monoallelischer TP53-Mutation zeigten eine aberrante Expression des p53-Proteins (Fall-Nr. 21, 22, 23, 26 und 27) (Tab. 6), wohingegen in 2/7 Fällen (Fall-Nr. 24 und 25) (Tab. 6) keine erhöhte p53-Expression nachzuweisen war.

Während im Lymphknoten mit reaktiver Lymphadenitis durchschnittlich 12% der Keimzentrumzellen eine positive MDM2-Färbung zeigen (vgl. Abb.10A; Tab. 7), wurde ein positives Färbemuster von p21 in durchschnittlich 1-5% der Keimzentrumlymphozyten detektiert (Abb. 9A und B).

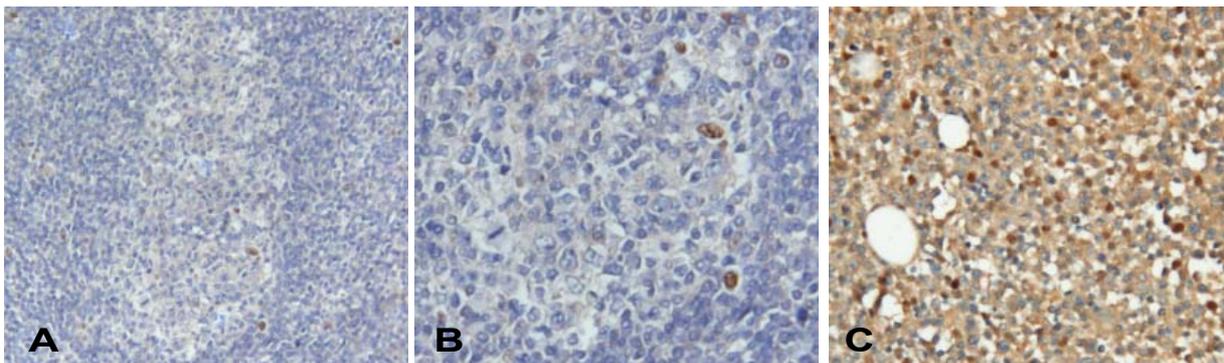


Abbildung 9: Immunhistochemische Färbung von p21 im Lymphknoten mit reaktiver Lymphadenitis. Im Original 100-fache Vergrößerung (A); im Original 400-fache Vergrößerung (B). Überexpression von p21-Protein u.a. in Fall-Nr. 31 (C) (im Original 200-fache Vergrößerung).

Eine niedrige Expression von p21- und MDM2-Protein, in Zusammenhang mit einer p53-Überexpression, konnte in 4/5 Fällen nachgewiesen werden (Fall-Nr. 21, 22, 23 und 27) (Tab. 6), was auf den Funktionsverlust von p53 hindeutet (vgl. Tab. 5). In einem von zwei DLBCL mit fehlender p53-Überexpression (Fall-Nr. 25) (Tab. 6) konnte weder eine positive Färbung von p21 noch von MDM2 nachgewiesen werden, was auf ein funktionales Wildtyp-Allel hinweist (vgl. Tab. 5). Ein Fall (Nr. 24) wurde nicht immunhistochemisch untersucht wurde (Tab. 6).

Somit konnte in 4/7 DLBCL mit monoallelischer TP53-Mutation ein möglicher Funktionalitätsverlust des zweiten Allels nachgewiesen werden, der möglicherweise mit einer dominant-negativen Mutation des TP53-Gens assoziiert ist (Tab. 6).

Von 15 DLBCL mit monoallelischer TP53-Deletion konnten 13 Fälle hinsichtlich einer Expression von p53, p21 und MDM2 untersucht werden (Tab. 6). Ein p53-/p21-/MDM2-Phänotyp, der auf ein verbliebenes Wildtyp-Allel hindeutete (vgl. Tab. 5), konnte in 7/13 DLBCL nachgewiesen werden (Fall-Nr. 28, 30, 34, 35, 36 und 37) (Tab. 6), während ein p53-/p21+/MDM2- Expressionsmuster, das eine p53-unabhängige Induktion von p21 nahe legte (vgl. Tab. 5), in 2/13 Fällen detektiert wurde (Fall-Nr. 31 und 33) (Abb. 9C und Tab. 6). Eine Überexpression von p53-Protein konnte in 4/13 DLBCL gezeigt werden, die alle durch einen p53+/p21-/MDM2- Phänotyp charakterisiert waren (Fall-Nr. 38, 39, 41 und 42) (Tab. 6), was auf eine TP53-Mutation hindeutete. Keiner dieser Fälle wies jedoch eine Mutation des TP53-Gens auf (Tab. 6).

Die Erhaltung der Funktionalität des verbliebenen Allels konnte somit in 9/13 DLBCL mit monoallelischer TP53-Deletion vermutet werden. In 4/13 Fällen deutete die erhöhte Expression von p53-Protein auf eine Stabilisierung des Proteins unabhängig von einer TP53-Mutation hin.

Fall-Nr.	TP53-Inaktivierung	p53 IHC [%]	p21 IHC [%]	MDM2 IHC [%]	Dominant-negative Mutation
24	TP53+/- mut	10	-	-	-
25	TP53+/- mut	10	0,6	0	nein
21	TP53+/- mut	20	3	2,5	ja
22	TP53+/- mut	75	0,5	0	ja
26	TP53+/- mut	80	-	-	-
23	TP53+/- mut	90	2	10	ja
27	TP53+/- mut	100	0	0	ja
28	TP53+/- del	0	15	<5	-
29	TP53+/- del	0	-	-	-
30	TP53+/- del	5	5	7,5	-
31	TP53+/- del	10	20	5	-
32	TP53+/- del	10	5	2,5	-
33	TP53+/- del	10	30	7,5	-
34	TP53+/- del	10	5	7,5	-
35	TP53+/- del	10	4	10	-
36	TP53+/- del	10	1,2	2,5	-
37	TP53+/- del	10	10	<5	-
38	TP53+/- del	20	5	12,5	-
39	TP53+/- del	20	30	10	-
40	TP53+/- del	30	-	-	-
41	TP53+/- del	30	6	15	-
42	TP53+/- del	30	2	15	-

Tabelle 6: Funktionsanalyse des verbliebenen TP53-Allels in DLBCL mit heterozygoter Inaktivierung des TP53-Gens (del: Deletion; mut: Mutation) mittels immunhistochemischer Untersuchung (IHC) des p53/p21/MDM2-Phänotyps.

4.1.9. Untersuchung von p53-Regulatoren auf Proteinebene

Da eine von Mutation oder Deletion unabhängige Inaktivierung durch posttranslationale Modifikationen des p53-Proteins nicht ausgeschlossen werden konnte, wurden verschiedene p53-Regulatoren mittels immunhistochemischer Färbungen untersucht.

Für die Fragestellung einer alternativen p53-Inaktivierung waren insbesondere die 22 DLBCL mit heterozygoter TP53-Inaktivierung von Bedeutung (vgl. Abb. 8). Paraffinmaterial für immunhistochemische Färbungen war in 17 dieser 22 TP53+/- Fälle vorhanden. Darüber hinaus wurden 9 Fälle aus der TP53+/+ und 9 DLBCL aus der TP53/- Gruppe untersucht.

Zur Analyse der p53-Regulatoren MDM2, YY1 und CHK2 wurden die Antikörper zunächst an fünf Lymphknoten mit reaktiver Lymphadenitis getestet (Abb. 10).

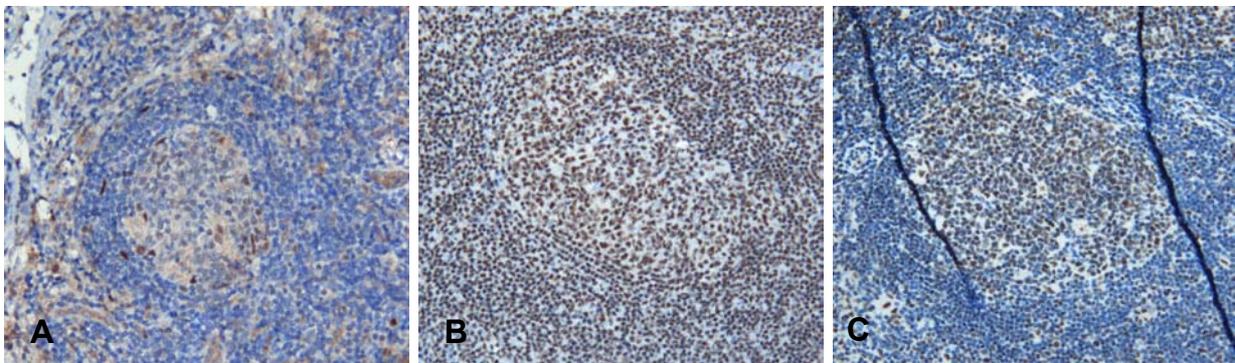


Abbildung 10: Immunhistochemische Färbungen von MDM2 (A), YY1 (B) und CHK2 (C) in Lymphknoten mit reaktiver Lymphadenitis (im Original 200-fache Vergrößerung). Alle Antikörper zeigen ein nukleäres Färbemuster.

Zum Vergleich der Proteinexpression von Normal- und Tumorgewebe, erfolgte die Ermittlung eines Cut off-Wertes für die Überexpression eines Negativregulators (MDM2, YY1), bzw. für die verminderte Expression eines Positivregulators (CHK2). Bei allen Antikörpern wurde eine nukleäre Färbung der Zellen beobachtet, die in Lymphozyten des Keimzentrums nachgewiesen werden konnte. Bei immunhistochemischen Färbungen mit MDM2 waren durchschnittlich 12% der Keimzentrumszellen deutlich nukleär gefärbt (Abb. 10A und Tab. 7).

	MDM2 [%]	YY1 [%]	CHK2 [%]
reaktiver Lymphknoten	12,0	91,0	87,0
Cut off	12,0 ± 2,58	91,0 ± 8,94	87,0 ± 4,08

Tabelle 7: Übersicht über die Proteinexpression ([%]: positiv-gefärbte Zellen in %) der untersuchten p53-Regulatoren MDM2, YY1 und CHK2 im reaktiven nicht-tumorösen Lymphknoten (oben). Aus dem Mittelwert ± dreifacher Standardabweichung wurde ein Cut off-Wert für die Überexpression bzw. für die reduzierte Expression ermittelt.

Auch die Färbungen von Kontrollgewebe mit YY1 wiesen eine homogene Expression des Proteins in den fünf Lymphknotenpräparaten auf: Durchschnittlich 91% der Keimzentrumzellen zeigten eine positive nukleäre Färbung (Abb. 10B und Tab. 7). Bei immunhistochemischen Färbungen mit CHK2 konnte in durchschnittlich 87% der Keimzentrumzellen ein positives Färbemuster detektiert werden (Abb. 10C und Tab. 7).

Während in den normalen Lymphknotenpräparaten durchschnittlich 12% der Keimzentrumzellen eine positive nukleäre MDM2-Färbung zeigten, konnte in den DLBCL mit unterschiedlichem TP53-Status eine verminderte Expression von MDM2 nachgewiesen werden (Abb. 11 und 14) (TP53+/+: 5.3%; TP53+/-: 6.9%; TP53-/-: 5.9%; Tab. 8), die sich signifikant von der MDM2-Expression im Normalgewebe unterschied (p=0.001, p=0.040, p=0.005; t-Test; Tab. 8). Innerhalb der einzelnen TP53-Inaktivierungsgruppen (TP53+/+, TP53+/- und TP53-/-) konnten keine signifikanten Veränderungen in der Expression von MDM2 nachgewiesen werden (p=0.658; ANOVA; Tab. 8). Es konnte kein Unterschied der MDM2-Expression zwischen ABC- und GCB-DLBCL gezeigt werden (p=0.147; ANOVA, Tab. 8).

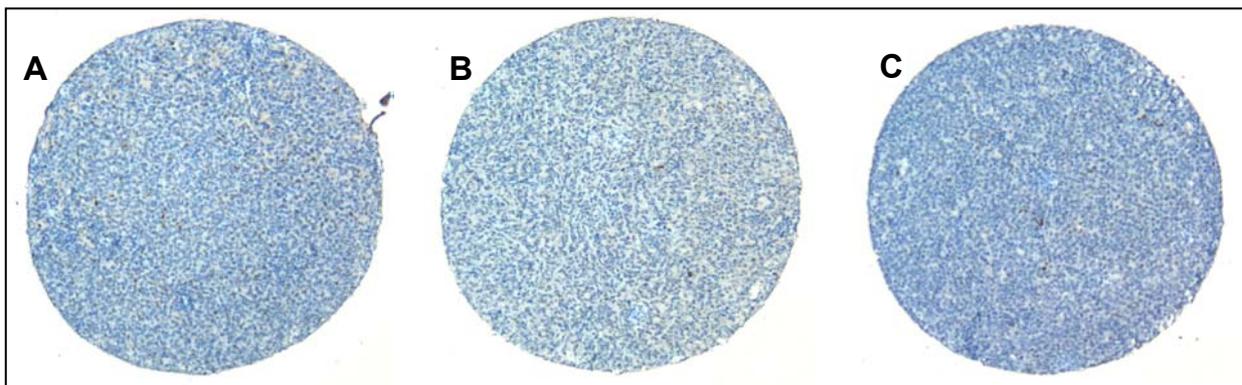


Abbildung 11: Repräsentative immunhistochemische MDM2-Färbung an Fall-Nr. 30 (A), Fall-Nr. 14 (B) und Fall-Nr. 20 (C), die als Gewebestanden auf einem Gewebe-Mikroarray vorlagen (im Original 100-fache Vergrößerung).

Eine positive nukleäre YY1-Expression wurde durchschnittlich in 91% der Keimzentrumzellen von Lymphknoten mit reaktiver Lymphadenitis gesehen, die sich nicht signifikant von der Expression im Tumormaterial unterschied (Abb. 12 und 14) (p=0.576, p=0.902, p=0.252; t-Test; Tab. 8).

Auch innerhalb der TP53-Gruppen war die Expression von YY1-Protein mit 83,8 bis 91,2% der Keimzentrumzellen annähernd konstant (p=0.115; ANOVA; Tab. 8). Ein Unterschied der YY1-Expression war in ABC- und GCB-DLBCL nicht vorhanden (p=0.662; ANOVA; Tab. 8).

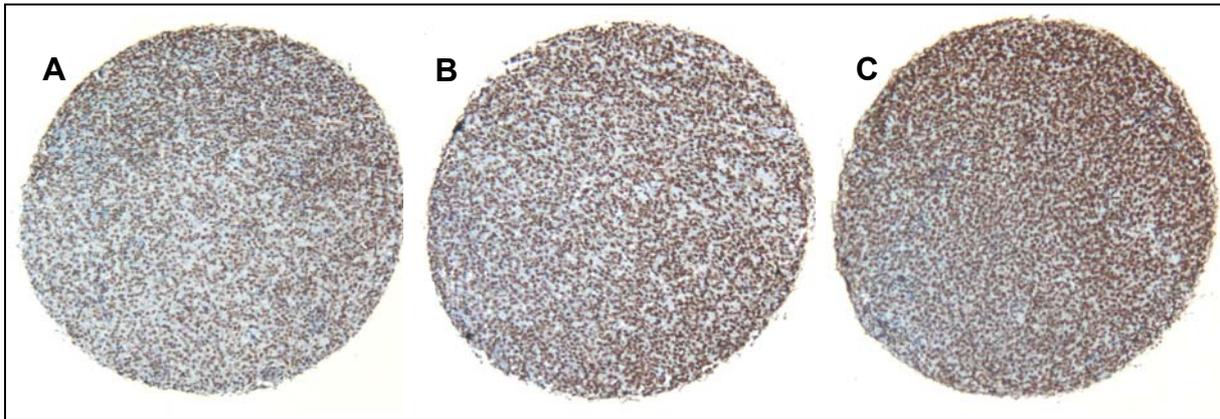


Abbildung 12: Repräsentative immunhistochemische YY1-Färbung an Fall-Nr. 30 (A), Fall-Nr. 14 (B) und Fall-Nr. 20 (C) (im Original 100-fache Vergrößerung).

Eine im Vergleich zum Normalgewebe reduzierte Protein-Expression wurde beim TP53-Positivregulator CHK2 verzeichnet. Während in Lymphknoten mit reaktiver Lymphadenitis durchschnittlich 87% der Keimzentrumslymphozyten eine positive CHK2-Färbung zeigten, war die Expression in allen DLBCL mit unterschiedlichem TP53-Status mit 66.1% in TP53+/+ DLBCL, mit 62.6% in TP53+/- DLBCL und mit 71,7% in TP53-/- DLBCL signifikant verringert (Abb. 13 und 14) ($p=0.018$, $p=0.004$ und $p=0.032$; t-Test; Tab. 8).

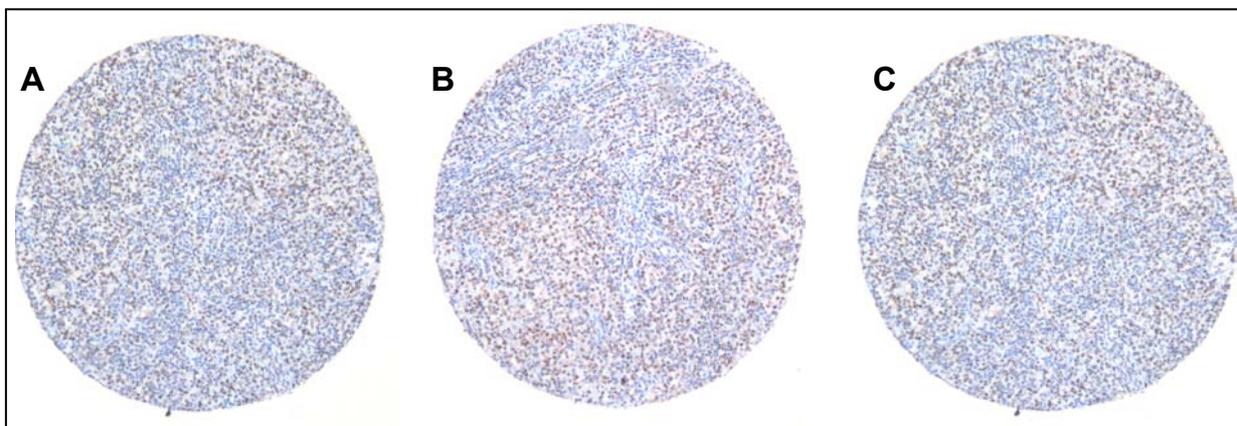


Abbildung 13: Repräsentative immunhistochemische CHK2-Färbungen von DLBCL-Gewebestücken in 100-facher Vergrößerung (im Original): Fall-Nr. 30 (A), Fall-Nr. 14 (B) und Fall-Nr. 20 (C).

Ein signifikanter Unterschied der Proteinkonzentration zwischen den unterschiedlichen TP53-Gruppen konnte nicht nachgewiesen werden ($p=0.324$; ANOVA; Tab. 8). Auch in ABC- und GCB-DLBCL wurde kein signifikanter Unterschied der CHK2-Proteinexpression nachgewiesen ($p=0.708$; ANOVA; Tab. 8).

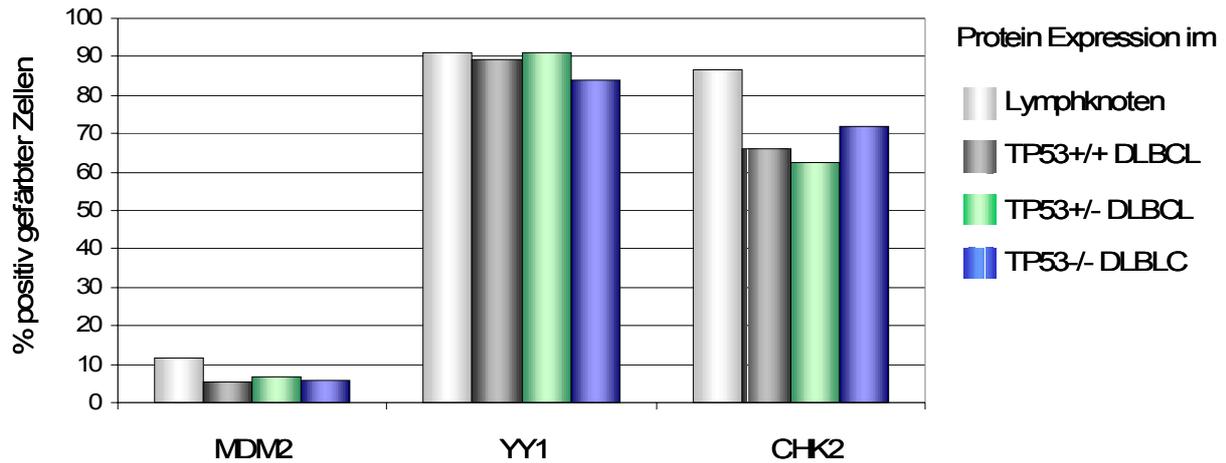


Abbildung 14: Übersicht über die mittels Immunhistochemie getesteten TP53-Regulatoren MDM2, YY1 und CHK2 im Vergleich zum Normalgewebe (hellgrau) (Lymphknoten mit reaktiver Lymphadenitis: LK) und zwischen den unterschiedlichen TP53-Gruppen TP53+/+ (dunkelgrau), TP53+/- (grün) und TP53-/- (blau).

Antikörper	Expression in % Zellen				Expression LK versus Tumor (t-Test)			ANOVA	ANOVA
	LK	TP53+/+	TP53+/-	TP53-/-	TP53+/+	TP53+/-	TP53-/-	TP53-Status	ABC : GCB
MDM2	11.7	5.3	6.9	5.9	0.001*	0.040*	0.005*	0.658	0.147
YY1	91.0	89.4	91.2	83.8	0.576	0.902	0.252	0.115	0.662
CHK2	86.7	66.1	62.6	71.7	0.018*	0.004*	0.032*	0.324	0.708

Tabelle 8: Der Expressionsunterschied zwischen Normal- und Tumorgewebe wurde mittels t-Test für jede TP53-Gruppe durchgeführt (Lymphknoten „LK“ zu TP53+/+, TP53+/- oder TP53-/-). Der Vergleich der Expression zwischen den einzelnen TP53-Gruppen erfolgte mittels ANOVA. Signifikante Werte sind mit * gekennzeichnet.

4.2. FISH-Analyse von Chromosom 17p in diffusen großzelligen B-Zell Lymphomen

Neben Alternativmechanismen zur posttranslationalen Inaktivierung von p53-Protein wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob weitere Tumorsuppressor-Kandidaten von einer del(17p) betroffen waren. Insbesondere das Auftreten von zytogenetischen 17p-Deletionen ohne den gleichzeitigen Verlust des TP53-Lokus in sechs DLBCL deuteten auf das Vorhandensein einer TP53-unabhängigen Deletion in Chromosom 17p hin.

Analog Abbildung 15 erfolgte die Untersuchung von 18/20 DLBCL mit Wildtyp TP53-Status (+/+), sowie von 5/7 Fällen mit monoallelischer TP53-Mutation (+/-), um eine mögliche minimal deletierte Region, unabhängig von einer TP53-Deletion, zu detektieren. Während 16/18 DLBCL mit Wildtyp-TP53 (+/+) keine zytogenetischen Aberrationen von Chromosom 17p aufwiesen, konnte in 2/18 TP53-Wildtyp Fällen eine zytogenetische del(17p), ohne gleichzeitige Deletion des TP53-Lokus nachgewiesen werden.

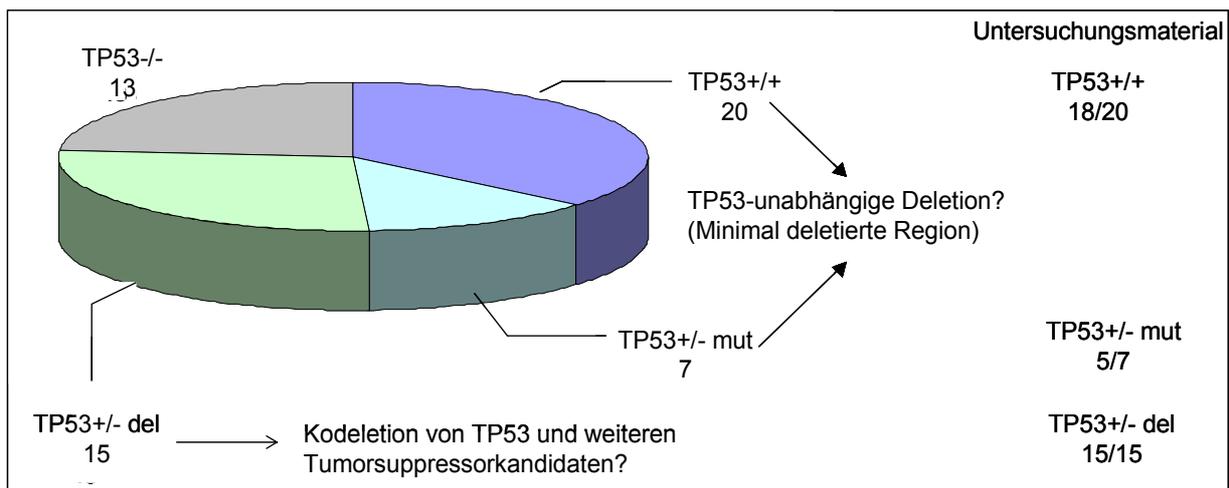


Abbildung 15: Fallauswahl zur detaillierten Untersuchung von Chromosom 17p in DLBCL mit monoallelischer TP53-Inaktivierung (del: Deletion, mut: Mutation).

Von fünf DLBCL mit monoallelischer TP53-Mutation (+/-), konnte eine zytogenetische del(17p) ohne Verlust des TP53-Gens in drei Fällen gezeigt werden.

Das Auftreten einer möglichen Kodeletion von TP53 und weiteren Tumorsuppressor-Kandidaten in Chromosom 17p wurde in 15 DLBCL mit monoallelischer TP53-Deletion untersucht (Abb. 15).

Fluoreszenz in situ Hybridisierungen von Chromosom 17p13.1 (TP53) bis 17p13.3 (Telomer) mit lokusspezifischen „Bacterial Artificial Chromosome“ (BAC) und „Phage 1 Artificial Chromosome“ (PAC) Sonden, sollten Aufschluss über den möglichen Verlust eines weiteren TSG in dieser Region geben.

Die zu untersuchende Region wies eine Größe von 8 MB auf, die zunächst durch acht sich nicht-überlappende BAC-/PAC-Klone analysiert werden sollte, die im Abstand von 0.5 bis 1.5 MB auf die Gesamtlänge verteilt lagen (Abb. 16).

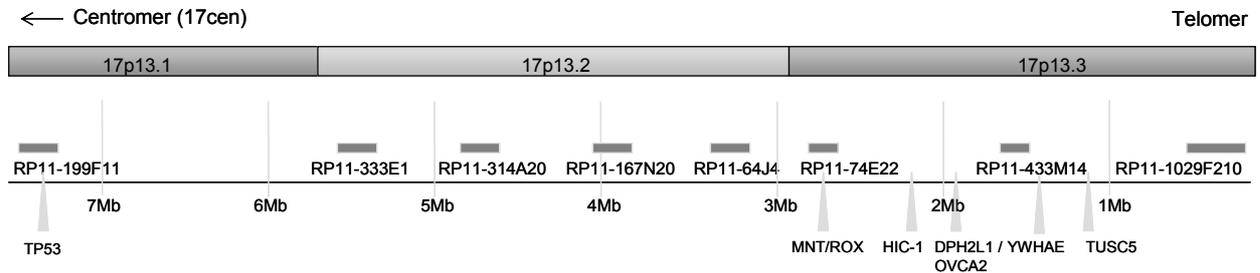


Abbildung 16: Übersicht über die Verteilung für Chromosom 17p spezifischer BAC-/PAC-Klone, die für die Hybridisierung verwendet wurden. Dargestellt sind auch potentielle TSG, die in dieser Region lokalisiert sind.

4.2.1. Verifizierung und Spezifität der BAC- und PAC-Klone

Alle verwendeten BAC-/PAC-Klone wurden zunächst mittels sogenannter „Sequence Tagged Sites“ (STS), also kurzen klonspezifischen Sequenzen, validiert. Hierzu wurden spezifische STS-Primer mit genomischer BAC-/PAC-DNA versetzt und in einer PCR amplifiziert (STS-PCR).

Mit einem HindIII-Restriktionsverdau konnte für jeden Klon ein spezifisches Restriktionsmuster erstellt werden.

Um zu untersuchen ob die aus den BAC-/PAC-Klonen hergestellten Sonden spezifisch an Chromosom 17p hybridisieren, wurden Testhybridisierungen an Metaphasen-Präparationen durchgeführt. Mittels Dual-Color-FISH konnten mit Digoxigenin oder Biotin indirekt markierte Sonden getestet werden, die mit entsprechenden, an Antikörper gekoppelten, Fluoreszenzfarbstoffen amplifiziert wurden (Abb. 17).

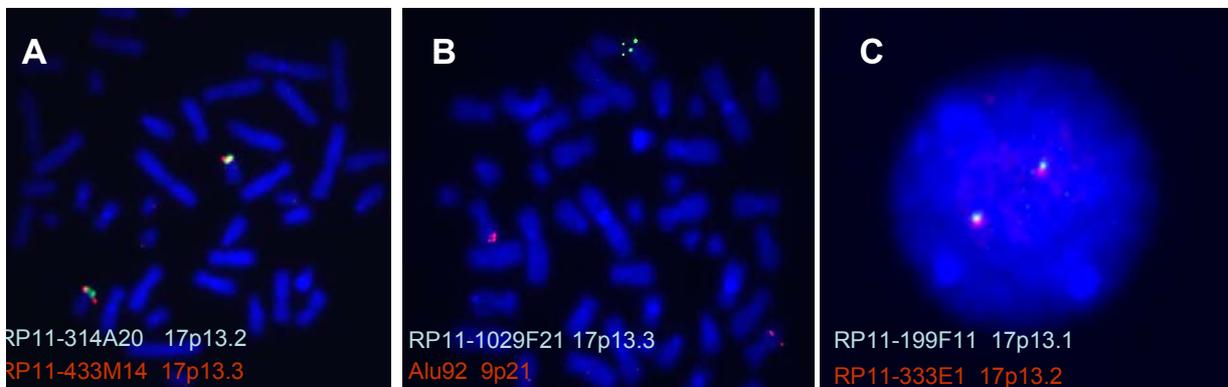
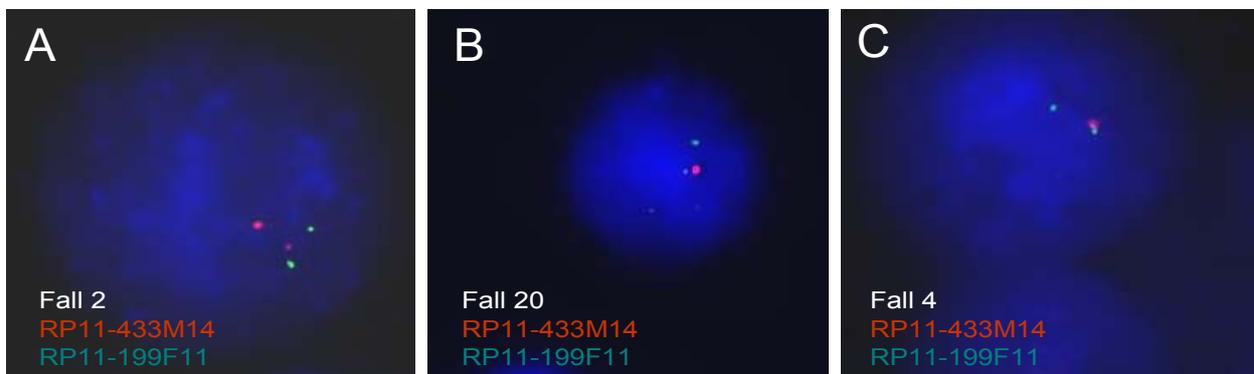


Abbildung 17: Test der mit Digoxigenin- (grün) bzw. Biotin- (rot) markierten Sonden mittels Dual-Color-FISH an Metaphasen-Präparaten (A, B) sowie an Interphasen-Kernen von Normalgewebe (C).

4.2.2. Deletionsstatus von Chromosom 17p in DLBCL ohne TP53-Deletion

a) Analyse von DLBCL mit Wildtyp-TP53 (+/+)

Normale Signalverteilungen konnten in 9 von 18 TP53+/+ Fälle detektiert werden (Abb. 18A), wohingegen in weiteren neun Fällen einzelne Klone monoallelische Deletionen zeigten, die alle telomerwärts zu TP53 (RP11-199F11), in der Übergangsregion von 17p13.2 und 17p13.3 lokalisiert waren (Abb. 18B,C und Tab. 1, Anhang). Während lediglich in je einem Fall eine Deletion von Klon RP11-74E22, RP11-64J4 oder RP11-1029F21, nachzuweisen war, konnte in 8 von 18 DLBCL die Deletion eines Allels des Klons RP11-433M14 in 17p13.3 detektiert werden (Abb. 18 und Tab. 1, Anhang).



TP53-Status	TP53+/+								
Fall-Nr.	20	19	4	8	7	5	11	17	14
RP11-1029F21									
RP11-433M14									
RP11-74E22									
RP11-64J4									
RP11-167N20									
RP11-314A20									
RP11-333E1									
RP11-199F11									

Abbildung 18: Dual-Color-FISH mit den BAC-Klonen RP11-199F11 für TP53 (grün) und RP11-433M14 (rot) in den untersuchten DLBCL. Weder eine Deletion von TP53 noch von RP11-433M14 konnte u.a. in Fall 2 nachgewiesen werden (A). Eine monoallelische Deletion von RP11-433M14 mit normalem TP53-Status wiesen u.a. Fall 20 (B) und Fall 4 (C) auf. Insgesamt wurde ein Verlust von RP11-433M14 (grau) in acht TP53+/+ DLBCL nachgewiesen (unten) (weiß: normale Signalverteilung).

Von der RP11-433M14-Deletion waren jeweils 13-27% der Zellen betroffen, während eine Deletion von RP11-64J4 in 20% und eine Deletion von RP11-74E22 in 30% der Zellen vorlag. Der ermittelte Cut off-Wert für eine Deletion lag für RP11-433M14 bei 10.77%, für RP11-64J4 bei 12.57% und für RP11-74E22 bei 8.08% (Tab. 4, Anhang).

b) Analyse von DLBCL mit monoallelischer TP53-Mutation (+/- mut)

In drei der fünf durch monoallelische TP53-Mutationen gekennzeichneten Fälle konnte der Verlust eines Allels von RP11-433M14 in 20-23% der Zellen nachgewiesen werden (Fall-Nr. 25, 27 und 24; Abb. 12). Zwei DLBCL zeigten eine normale Signalverteilung (Fall-Nr. 22 und 21; Abb. 19; Tab. 1, Anhang).

TP53 Status	TP53+/-	TP53+/-	TP53+/-	TP53+/-	TP53+/-
	mut	mut	mut	mut	mut
Fall-Nr.	25	27	24	22	21
RP11-1029F21					
RP11-433M14					
RP11-74E22					
RP11-64J4					
RP11-167N20					
RP11-314A20					
RP11-333E1					
RP11-199F11					



Abbildung 19: Übersicht über die Deletion der untersuchten Klone in fünf TP53+/- DLBCL mit durch Mutation (mut) monoallelisch inaktiviertem TP53 (weiß: keine Deletion; grau: Deletion) (links). Dual-Color-FISH mit den BAC-Klonen RP11-199F11 (TP53) (grün) und RP11-433M14 (rot) ermöglichte den Nachweis einer TP53-unabhängigen Deletion von RP11-433M14 u.a. in Fall Nr. 27 (rechts).

Anhand dieser Analysen konnte auf eine mögliche „Hot-Spot“-Deletionsregion in 23 nicht TP53-deletierten DLBCL rückgeschlossen werden, die in 11 von 23 Fällen (47,8%) die monoallelische Deletion von RP11-433M14 einschloss.

4.2.3. Selektion von BAC-/PAC-Klonen für die chromosomalen Regionen 17p13.2 und 17p13.3

Ausgehend von diesen Ergebnissen konnten nun einzelne Regionen in Chromosom 17p detaillierter untersucht werden. Die mit 47,8% der untersuchten Fälle (11/23) relativ häufige monoallelische Deletion von RP11-433M14 in DLBCL ohne TP53-Deletion, aber auch der Verlust der Klone RP11-64J4 und RP11-74E22 in einzelnen TP53+/+ Fällen gaben Anlass, insbesondere die chromosomalen Banden 17p13.2 und 17p13.3 ausführlicher zu analysieren.

Zunächst wurden BAC-/PAC-Klone ausgewählt, die jeweils die benachbarten Regionen von RP11-433M14 (17p13.3), RP11-74E22 (17p13.3) und RP11-64J4 (17p13.2), lückenlos abdeckten, wobei die Enden eines Klons mit den Anfangssequenzen des benachbarten Klons überlappten, sodass eine sogenannte „Contig-Region“ (engl: contiguous = zusammenhängend) entstand, wie in Abbildung 20 dargestellt ist.

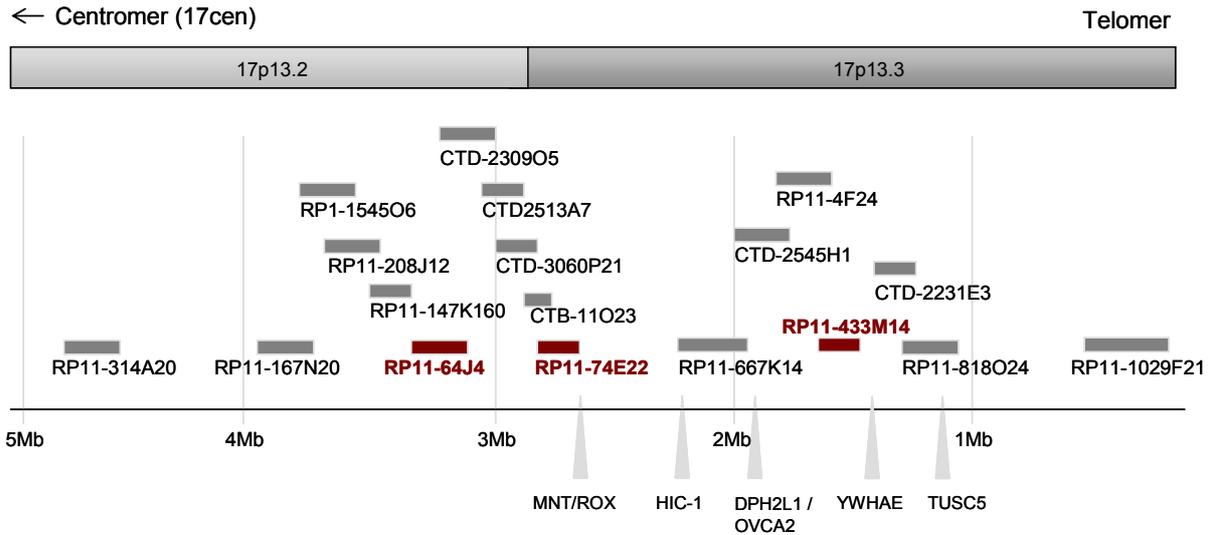


Abbildung 20: Übersicht über die Contig-Region aus sich überlappenden BAC-/PAC-Klonen im Bereich von ca. 1 MB bis 4 MB in den Chromosomenbanden 17p13.2 und 17p13.3, die ausgehend von der Deletionsfrequenz von RP11-64J4, RP11-74E22 und RP11-433M14 (rot markiert) erstellt wurde.

Die Contig-Region aus fünf BAC-Klonen um RP11-433M14 umfasste ca. 1 MB, während insgesamt 10 sich überlappende Klone den ca. 1.5 MB großen Bereich zwischen RP11-74E22 und RP11-167N20 (mit dem dazwischen liegenden RP11-64J4) abdeckten (Abb. 20).

4.2.4. Minimal deletierte Region (MDR) in DLBCL ohne TP53-Deletion

Von acht DLBCL mit TP53+/+ Status und Deletion von RP11-433M14 (Fall-Nr. 4, 5, 7, 8, 11, 17, 19 und 20; vgl. Abb. 18) lag von den Fällen Nr. 7 und 19 kein Untersuchungsmaterial mehr vor. Zusammen mit den drei durch TP53-Mutation und RP11-433M14-Deletion charakterisierten TP53+/- DLBCL (Fall-Nr. 24, 25 und 27; vgl. Abb. 19) wurden somit neun DLBCL ohne TP53-Deletion mit dem BAC-/PAC-Contig hybridisiert.

Zusätzlich zum Verlust von RP11-433M14 konnte die monoallelische Deletion des BAC-Klons RP11-667K14 in 9/9 analysierten Fällen nachgewiesen werden (Abb. 21 und 22).

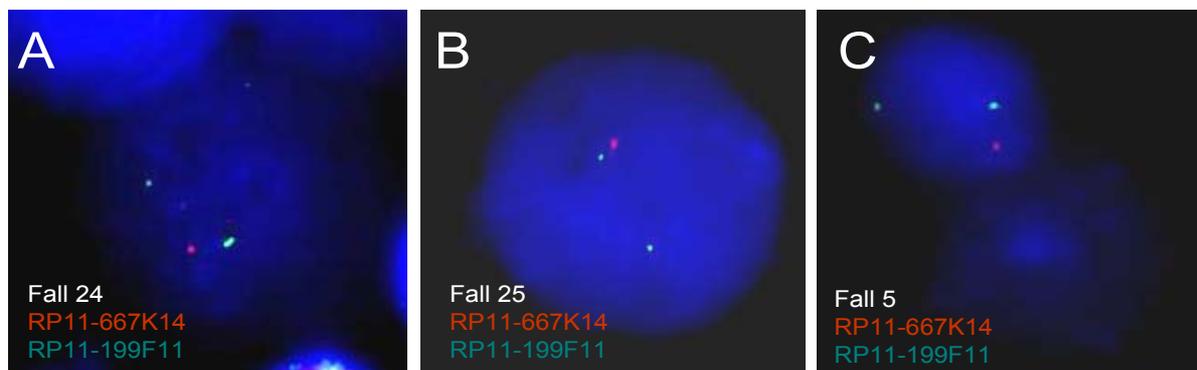


Abbildung 21: TP53 (RP11-199F11)-unabhängige monoallelische Deletion von RP11-667K14 (rot) u. a. in den Fällen Nr. 24 (A), 25 (B), und 5 (C).

Für RP11-667K14 wurde ein Cut off-Wert von 11.77% ermittelt (Tab. 4, Anhang). Ein Verlust des BAC-Klons konnte in 23% bis 31% der Zellen nachgewiesen werden.

Ein monoallelischer Verlust des an RP11-667K14 angrenzenden Klons CTD-2545H1 zeigte sich in acht der neun Fälle in jeweils 19-29% der Zellen (Abb. 22). Der Cut off-Wert für eine Deletion lag bei 11.77% (Tab. 4, Anhang).

Der telomerwärts zu CTD-2545H1 gelegene Klon RP11-4F24 zeigte in 7/9 DLBCL die Deletion eines Allels. In allen sieben Fällen waren jeweils zwischen 24% und 35% der Zellen vom Verlust des Klons betroffen (Cut off-Wert: 13.11%; Tab. 4, Anhang) (Abb. 22).

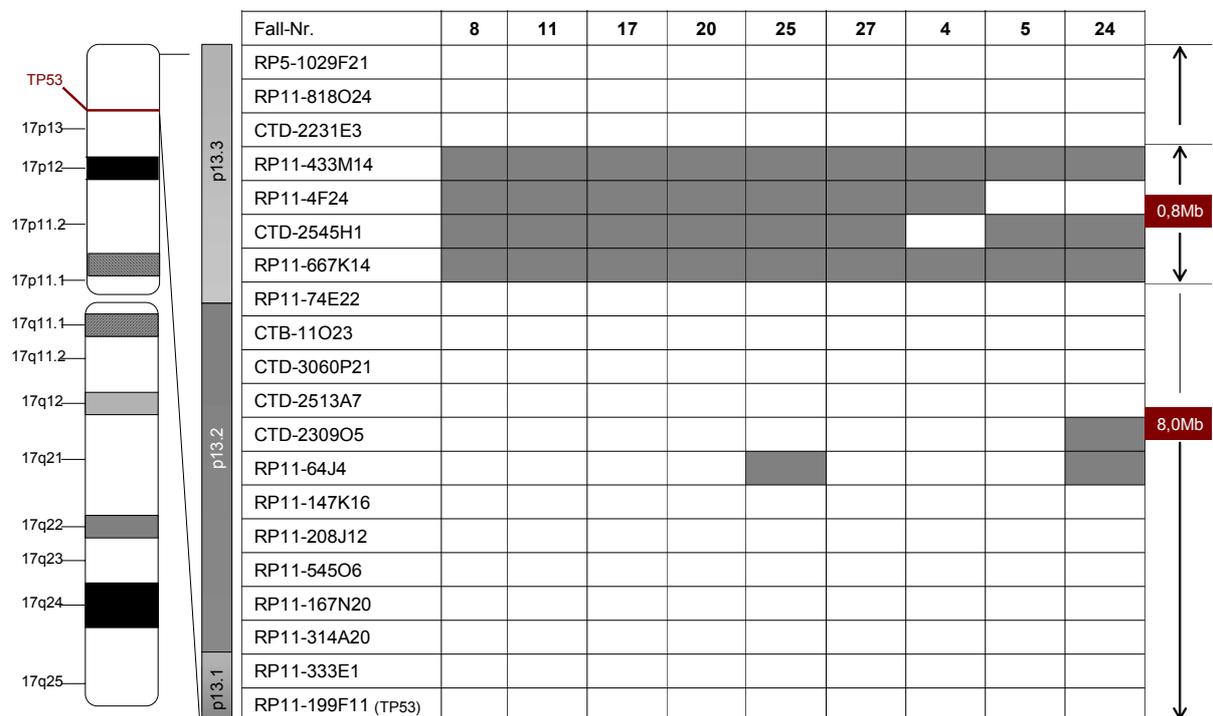


Abbildung 22: Übersicht über den Deletionsstatus der untersuchten Klone für die Chromosomenbanden 17p13.2 und 17p13.3 in den nicht TP53-deletierten DLBCL (grau: deletiert; weiß: normale Signalverteilung). Die Deletionen waren fast ausschließlich auf die Bande 17p13.3 beschränkt. In 6/9 untersuchten DLBCL konnte eine minimal deletierte Region von 0.8 MB nachgewiesen werden. Der monoallelische Verlust von RP11-667K14 konnte in allen neun Fällen gezeigt werden.

Mit diesen Ergebnissen war es möglich, den Deletionsbereich weiter einzugrenzen. Der Großteil der Deletionen betraf die Bande 17p13.3 mit den lokusspezifischen Klonen RP11-667K14, CTD-2545H1, RP11-4F24 und RP11-433M14 (Abb. 22).

Zu den in der ersten Hybridisierung auffälligen Deletionen von RP11-74E22 und RP11-64J4 (vgl. Abb. 18), wurde im chromosomalen Bereich 17p13.2 die monoallelische Deletion von CTD-2309O5 verzeichnet, die in einem Fall auftrat (Nr. 24) und in 18% der Zellen nachweisbar war (Abb. 22).

Aus Abbildung 22 wird ersichtlich, dass ein minimal deletierter Bereich von etwa 0.8 MB charakterisiert werden konnte, der die Region zwischen den BAC-Klonen RP11-667K14 und RP11-433M14 umfasste. Innerhalb dieser Deletionsregion befinden sich drei Gene, deren tumorsuppressive Rolle bereits beschrieben worden war: HIC1, OVCA1 und OVCA2 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>).

Während RP11-667K14 sowohl HIC1 („Hypermethylated in cancer 1“), als auch den Lokus von OVCA1 und OVCA2 („Ovarian cancer-associated gene 1 / 2“) abdeckte, überspannte der weiter telomerwärts gelegene Klon CTD-2545H1 lediglich Exon 1 von OVCA1. Weder von der Deletion des Klons RP11-4F24, noch vom Verlust von RP11-433M14 waren bislang beschriebene Tumorsuppressor-Kandidaten betroffen.

4.2.5. Deletionsstatus von Chromosom 17p in DLBCL mit TP53-Deletion

Die Untersuchung von 15 DLBCL mit TP53+/- Status, die durch eine monoallelische TP53-Deletion charakterisiert waren, sollte Aufschluss über den Deletionsstatus von RP11-667K14, bei gleichzeitigem Verlust von TP53, geben.

Wie bereits mittels zytogenetischer Analysen ermittelt werden konnte, war in den Fällen mit monoallelischer TP53-Deletion meist der gesamte kurze Arm von Chromosom 17p betroffen. Mittels FISH-Analyse konnte der vollständige 17p-Verlust in 6/15 DLBCL bestätigt werden. In 4/15 Fällen war der telomergelegene Klon RP11-1029F21 von der Deletion nicht betroffen, während 5/15 DLBCL Deletionen aufwiesen, die sowohl RP11-1029F21 und RP11-433M14 ausschlossen (Abb. 23).

TP53 Status	TP53+/-	TP53+/-	TP53+/-	TP53+/-	TP53+/-
	del	del	del	del	del
Fall-Nr.	32	35	38	37	30
RP11-1029F21					
RP11-433M14					
RP11-667K14					
RP11-74E22					
RP11-64J4					
RP11-167N20					
RP11-314A20					
RP11-333E1					
RP11-199F11					

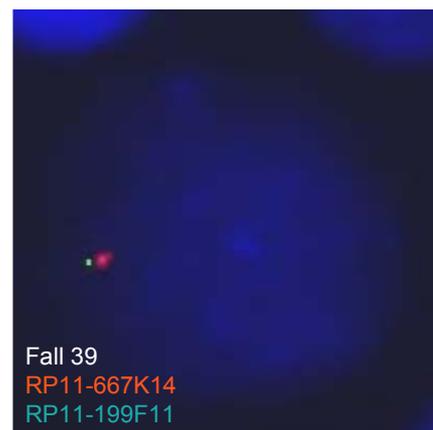


Abbildung 23: Kodelation von TP53 (RP11-199F11) und RP11-667K14 u.a. in Fall-Nr. 39 (links) und in fünf DLBCL ohne monoalleischen Verlust von RP11-433M14 (rechts) (grau: Deletion; weiß: normale Signalverteilung).

Obwohl bei 5/15 DLBCL kein Verlust des BAC-Klons RP11-433M14 nachgewiesen werden konnte (Abb. 23 und Tab. 1, Anhang), wurde in allen 15 Fällen, zusätzlich zur TP53-Deletion,

ein monoallelischer Verlust von RP11-667K14 detektiert (Abb. 23 und Tab. 1, Anhang). In allen Fällen waren zwischen 21% und 39% der Zellen von der monoallelischen RP11-667K14-Deletion betroffen.

Zusammenfassend wurden insgesamt 38 DLBCL hinsichtlich des 17p-Deletionsstatus untersucht (vgl. Abb. 15). In 24 der 38 untersuchten TP53+/+ und TP53+/- DLBCL (63,2%) wurde eine monoallelische Deletion von RP11-667K14 in der Bande 17p13.3 nachgewiesen. Dabei konnten zwei Gruppen unterschieden werden, die entweder eine minimal deletierte Region ohne TP53-Deletion zeigten (9/38, 23,7%; Abb. 24), oder durch den Verlust des nahezu vollständigen Chromosoms 17p gekennzeichnet waren, bei dem in jedem Fall, zusätzlich zur TP53-Deletion, die Deletion von RP11-667K14 involviert war (15/38, 39,5%; Abb. 24).

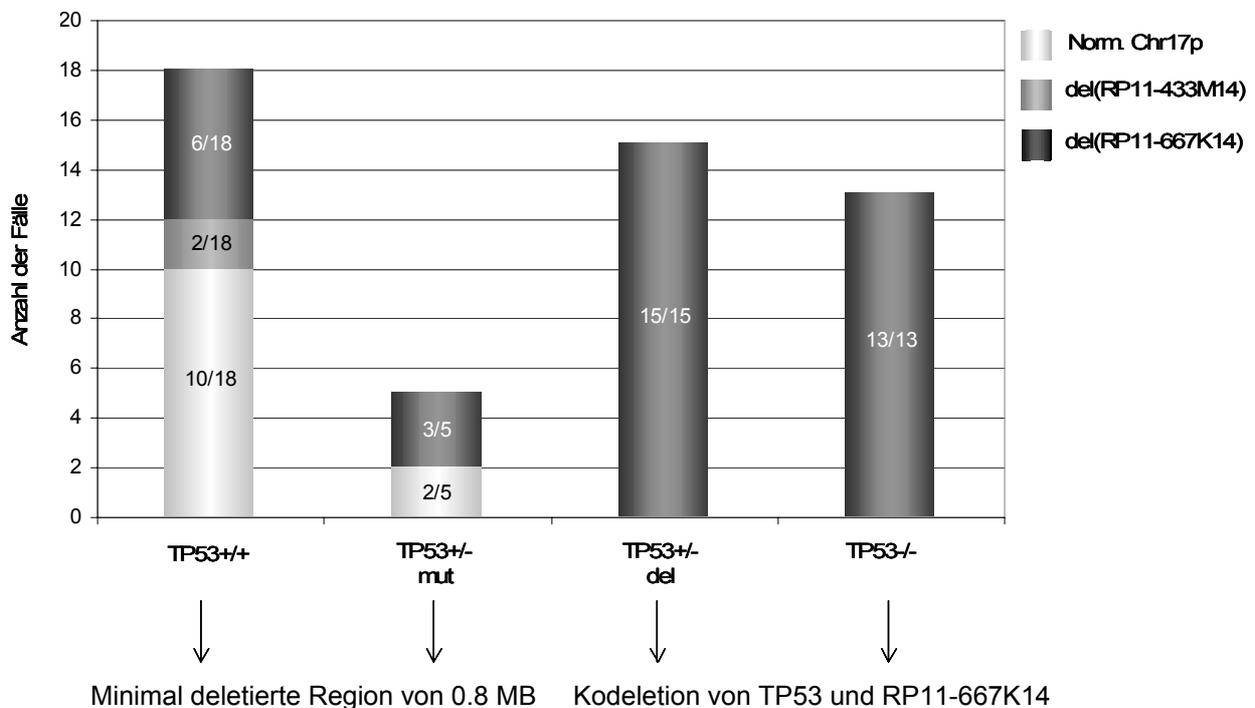


Abbildung 24: Minimal deletierte Region in TP53+/+ und TP53+/- DLBCL bei der in allen Fällen der BAC-Klon RP11-667K14 betroffen war. In allen TP53+/- Fällen mit TP53-Deletion konnte ebenfalls der Verlust von RP11-667K14 nachgewiesen werden.

Eine Deletion von RP11-667K14 in Chromosom 17p13.3 ohne den Verlust des TP53-Lokus war in 6/18 untersuchten TP53+/+ DLBCL, sowie in 3/5 analysierten Fällen mit monoallelischer TP53-Mutation (+/-) zu finden (Abb. 24). In allen fünf untersuchten DLBCL mit einer zytogenetischen del(17p) ohne gleichzeitige Deletion des TP53-Lokus konnte die minimal deletierte Region nachgewiesen werden (Tab. 1, Anhang)

Eine Kodeletion von TP53 und RP11-667K14 wurde in 15/15 DLBCL mit monoallelischer TP53-Deletion (+/-) detektiert (Abb. 24 und Tab. 1, Anhang).

Die Deletion von RP11-667K14 wurde auch in 13/13 DLBCL mit biallelischer TP53-Inaktivierung (TP53-/-) nachgewiesen (Abb. 24 und Tab. 1, Anhang).

Eine del(17p) war signifikant mit der Deletion von RP11-667K14 assoziiert ($p=0.0001$, Fisher's Exakt Test). Der Verlust von RP11-667K14 konnte sowohl in ABC- als auch in GCB-DLBCL nachgewiesen werden ($p=1.000$, Fisher's Exakt Test).

4.3. Detaillierte Analyse von HIC1 in diffusen großzelligen B-Zell Lymphomen

Eine Inaktivierung von HIC1 wurde in der Literatur für Leukämien und maligne Lymphome bereits beschrieben^{115,116}. Daher sollte zunächst dieses Gen ausführlicher analysiert werden.

4.3.1. Validierung der HIC1-Deletion mittels quantitativer Real-time PCR (Q-PCR)

Zur Detektion genomischer Deletionen von HIC1 wurden die neun Fälle mit minimal deletierter Region auf Chromosom 17p13.3, ohne gleichzeitige TP53-Deletion, sowie die beiden TP53+/+ Fälle mit RP11-433M14-Verlust (Nr. 7 und 19) mittels Q-PCR analysiert (vgl. Abb. 24 und Tab. 1, Anhang).

Der für HIC1 ermittelte Cut off-Wert für genomische Deletionen, in Bezug auf das Referenzgen B2M lag bei 0.67 (HIC1/B2M), bezüglich des zweiten Referenzgens HBB wurde ein Cut off-Wert von 0.65 ermittelt (HIC1/HBB).

Es erfolgte eine parallele Untersuchung von TP53, dessen Cut off-Wert für Deletionen in Bezug auf B2M bei 0.65 (TP53/B2M) und bezüglich HBB bei 0.71 (TP53/HBB) lag.

Als Negativkontrollen wurden drei Lymphknoten mit reaktiver Lymphadenitis mitgeführt, deren Ratio für HIC1/B2M bei jeweils 0.72, 0.83 und 0.97 und für HIC1/HBB bei jeweils 0.78, 0.92 und 0.86 lag. Für TP53/B2M wurde jeweils eine Ratio von 0.88, 0.92 und 0.98, für TP53/HBB eine Ratio von jeweils 0.90, 0.90 und 0.89 ermittelt (Tab. 13, Anhang).

In 9/11 DLBCL mit Deletion von RP11-667K14 bzw. RP11-433M14, lag die Ratio von HIC1/B2M zwischen 0.06 und 0.61 und somit deutlich unter dem Cut off-Wert von 0.67. In 2/11 Fällen (Nr. 7 und 27) wurde eine HIC1/B2M Ratio von 0.66 und 0.7 ermittelt (Abb. 25A und Tab. 13, Anhang). Bei der Untersuchung von HIC1-Deletionen mit HBB als Referenzgen wurden in 10/11 DLBCL Werte zwischen 0.07 und 0.64 gemessen, die unter dem Cut off-Wert von 0.65 lagen. Ein Fall (Nr. 8) zeigte eine Ratio von 0.72 (Abb. 25B und Tab. 13, Anhang).

Die Werte für TP53/B2M und TP53/HBB lagen in 11/11 DLBCL zwischen 0.88 und 1.59, was einen normalen, nicht-deletierten Status von TP53 nahelegte (Abb. 25 und Tab. 13, Anhang).

Eine genomische Deletion von HIC1 ohne den Verlust des TP53-Gens konnte somit in allen elf DLBCL nachgewiesen werden, die durch einen RP11-667K14- (bzw. durch RP11-433M14) Verlust gekennzeichnet waren (Tab. 1, Anhang).

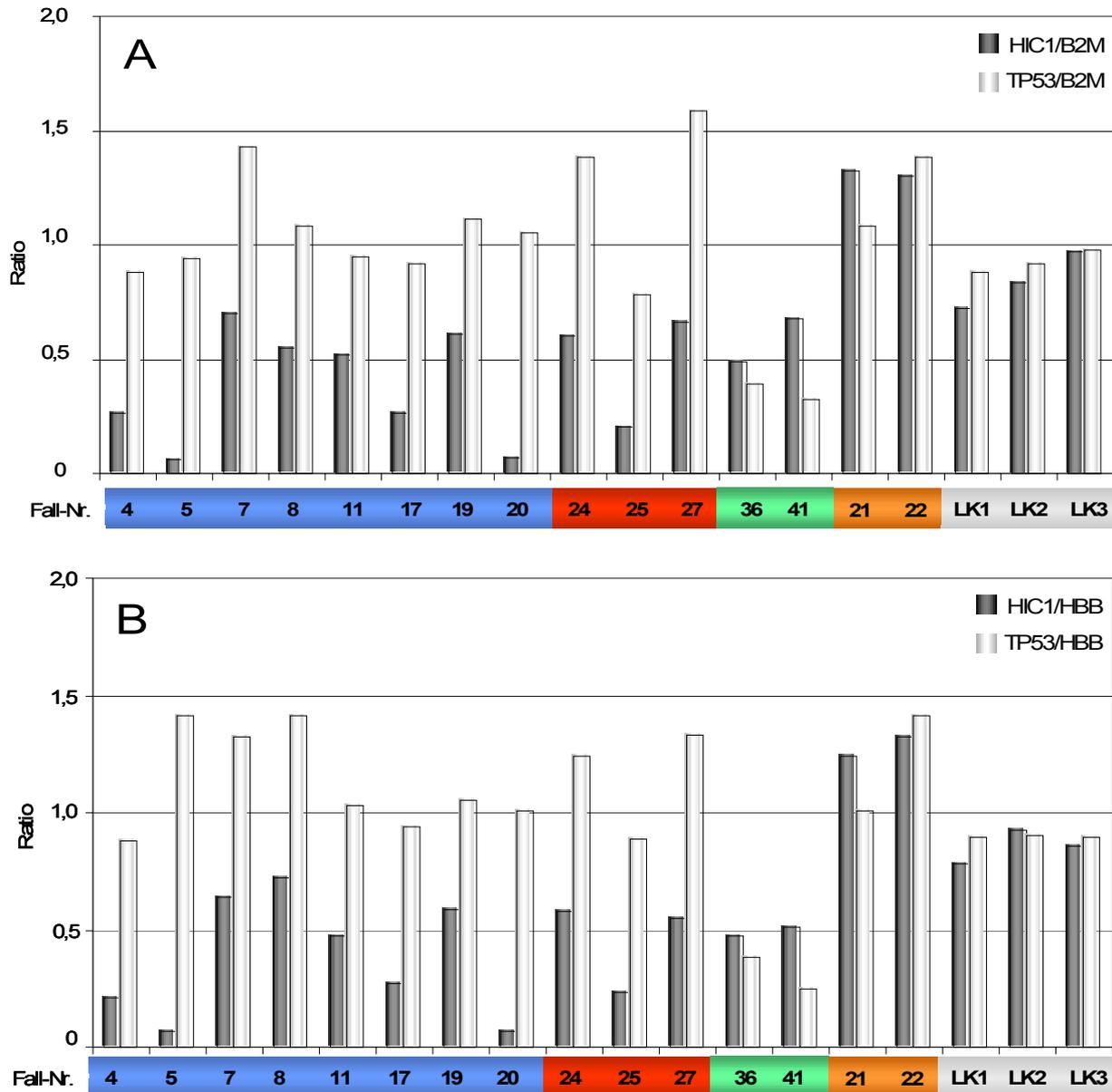


Abbildung 25: Quantitative Real-time PCR von DLBCL mit minimal deletierter Region in acht TP53+/+ Fällen (blau) und in drei TP53+/- Fällen mit TP53-Mutation (rot). Eine simultane Deletion von HIC1 und TP53 konnte u.a. in zwei Fällen (grün) nachgewiesen werden. In zwei durch TP53-Mutation inaktivierten DLBCL (orange), sowie in DNA aus Lymphknoten mit reaktiver Lymphadenitis (LK) (grau) konnte weder eine HIC1- noch eine TP53-Deletion nachgewiesen werden. Als Referenzgene wurden B2M (A) und HBB (B) verwendet.

Weder eine HIC1-Deletion noch eine TP53-Deletion konnten in zwei durch Mutation monoallelisch inaktivierten DLBCL (Fall-Nr. 21 und 22) mit normalem RP11-667K14 und normalem RP11-199F11-Status nachgewiesen werden. Die Ratio von HIC1/B2M und HIC1/HBB lag in diesen Fällen jeweils zwischen 1,24 und 1,32. Für TP53/B2M und

TP53/HBB wurde eine Ratio zwischen jeweils 1.01 und 1.41 ermittelt (Abb. 25 und Tab. 13, Anhang).

Zwei weitere Fälle mit monoallelischer Deletion von TP53 bei gleichzeitiger Deletion von RP11-667K14 (Fall-Nr. 36 und 41), dienten als Positivkontrollen. Die ermittelten Werte von TP53 und HIC1, im Vergleich zu den Referenzgenen B2M und HBB, zeigten den eindeutigen Verlust beider Gene auf DNA-Ebene (HIC1/B2M und HIC1/HBB: 0.41-0.68; TP53/B2M und TP53/HIC1: 0.25-0.39) (Abb. 25 und Tab. 13, Anhang).

4.3.2. Methylierungsstatus des HIC1-Promoters

Da eine Hypermethylierung des HIC1-Promoters für Leukämien und Lymphome bereits beschrieben werden konnte ^{115,116}, wurde der Methylierungsstatus des HIC1 Exon 1A-Promoters in 49/55 DLBCL untersucht.

Die Analyse des HIC1-Methylierungsstatus erfolgte mittels Bisulfit-Behandlung der TumordNA und anschließender methylierungsspezifischer PCR (MS-PCR), bei der durch den Einsatz spezifischer Oligonukleotide methylierte von unmethylierter DNA unterschieden werden kann. Es wurden Primer verwendet welche die 5'-untranslatierte Region (5'-UTR) inklusive des Exon 1a Promoters des HIC1-Gens amplifizieren.

Die Bisulfit-behandelte DNA aus dem Blut gesunder Probanden, sowie aus Lymphknoten mit reaktiver Lymphadenitis, wurde als Negativkontrolle, die konvertierte DNA von Raji-Zelllinien (analog ¹¹⁵) als Positivkontrolle verwendet. Die Oligonukleotide für die unmethylierte DNA amplifizierten ein 118 bp-Produkt, während die Primer für die methylierte DNA ein 95 bp großes Produkt bildeten. Repräsentative Ergebnisse der MS-PCR-Kontrollen sind in Abbildung 26 dargestellt. Während die Negativkontrollen lediglich mit Oligonukleotiden für unmethylierte DNA eine Amplifikation zeigten, wurde bei Verwendung der Raji-Zellen nur mit methylierungsspezifischen Primern ein Produkt gebildet.

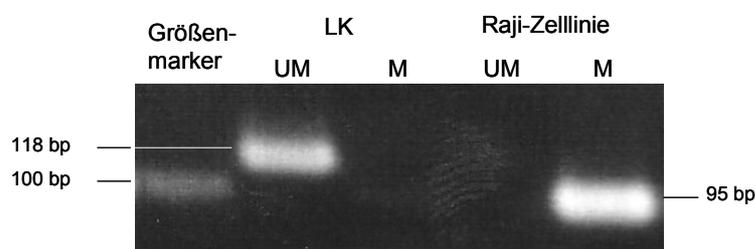


Abbildung 26: MS-PCR mit Negativ- und Positivkontrollen. Für unmethylierte (UM) DNA spezifisches Produkt bei 118 bp (Lymphknoten mit reaktiver Lymphadenitis „LK“). Für methylierte (M) DNA spezifisches Produkt bei 95 bp (Raji-Zellen).

Während bei den Kontrollen jeweils klar zwischen unmethyliertem und methyliertem Produkt unterschieden werden konnte, zeigten die Tumorproben oftmals eine Produktbildung sowohl mit methylierungsspezifischen Oligonukleotiden, als auch mit den Primern für das unmethylierte Produkt, was auf die Präsenz von Zellpopulationen mit unterschiedlichem HIC1-Methylierungsstatus hindeutet (Abb. 27). Da weder in Lymphknoten mit reaktiver Lymphadenitis, noch im peripheren Blut gesunder Probanden die Amplifikation eines Produktes mit methylierungsspezifischen Oligonukleotiden nachweisbar war, wurde das Vorhandensein eines methylierten Produktes, neben unmethylierter DNA, jedoch als positiver Hinweis für eine HIC1-Promotermethylierung gewertet.

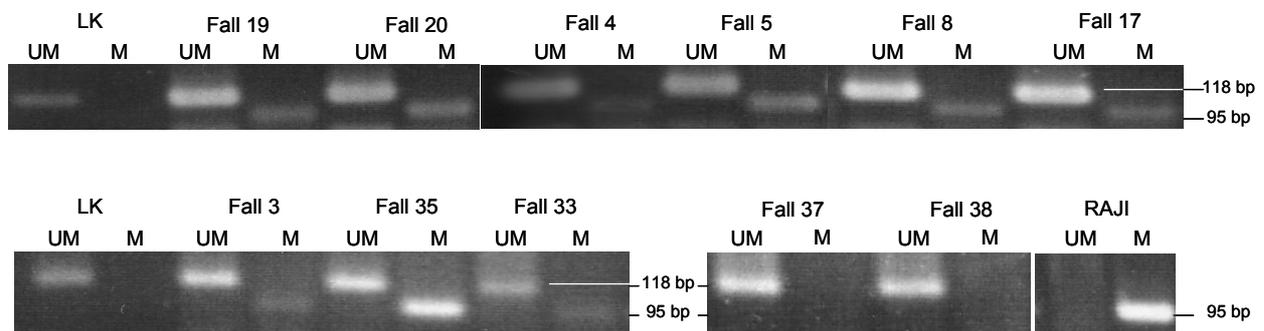


Abbildung 27: Repräsentative Ergebnisse der MS-PCR von DLBCL. Als Negativkontrollen wurde genomische DNA von Lymphknoten mit reaktiver Lymphadenitis (LK), als Positivkontrolle Raji-DNA verwendet.

Eine HIC1-Promotermethylierung konnte in 30 von 49 DLBCL (61%) detektiert werden, während die restlichen 19 analysierten Fälle (39%) keine Amplifikation mit methylierungsspezifischen Primern zeigten (Abb. 27 und Tab. 1, Anhang).

4.3.3. HIC1-Inaktivierungsstatus

Mittels detaillierter FISH-Analyse von Chromosom 17p13.3 und Untersuchungen der HIC1-Promotermethylierung konnte der HIC1-Status in 49/55 DLBCL ermittelt werden (Tab. 1, Anhang).

Von 30 Fällen mit einer Hypermethylierung von HIC1 war in 27 DLBCL eine gleichzeitige HIC1-Deletion nachweisbar, was auf eine biallelische Inaktivierung des HIC1-Gens hindeutete (HIC1^{-/-}) (Abb. 28). In drei Fällen war eine HIC1-Hypermethylierung nicht mit einer Deletion von HIC1 assoziiert, was entweder eine heterozygote HIC1-Inaktivierung (+/-), oder eine Inaktivierung beider HIC1-Allele durch Hypermethylierung nahe legte (Abb. 28).

In 19/49 DLBCL konnte keine epigenetische Veränderung durch Methylierung detektiert werden. Eine monoallelische Deletion des HIC1-Gens wurde in 11/19 Fälle nachgewiesen (HIC1^{+/-}), während 8/19 DLBCL keine Deletion zeigten, was auf ein Wildtyp HIC1-Gen hindeutete (Abb. 28).

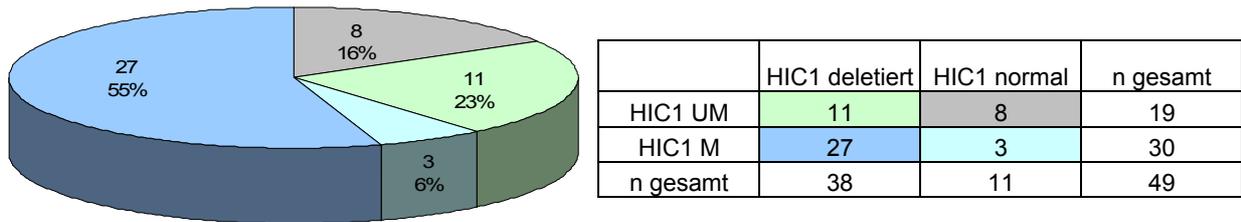


Abbildung 28: HIC1-Inaktivierungsstatus in 49 DLBCL. Wildtyp (WT)-HIC1 (+/+) in 8/49 Fällen (16%) (grau). Monoallelische HIC1-Inaktivierung (+/-) in 14/49 Fällen (29%) (grün). Homozygote Inaktivierung von HIC1 (-/-) in 27/49 Fällen (55%) (blau).

Eine Deletion von HIC1 war signifikant mit der Methylierung des Exon 1a-Promoters des HIC1-Gens assoziiert ($p=0.020$, Fisher's Exakt Test).

Eine Alteration des HIC1-Status war nicht auf GCB- oder ABC-DLBCL beschränkt, sondern lag in beiden Subtypen gleich häufig vor ($p=1.000$, Fisher's Exakt Test).

4.4. Korrelation des TP53- und HIC1-Status mit dem Überleben

Um den Einfluss des TP53-Status auf das Überleben der Patienten zu untersuchen, wurde die mediane Überlebenszeit mit der Inaktivierung von TP53 korreliert.

Mutationen des TP53-Gens waren nicht mit dem Überleben assoziiert ($p=0.1282$) (Abb. 29A), während TP53-Deletionen eine Tendenz zu einer verkürzten Überlebenszeit zeigten ($p=0.0639$) (Abb. 29B).

Während die mediane Überlebenszeit von Patienten mit heterozygoter TP53-Inaktivierung, im Vergleich zu Patienten mit Wildtyp-TP53, nicht kürzer war ($p=0.2807$) (Abb. 29C), konnte in DLBCL mit biallelischer Inaktivierung von TP53 eine, im Vergleich zu Patienten mit Wildtyp-TP53, signifikant verkürzte Überlebenszeit nachgewiesen werden ($p=0.0079$) (Abb. 29D).

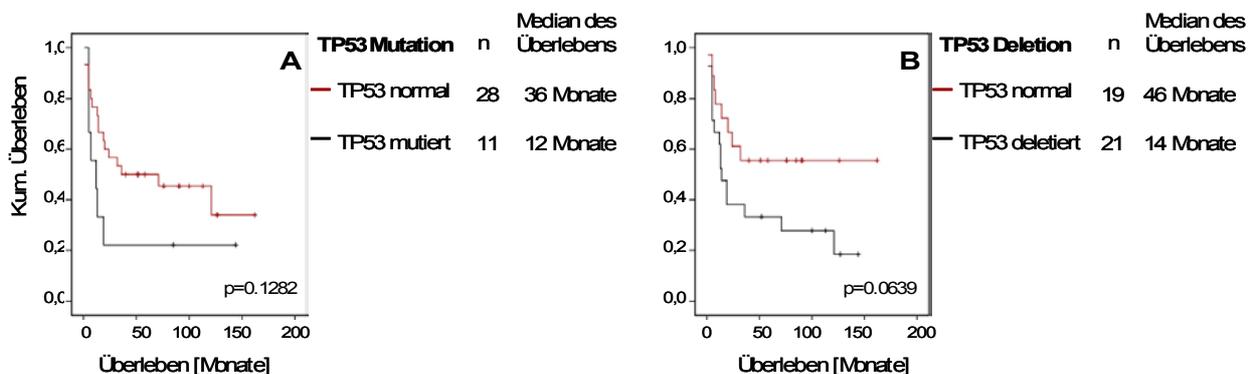


Abbildung 29: Fortsetzung siehe S. 62

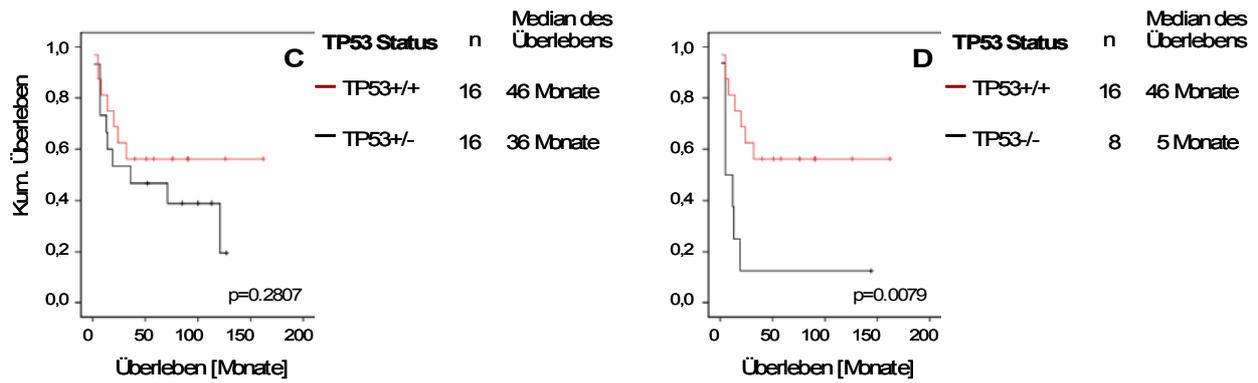


Abbildung 29: Überlebensanalyse bezüglich TP53-Mutation (A), TP53-Deletion (B), monoallelscher Inaktivierung von TP53 (C) und biallelscher TP53-Inaktivierung (D) der Tumoren. Eine signifikant verkürzte mediane Überlebenszeit konnte für Patienten mit biallelscher TP53-Inaktivierung (-/-), im Vergleich zu Patienten mit TP53-Wildtyp (+/+) nachgewiesen werden (p=0.0079) (D).

Um den Einfluss des HIC1-Status auf das Überleben der Patienten zu untersuchen, wurde die mediane Überlebenszeit der Patienten mit einer Inaktivierung von HIC1 korreliert. Eine Hypermethylierung des HIC1-Promoters war nicht mit dem Überleben assoziiert (p=0.2310) (Abb. 30A), wohingegen eine HIC1-Deletion signifikant mit einer kürzeren medianen Überlebensdauer korreliert war (p=0.0132) (Abb. 30B).

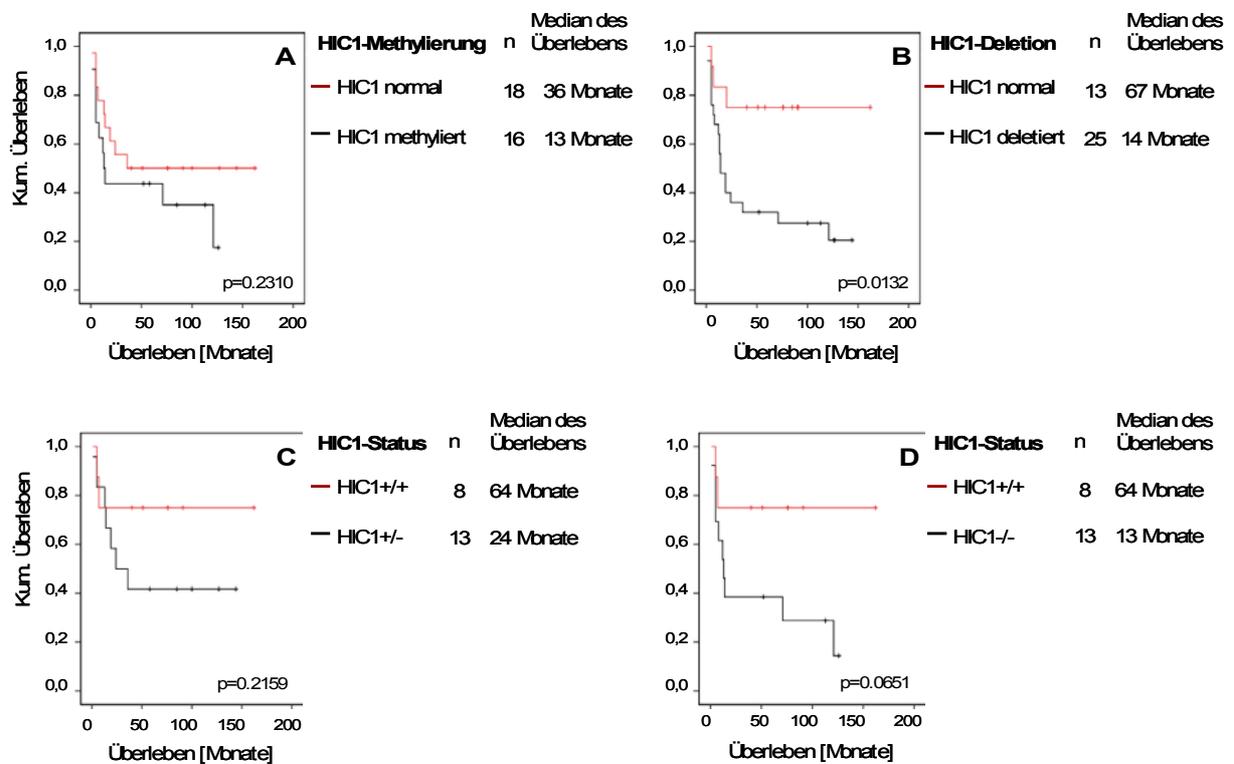


Abbildung 30: Überlebensanalyse bezüglich HIC1-Methylierung (A), HIC1-Deletion (B), monoallelscher Inaktivierung von HIC1 (C) und biallelscher HIC1-Inaktivierung (D) der Tumoren. Eine signifikant verkürzte

mediane Überlebenszeit konnte in Patienten mit HIC1-Deletion, im Vergleich zu Patienten mit nicht-deletiertem HIC1 nachgewiesen werden ($p=0.0132$) (B).

Die mediane Überlebenszeit von Patienten mit heterozygotem HIC1 war, im Vergleich zu Patienten mit Wildtyp-HIC1, nicht signifikant kürzer ($p=0.2159$) (Abb. 30C). Eine Tendenz zu einer verkürzten Überlebenszeit konnte in DLBCL mit biallelischer Inaktivierung von HIC1, im Vergleich zu Patienten mit Wildtyp-HIC1, nachgewiesen werden ($p=0.0651$) (Abb. 30D).

Da kürzlich gezeigt werden konnte, dass HIC1 ein direktes Zielgen des Transkriptionsfaktors p53 darstellt ¹¹⁷, wurde die gleichzeitige Inaktivierung von TP53 und HIC1 im Hinblick auf die Überlebenszeit von DLBCL-Patienten untersucht.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass von 17 DLBCL mit normalem TP53-Status (+/+) in sieben Fällen (41%) auch ein normaler HIC1-Status (+/+) vorlag (Tab. 9), während in weiteren sieben DLBCL (41%) eine HIC1-Deletion und eine Methylierung des HIC1-Promoters im zweiten Allel vorlag. In drei Fällen (18%) lag ein heterozygoter HIC1-Status (+/-) vor (Tab. 9).

In 20 DLBCL mit heterozygotem TP53-Status (+/-) war ein Fall (5%) mit einem Wildtyp-HIC1 (+/+) assoziiert, während in sieben DLBCL (35%) ebenfalls eine heterozygote Inaktivierung von HIC1 (+/-) vorlag. In 12/20 Fällen (60%) mit monoallelischem TP53-Status konnte eine gleichzeitig auftretende Deletion und Promotermethylierung des HIC1-Gens (-/-) nachgewiesen werden (Tab. 9).

Zwölf DLBCL mit biallelischer TP53-Inaktivierung (-/-) waren entweder durch heterozygote Inaktivierung von HIC1 (+/-) (4/12, 33%) oder durch HIC1-Deletion und gleichzeitige Methylierung des Exon 1a-Promoters (-/-) (8/12, 67%) charakterisiert. In keinem der TP53-/- Fälle lag ein normaler HIC1-Status vor (Tab. 9).

	HIC1+/+	HIC1+/-	HIC1-/-	Gesamt
TP53+/+	7	3	7	17
TP53+/-	1	7	12	20
TP53-/-	0	4	8	12
Gesamt	8	14	27	49

Tabelle 9: Übersicht über die gleichzeitige Inaktivierung von TP53 und HIC1 in 49 DLBCL

Um den Einfluss einer gleichzeitigen Inaktivierung von TP53 und HIC1 auf das Überleben der Patienten zu untersuchen, wurde die mediane Überlebenszeit der Patienten mit der Inaktivierung von TP53 und HIC1 korreliert.

Die mediane Überlebensdauer von Patienten mit heterozygot inaktiviertem TP53 (+/-) und HIC1 (+/-) war im Vergleich zu Patienten mit Wildtyp-TP53 (+/+) und Wildtyp-HIC1 (+/+) nicht signifikant unterschiedlich ($p=0.101$) (Abb. 30E).

schwach reduziert ($p=0.1299$) (Abb. 31A). Eine signifikant verkürzte Überlebensdauer konnte in Patienten mit gleichzeitiger biallelischer Inaktivierung von TP53 (-/-) und HIC1 (-/-), im Vergleich zu Patienten mit Wildtyp-TP53 (+/+) und Wildtyp-HIC1 (+/+), nachgewiesen werden ($p=0.0048$) (Abb. 31B).

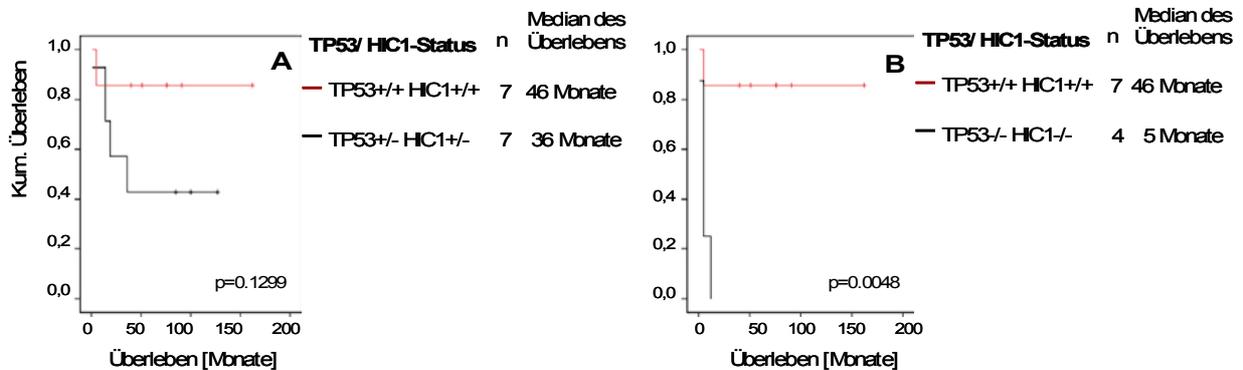


Abbildung 31: Überlebensanalyse bezüglich gleichzeitiger monoallelischer Inaktivierung von TP53 und HIC1 (A) und gleichzeitiger biallelischer TP53- und HIC1-Inaktivierung (B).

Die mediane Überlebenszeit für Patienten mit biallelischer TP53-Inaktivierung (TP53-/-), wie auch bei Patienten mit gleichzeitiger homozygoter Inaktivierung von TP53 und HIC1 (TP53/HIC1-/-) betrug jeweils 5 Monate (Abb. 29D und Abb. 31B). Allerdings wurde für TP53-/- Patienten ($n=8$) eine durchschnittliche Überlebenszeit von 26 Monaten ermittelt. Die durchschnittliche Überlebenszeit von Patienten mit gleichzeitiger Inaktivierung von TP53 und HIC1 ($n=4$) betrug sechs Monate.

Trotz der geringen Fallzahl konnte somit eine signifikant reduzierte durchschnittliche Überlebenszeit in DLBCL-Patienten mit gleichzeitiger TP53- und HIC1-Inaktivierung nachgewiesen werden.

5. Diskussion

Diffuse großzellige B-Zell Lymphome (DLBCL), die mit ca. 30-40% die häufigste Entität der B-Zell Non-Hodgkin Lymphome (B-NHL) darstellen, sind insbesondere durch ihre Heterogenität hinsichtlich des klinischen Verlaufs und dem Ansprechen der Patienten auf chemotherapeutische Maßnahmen charakterisiert ¹. Bisher können lediglich zwei Drittel der Patienten durch standardisierte Chemotherapie nach dem CHOP-Schema komplette Remissionen erreichen und nur die Hälfte der Patienten kann dauerhaft geheilt werden ^{3,4}.

Die Charakterisierung genomischer Aberrationen und die daraus resultierende Identifizierung prognostischer Marker könnten daher wesentlich zur Entwicklung individualisierter Therapien und somit möglicherweise zu mehr Erfolg in der Behandlung dieser Erkrankung beitragen.

So ist bisher zwar bekannt, dass der kurze Arm von Chromosom 17 in malignen Lymphomen einen häufigen Angriffspunkt genomischer Aberrationen darstellt ^{1,36}, allerdings blieb in DLBCL bislang ungeklärt ob TP53 in Chromosom 17p13.1 das alleinige Ziel dieser Aberration ist, oder ob andere TSG von einer Deletion in 17p [del(17p)] betroffen sind.

5.1. Deletionen in Chromosom 17p sind nicht zwangsweise mit Mutationen des TP53-Gens assoziiert

Eine del(17p) konnte in soliden Tumoren wie auch in hämatologischen Neoplasien mit einer Mutation des TP53-Gens assoziiert werden, was zum vollständigen Verlust der p53-Funktionalität führt ^{62,63,118}. Eine biallelische Inaktivierung des TSG durch beide Ereignisse wurde bislang allerdings in nur wenigen Studien in malignen Lymphomen gezeigt ^{73,119}.

Bereits im Vorfeld der vorliegenden Arbeit wurden zytogenetische Untersuchungen vorgenommen, die den Nachweis von Deletionen in 17p bei DLBCL ermöglichten. Im Hinblick auf das „two-hit“-Modell nach Knudson ⁵⁹, erfolgten immunhistochemische Färbungen von p53-Protein, die als Indikator für Mutationen des TP53-Gens gelten ⁸¹.

Eine Diskrepanz zwischen der Inaktivierung des ersten TP53-Allels durch Deletion ohne gleichzeitige Überexpression von p53-Protein wurde auch durch die detaillierte Untersuchung des TP53-Mutationsstatus mittels Sequenzanalyse genomischer DNA und FASAY bestätigt.

Obwohl mit der Kombination aus Zytogenetik und FISH eine del(17p) in 28 DLBCL nachgewiesen werden konnte, wurde in nur 13 von 28 Fällen eine gleichzeitig auftretende Mutation des TP53-Gens detektiert, was analog der „two-hit“-Hypothese ⁵⁹ auf eine biallelische TP53-Inaktivierung (TP53-/-) hindeutet. Aufgrund der ausführlichen TP53-Mutationsanalyse mittels Sequenzierung und FASAY konnte dabei ausgeschlossen werden, dass Alterationen des TP53-Gens unentdeckt blieben.

Somit war in 15 von 28 DLBCL lediglich eine durch Deletion verursachte monoallelische Inaktivierung von TP53 nachweisbar. Darüber hinaus zeigten sieben Fälle Mutationen des TP53-Gens ohne gleichzeitig auftretende Deletion des verbliebenen Allels. Somit war in 40% der Fälle (22/55) lediglich die Inaktivierung eines TP53-Allels (TP53+/-) nachweisbar.

5.2. Sequenzanalyse genomischer DNA versus FASAY – Erhöhte Frequenz der TP53-Mutationsdetektion mittels FASAY

Mittels direkter Sequenzanalyse des TP53-Gens wurde der Mutationsstatus von 55 DLBCL im Detail untersucht. Die zentrale DNA-Bindungsdomäne von TP53 gilt als häufiges Ziel für Punktmutationen in B-Zell Lymphomen^{10,69,120}. Dennoch konnte gezeigt werden, dass Mutationen außerhalb dieser Region, insbesondere auch in Non-Hodgkin Lymphomen, nicht unüblich sind¹²¹. Während sich die meisten Studien zur Untersuchung des TP53-Mutationsstatus auf die Analyse der zentralen TP53-Domäne beschränken¹⁰, wurde in der hier vorliegenden Arbeit die vollständige kodierende Sequenz des TP53-Gens von Exon 2 bis 11 untersucht. Eine TP53-Mutation konnte dabei in nur 11 von 22 p53-überexprimierenden DLBCL nachgewiesen werden. Neben der direkten Sequenzanalyse genomischer DNA wurde der TP53-Mutationsstatus darüber hinaus mittels FASAY untersucht. FASAY basiert auf der Transformation von Hefezellen mit TP53 cDNA. Zellen, die ein funktionales Protein exprimieren, können von Hefezellen, die ein mutiertes p53-Protein produzieren, aufgrund ihrer Farbe unterschieden werden. Die Untersuchung des TP53-Mutationsstatus mittels FASAY gewinnt aufgrund der hohen Sensitivität, insbesondere auch in Tumoren mit einer limitierten Anzahl von Tumorzellen, immer mehr an Bedeutung. Darüber hinaus ermöglicht diese Methode durch die Untersuchung einzelner Hefeklone die Analyse beider TP53-Allele^{100,101}. Mittels FASAY wurde eine um 50% erhöhte Mutationsfrequenz nachgewiesen.

Die Diskrepanz zwischen beiden Methoden kann mehrere Gründe haben. So kann beispielsweise die Sequenzanalyse genomischer DNA durch einen zu geringen Anteil an Zellklonen mit TP53-Mutation limitiert sein, selbst wenn in allen untersuchten Fällen ein Tumorzellgehalt von mindestens 50% ermittelt wurde. Bei der FASAY-Analyse hingegen können selbst einzelne Hefezellklone mit mutiertem TP53 aufgrund ihres farblichen Unterschieds in einem Umfeld von Klonen mit normalem TP53 detektiert werden.

Ein weiteres Problem der direkten Sequenzanalyse besteht darin, dass Wildtyp-Sequenzen genomischer DNA im Vergleich zu mutiertem Material mittels PCR bevorzugt amplifiziert werden^{122,123}. Beim FASAY hingegen wird mRNA als Ausgangsmaterial eingesetzt. Die Tatsache dass mRNA in Tumorzellen in höheren Konzentrationen vorliegt als in normalen Zellen, bietet daher einen weiteren Vorteil des FASAY gegenüber der direkten Sequenzanalyse genomischer DNA¹²⁴.

Die hohe Sensitivität des FASAY wurde bereits mehrfach beschrieben. So konnte bei der gleichzeitigen TP53-Mutationsdetektion mittels FASAY, immunhistochemischer Färbungen von p53 Protein, SSCP („Single stranded conformation polymorphism“) und der direkten Sequenzanalyse genomischer DNA, die höchste Detektionsfrequenz von TP53-Mutationen mittels FASAY erzielt werden ^{124,125}.

Ein weiterer Vorteil des FASAY insbesondere gegenüber der hochempfindlichen DHPLC-basierten Methode („denaturing high-performance liquid chromatography“) zur Detektion von Mutationen besteht darin, dass mittels FASAY beim Auftreten von TP53-Mutationen sofortige Aussagen über die Funktionalität des Gens ermöglicht werden ¹²⁶.

5.3. Inaktivierung des verbliebenen TP53-Allels durch dominant-negative TP53-Mutation ?

Obwohl eine Mutation des TP53-Gens in 20 DLBCL detektiert wurde, konnte in nur 13/20 Fällen eine biallelische TP53-Inaktivierung (TP53-/-) durch gleichzeitige Deletion des zweiten Allels beobachtet werden. Das Auftreten von TP53-Mutationen ohne den Verlust des verbliebenen Allels wurde in DLBCL bereits beschrieben ^{73,119}. Es wird vermutet, dass TP53-Mutationen die in Zusammenhang mit einer TP53-Deletion auftreten auf rezessive Weise agieren, während das Auftreten einer monoallelischen TP53-Mutation mit einem dominant-negativen Effekt assoziiert ist. Durch eine dominant-negative TP53-Mutation kann der tetramere p53-Proteinkomplex eine Veränderung seiner Konformation erfahren, was zur verminderten DNA-Bindungskapazität, sowie zur abnehmenden Induktion von p53-Zielgenen führen kann ¹²⁷⁻¹²⁹.

Die verringerte Expression von MDM2- und p21-Protein in Zusammenhang mit einer Mutation des TP53-Gens konnte bereits beschrieben werden ⁷². Dabei wurde ein p53+/p21-/MDM2- Phänotyp charakterisiert, der einen Verlust der p53-Funktionalität nach einer TP53-Mutation suggerierte. Die in der Studie von Villuendas et al, 1997 ⁷², auftretenden Mutationen betrafen jeweils nur ein Allel des TSG und waren mit der Überexpression von p53-Protein assoziiert. Eine möglicherweise vollständige Inaktivierung der p53-Funktionalität konnte durch fehlende Proteinexpression der p53-Zielgene p21 und MDM2, bei gleichzeitig erhöhter p53-Expression gezeigt werden. Andere Fälle dieser Studie zeigten trotz TP53-Mutation und Überexpression von p53 eine schwache Expression der p53-Zielgene, was Rückschlüsse auf das Vorhandensein eines noch intakten zweiten Allels ermöglichte ⁷².

Auch in der hier vorliegenden Arbeit wurden immunhistochemische Untersuchungen von p21 und MDM2 an DLBCL mit monoallelischer Mutation des TP53-Gens durchgeführt. Da jedoch p21- und MDM2-Protein unter physiologischen Bedingungen in nur 1 bis 12% der Zellen exprimiert werden, ist die quantitative Auswertung einer reduzierten p21- und MDM2-Proteinexpression im Tumorgewebe kaum möglich. Obwohl ein p53+/p21-/MDM2- ähnlicher

Phänotyp in vier DLBCL mit monoallelischer TP53-Mutationen nachgewiesen werden konnte, können über die Auswirkungen eines dominant-negativen Effektes lediglich Vermutungen angestellt werden. Auch in der Literatur wird dieser Effekt kontrovers diskutiert. Während *in vitro* Studien mit kultivierten Zellen den Nachweis erbrachten, dass Missense-Mutationen des TP53-Gens zum Funktionsverlust des verbliebenen Wildtyp-Proteins führen^{72,127-130}, konnte gezeigt werden, dass mutiertes p53 nicht zwangsweise die Transaktivierung aller Targetgene inhibiert: so kann beispielsweise die Aktivierung von p21 induziert werden, nicht jedoch die des pro-apoptotischen Bax^{131,132}. Weitere Studien wiederum konnten demonstrieren, dass mutiertes p53 nicht in der Lage ist die Funktion des endogenen Wildtyp-Proteins zu supprimieren¹³³⁻¹³⁶.

5.4. Mutationen des TP53-Gens sind mit der aberranten Expression von p53-Protein assoziiert

Obwohl das Auftreten von Punktmutationen in der DNA-Bindungsdomäne des TP53-Gens in den hier untersuchten DLBCL mit einer aberranten p53-Expression signifikant korreliert war, gab es dennoch einige Fälle, die trotz Überexpression von p53-Protein keine TP53-Mutation aufwiesen. Gleichermäßen konnten Mutationen des TP53-Gens auch in DLBCL mit negativem p53-Färbemuster detektiert werden.

Die immunhistochemische Färbung von p53-Protein ist zwar ein gängiges Verfahren, um TP53-Mutationen in der Routinediagnostik zu evaluieren, dennoch konnte anhand mehrerer Studien bereits gezeigt werden, dass die Überexpression von p53-Protein nicht zwangsweise mit einer Mutation des TP53-Gens assoziiert ist^{73,120,137}. Das Protein kann vielmehr auch durch alternative Mechanismen stabilisiert werden^{120,137,138}. So wird Wildtyp p53 z.B. unter physiologischen Bedingungen infolge von onkogenem Stress oder nach DNA-Schädigung phosphoryliert und bleibt hierdurch, auch ohne TP53-Mutation, in stabilisierter Form^{139,140}. Darüber hinaus ist eine Vielzahl von Proteinen bekannt, die auf posttranslatonaler Ebene mit p53 interagieren um seine Funktionalität zu erhalten, was ebenfalls unabhängig von der Mutation des TP53-Gens zu einer erhöhten p53-Konzentration in der Zelle führt^{43,82}. Die Bindung von p53 an virale Proteine (z.B. SV40) resultiert zwar im Verlust der p53-Funktionalität, führt aber ebenfalls zu einer erhöhten Halbwertszeit des Proteins¹¹⁸.

Demgegenüber können falsch-negative Ergebnisse insbesondere in Zusammenhang mit einem trunkierten p53-Protein auftreten, das aus verschiedenen TP53-Mutationen, wie z.B. einem frühzeitigen Stop-Codon, einer Verschiebung des Leserahmens oder einer Alteration der Spleißsequenzen, hervorgehen kann^{73,118}. Eine solche Nonsense-Mutation konnte allerdings in keinem der hier untersuchten DLBCL gefunden werden, die trotz fehlender Überexpression des Proteins eine TP53-Mutation aufwiesen; vielmehr waren Deletionen in

der TP53-Sequenz, die in zwei DLBCL auftraten, mit einer vermehrten Expression von p53 assoziiert.

Eine mögliche Erklärung für das Auftreten von TP53-Mutationen trotz fehlender p53-Überexpression könnte der kürzlich beschriebene „Single Nucleotide Polymorphism“ an Position 309 des MDM2-Promoters (SNP309) liefern. Hierbei erfolgt ein Nukleotid-Austausch von Thymin zu Guanin (T309G). Es konnte gezeigt werden, dass der SNP309 mit einer erhöhten Affinität des Transkriptionsfaktor Sp1 zu MDM2 assoziiert ist, der durch die Aktivierung der MDM2-Transkription zur gesteigerten Expression von MDM2-RNA und -Protein, und somit zur Degradierung von p53-Protein führt ¹⁰⁶. Auch mutiertes p53-Protein kann durch MDM2 abgebaut werden, solange die zur MDM2-vermittelten Ubiquitinierung essentiellen Aminosäure-Reste im C-terminalen Bereich des Proteins nicht von der Mutation betroffen sind. Die Untersuchung des MDM2 SNP309 erfolgte in vier DLBCL, die trotz fehlender p53-Expression eine Mutation des TP53-Gens aufwiesen, welche den zentralen DNA-Abschnitt des Gens und nicht die C-terminale Region betrafen. Ein homozygoter SNP309 (G/G) konnte jedoch in keinem der Fälle detektiert werden. Darüber hinaus konnte in keinem der Fälle eine erhöhte MDM2-Proteinexpression detektiert werden, was darauf hindeutet, dass zumindest in diesen Fällen der MDM2-Signalweg keine Auswirkungen auf die Stabilität von p53-Protein hat. Auch in einer Studie mit Mantelzell-Lymphomen konnte der bei Bond et al, 2004 ¹⁰⁶, beschriebene Effekt des SNP309 auf die MDM2 RNA-Expression nicht bestätigt werden. Es wurde zwar gezeigt, dass eine erhöhte MDM2 RNA-Expression mit dem Überleben der Patienten, nicht aber mit dem Auftreten des SNP309, assoziiert ist ¹⁴¹.

5.5. Inaktivierung von p53-Protein durch posttranslationale Modifikationen oder Alternativmechanismen?

Neben dem MDM2-vermittelten Abbau von p53-Protein sind jedoch noch weitere Mechanismen bekannt, die durch Ubiquitinierung, Deacetylierung, Neddylierung oder Sumoylierung die Degradierung von p53-Protein induzieren vermögen und somit zur Verkürzung der p53-Halbwertszeit führen ^{43,82}. Diese Mechanismen sind insbesondere auch für maligne Lymphome nicht auszuschließen. Während eine durch Deletion und/oder Mutation verursachte TP53-Inaktivierung in etwa 50% aller humanen Neoplasien auftritt ⁷⁸, ist die Frequenz dieser TP53-Alterationen in Lymphomen mit 15-25% niedriger ^{1,10,36}. Deshalb wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit p53-Regulatoren auf Proteinebene immunhistochemisch untersucht.

Der Nachweis einer veränderten Proteinexpression wurde durch die Verwendung von Gewebe-Mikroarrays deutlich vereinfacht. So können Gewebestanden von bis zu 1000

unterschiedlichen Fällen in einen Paraffinblock eingebracht und unter gleichen Bedingungen gefärbt werden ¹⁴².

Einer der bekanntesten p53-Negativregulatoren ist die E3-Ubiquitinligase MDM2, deren Proteinexpression bereits in Zusammenhang mit dem SNP309 in vier DLBCL untersucht wurde. Eine Überexpression von MDM2, sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene konnte in DLBCL, sowie in Mantelzell-Lymphomen und extranodalen Marginalzonen-Lymphomen bereits gezeigt werden ^{84,141,143,144}. Während in früheren Untersuchungen etwa 15-34% B-NHL von einer Überexpression des MDM2-Proteins betroffen waren, wurde in keinem der hier untersuchten DLBCL eine erhöhte MDM2-Expression nachgewiesen. Stattdessen konnte in allen Fällen eine signifikant reduzierte MDM2-Expression detektiert werden. Ein solcher Effekt wurde für maligne Lymphome bislang nicht beschrieben. Technische Gründe bei der immunhistochemischen Färbung von MDM2 können daher nicht ausgeschlossen werden. So kann beispielsweise eine zu kurze Andauung des Tumorgewebes bei der Antigenaufbereitung eine schwächere Bindung des Antikörpers bewirken, selbst wenn der Antikörper an Kontrollgewebe erfolgreich etabliert wurde. Es bleibt somit unklar, ob in dem hier untersuchten DLBCL-Kollektiv ein durch MDM2 vermittelter Alternativmechanismus der p53-Inaktivierung vorlag. Allerdings wird dies auch in der Literatur kontrovers diskutiert. Während gezeigt wurde, dass eine erhöhte Expression von MDM2-Protein insbesondere in B-NHL mit Wildtyp-TP53 auftrat ¹⁴⁴, konnten andere Autoren dies nicht bestätigen; vielmehr wurde eine erhöhte MDM2-Expression auch in Fällen mit TP53-Alterationen nachgewiesen ⁸⁴.

Ein weiterer potentieller p53-Negativregulator, der im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, ist der Transkriptionsfaktor YY1. Es konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte YY1-Expression, durch verstärkte p53-Ubiquitinierung, sowie durch verminderte Acetylierung von C-terminalen Lysinresten, zur Reduktion der zellulären p53-Konzentration führt ^{58,145}. Der Effekt der p53-Inhibierung ist einerseits auf eine YY1-vermittelte Komplexierung von p53 und MDM2 zurückzuführen ⁵⁸. Andererseits kann durch YY1 auch der durch p300-vermittelten Acetylierung von C-terminalen Lysinresten des p53-Proteins entgegengewirkt werden, die der Stabilisierung von p53 dient. An den nicht acetylierten Resten kann dann die Ubiquitinierung durch MDM2 erfolgen ¹⁴⁵. Eine erhöhte YY1-Expression konnte bereits mit der akuten myeloischen Leukämie in Verbindung gebracht werden ⁸⁸. Darüber hinaus wird vermutet, dass die Regulation von p53-Targetgenen durch YY1 erfolgt, was das Potential dieses Transkriptionsfaktors in der Tumorprogression verdeutlicht ⁵⁸. Immunhistochemische Färbungen von YY1 wurden bislang jedoch weder in malignen Lymphomen, noch im normalen lymphoiden Gewebe durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden dass die Expression von YY1 in Lymphknoten mit reaktiver Lymphadenitis auf die B-Lymphozyten des Keimzentrums beschränkt ist und dass

bereits durchschnittlich etwa 90% der normalen Keimzentrumszellen eine positive YY1-Expression aufwiesen. Eine signifikant erhöhte YY1-Expression in Tumorzellen, die möglicherweise zur Inaktivierung von p53 führt, konnte in den hier untersuchten DLBCL somit nicht nachgewiesen werden.

Neben der Überexpression von p53-Negativregulatoren kann die Inaktivierung von Positivregulatoren, wie z.B. CHK2, die Stabilität des Proteins beeinflussen. So erfolgt als Antwort auf DNA-Schäden die Aktivierung von CHK2 durch die ATM-Kinase. Die durch CHK2-vermittelte Phosphorylierung von Targetproteinen, wie z.B. p53, führt letztendlich zum Zellzyklus-Arrest, um Zeit für die DNA-Reparatur bereitzustellen¹⁴⁶. Es konnte gezeigt werden, dass Alterationen von CHK2 in B-NHL eher selten sind. Allerdings wurde in einigen Mantelzell-Lymphomen und DLBCL eine signifikant reduzierte Expression von CHK2-Protein nachgewiesen, was mit einer erhöhten Anzahl chromosomaler Aberrationen assoziiert war. Eine verringerte CHK2-Expression war dabei unabhängig vom TP53-Status⁸⁷. Auch in den hier untersuchten DLBCL konnte eine signifikant reduzierte Expression von CHK2, unabhängig von einer TP53-Inaktivierung in einigen DLBCL nachgewiesen werden.

Dennoch wird der Einfluss von CHK2 auf p53 kontrovers diskutiert. Während in CHK2-defizienten Mäusen die fehlende Phosphorylierung von p53 durch CHK2, sowie die abwesende Expression von p53-Targetgenen nachgewiesen wurde¹⁴⁷, konnte in humanen Tumorzellen gezeigt werden, dass selbst nach Inaktivierung von CHK2 ein p53-vermittelter Signalweg stattfinden kann^{148,149}.

Neben den hier untersuchten p53-Regulatoren können weitere bislang weniger gut untersuchte Negativregulatoren, wie z.B. MDM4, PIRH2, COP1 und SIRT1, an der Degradierung von p53 in DLBCL beteiligt sein¹⁵⁰⁻¹⁵⁵. Dass die Stabilität von p53 durch einen Verlust von weiteren Positivregulatoren, wie z.B. HAUSP und GSK3 β , beeinträchtigt wird ist ebenfalls nicht auszuschließen^{156,157}, auch wenn bislang keiner dieser Regulatoren in Zusammenhang mit lymphatischen Neoplasien untersucht wurde.

Auch die Promoter-Hypermethylierung von TSG konnte mit einer verminderten Transkription, sowie mit der Progression von Tumoren assoziiert werden¹⁵⁸. Eine Hypermethylierung der TP53-Promoterregion, sowie eine daraus resultierende verminderte TP53-Genexpression konnte bislang in einigen Fällen akuter lymphoblastischer Leukämien nachgewiesen werden^{159,160}.

Ein möglicher Effekt auf die Inaktivierung von p53, wird auch dem p53-Familienmitglied p73 zugeschrieben. P73 ist in der Bande 1p36 lokalisiert, einer Region die in humanen Neoplasien häufig alteriert, und insbesondere in malignen NHL häufig deletiert ist¹⁶¹. Obwohl p73 typische p53-Targetgene aktivieren und somit die Zellzyklus-Progression inhibieren kann¹⁶², agiert es nicht wie ein klassisches „Knudson-TSG“. In vielen soliden Tumoren konnte stattdessen eine Überexpression von p73 nachgewiesen werden¹⁶³⁻¹⁶⁵, während in

lymphoiden Neoplasien sowohl eine erhöhte p73-Konzentration¹⁶⁶, als auch die Inaktivierung des Gens durch Deletion oder Hypermethylierung gezeigt werden konnte¹⁶⁷. Dieser Effekt scheint mit dem Vorkommen verschiedener p73-Isoformen assoziiert zu sein. So konnte nachgewiesen werden, dass die Isoform TAp73 Zellzyklus-Arrest und Apoptose initiiert, während die Isoform Δ Np73 sowohl den durch TAp73- als auch durch p53-vermittelte Mechanismen zur Inhibierung der Zellproliferation entgegenwirkt^{163,168}. Um einen solchen Effekt auf die p53-Inaktivierung in DLBCL zu untersuchen, sind allerdings weitere Analysen notwendig.

5.6. Inaktivierung des Tumorsuppressors HIC1 in DLBCL

Obwohl in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass eine del(17p) signifikant mit der Mutation des verbleibenden TP53-Allels und auch mit der Überexpression von p53-Protein assoziiert war, wurde eine vollständige Inaktivierung von TP53 durch Mutation und Deletion in nur 24% der untersuchten DLBCL (13/55) nachgewiesen. Hingegen konnte, neben monoallelischen Mutationen des TP53-Gens in 27% der Fälle (15/55) auch das Auftreten von monoallelischen TP53-Deletionen detektiert werden.

Deletionen eines TP53-Allels ohne gleichzeitige Mutation des zweiten Allels wurden in DLBCL bereits beschrieben^{73,119,169}. Es ist naheliegend, dass bei genomischen Deletionen, die den TP53-Lokus beinhalten, das TP53-Gen nicht das alleinige Ziel darstellt, sondern dass möglicherweise weitere TSG in dieser Region von einer Deletion betroffen sind. Darüber hinaus konnte in der vorliegenden Arbeit mittels konventioneller Chromosomenbänderung in sechs Fällen eine del(17p) nachgewiesen werden, während bei der Hybridisierung mit TP53-lokusspezifischen Sonden in diesen Fällen kein Verlust des Gens vorlag. Ähnliche Ergebnisse konnten in hämatologischen Neoplasien bereits gezeigt werden. So wurde in einigen Fällen akuter myeloischer Leukämien, akuter lymphoblastischer Leukämien, chronisch lymphatischer Leukämien, sowie in malignen Lymphomen das Auftreten von 17p-Deletionen ohne den Verlust des TP53-Lokus beobachtet⁹⁴.

Die detaillierte Analyse der chromosomalen Banden 17p13.1 (TP53) bis 17p13.3 (Telomer) mittels sequenzspezifischer „Bacterial Artificial Chromosome“ (BAC) und „Phage 1 Artificial Chromosome“ (PAC) Sonden in den hier untersuchten DLBCL ermöglichte die Identifizierung einer 0.8 MB umfassenden minimal deletierten Region (MDR) in Chromosom 17p13.3 in 20% der untersuchten DLBCL (11/55). Fünf der sechs DLBCL mit del(17p) ohne den Verlust des TP53-Gens waren von dieser interstitiellen Deletion distal des TP53-Lokus betroffen.

Der Nachweis einer Deletionsregion mit einer Größe von 0.8 MB ist mittels Chromosomenbänderung nicht möglich, da erst Alterationen von ca. 20 MB detektiert werden können. Dennoch wurde in den sechs beschriebenen Fällen ein Verlust von 17p mittels Zytogenetik beobachtet. Da in der vorliegenden Arbeit jedoch nur die Region von

TP53 in 17p13.1 bis hin zum Telomer in 17p13.3 detailliert untersucht wurde, ist eine weitere interstitielle Deletion der zentromernahen Banden 17p11 und 17p12 wahrscheinlich.

Die charakterisierte Deletionsregion in Chromosom 17p13.3 mit einer Größe von ca. 0.8 MB wurde von den vier BAC-Klonen RP11-433M14, RP11-4F24, CTD-2545H1 und RP11-667K14 eingegrenzt. In dieser Region liegen drei Kandidatengene (OVCA1, OVCA2 und HIC1), deren tumorsuppressive Rolle sowohl in soliden wie auch in hämatologischen Neoplasien bereits beschrieben werden konnte ^{115,116,170-174}.

OVCA1 („Ovarian cancer-associated gene 1“) und OVCA2 („Ovarian cancer-associated gene 2“) konnten durch positionelle Klonierungen und LOH-Analysen erstmals 1996 beschrieben werden ⁹⁶. Beide Gene werden vom selben genetischen Locus auf Chromosom 17p13.3, unter Verwendung verschiedener Promotoren, exprimiert. Die kodierende Sequenz von OVCA2 besteht aus zwei Exons, wobei ein Exon aus der 3'-untranslatierten Region des OVCA1-Gens hervorgeht. Da OVCA1 und OVCA2 unterschiedliche Leserahmen verwenden, teilen sich die beiden Gene keine proteinkodierenden Informationen ¹⁷⁵.

Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von OVCA1 in kultivierten Ovarialkarzinomzellen mit einer Reduktion des Tumorzellwachstums assoziiert ist ⁹⁶ und dass der Verlust des OVCA1-Gens in knock-out-Mäusen mit einer erhöhten Tumorgenese korreliert ¹⁷⁶, was darauf hindeutet, dass OVCA1 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* tumorsuppressive Eigenschaften aufweist. Im Gegensatz zu OVCA1 konnte die Überexpression von OVCA2 in Ovarialkarzinomzellen nicht mit verminderter Zellproliferation assoziiert werden ¹⁷⁶. Allerdings wurde gezeigt, dass OVCA2 Sequenzhomologien zu α , β -Hydrolasen aufweist, die wiederum bei apoptotischen Vorgängen beteiligt sind ¹⁷⁷.

In unmittelbarer Nachbarschaft zu OVCA1 und OVCA2 ist der Transkriptionsrepressor aus der BTB/POZ-Familie HIC1 („Hypermethylated in cancer 1“) lokalisiert ¹⁷⁸⁻¹⁸⁰. Die Überexpression von HIC1 ist mit einer reduzierten Wachstumsrate von kultivierten Tumorzellen assoziiert, während die Inaktivierung von HIC1 in Mäusen zum beschleunigten Tumorzellwachstum führt, was Rückschlüsse auf eine mögliche Rolle als TSG *in vitro* und *in vivo* ermöglicht ^{95,181}.

Während ein tumorsuppressiver Effekt von OVCA1 bislang nur in kultivierten Ovarialkarzinomzellen nachgewiesen wurde ^{96,174-176}, konnte eine mögliche Inaktivierung von HIC1 auch in Leukämien und malignen Non-Hodgkin Lymphomen des B-Zell-Typs bereits gezeigt werden ^{94,115,116}.

Der genetische Locus von HIC1 auf Chromosom 17p13.3 ist von GC-reichen Sequenzen mit dem Auftreten zahlreicher CpG-Dinukleotide geprägt. Die durch Hypermethylierung verursachte Inaktivierung von HIC1 wurde sowohl in soliden Tumoren, wie auch in akuten myeloischen Leukämien und malignen B-NHL vielfach nachgewiesen ^{115,116,170-174}.

Es war daher naheliegend, dass auch in den hier untersuchten DLBCL eine Inaktivierung von HIC1 durch Deletion mit der Promotermethylierung des zweiten Allels assoziiert war, was in kultivierten Zellen bereits gezeigt werden konnte^{95,182,183}. Mutationen des HIC1-Gens wurden hingegen bislang nicht beschrieben.

Die Analyse der HIC1-Promotermethylierung erfolgte mittels Bisulfit-Behandlung genomischer DNA und anschließender methylierungsspezifischer PCR (MS-PCR)¹¹⁰, die zur qualitativen Untersuchung des Methylierungsstatus bereits vielfach Anwendung fand. Aufgrund der hohen Sensitivität dieser Methode kann selbst ein geringer Anteil von nur 0,1% methylierter DNA in einer Umgebung von unmethylierter Probe noch detektiert werden¹⁸⁴.

Eine Hypermethylierung des HIC1 Exon 1A-Promoters konnte in 61% der Fälle (30/49) nachgewiesen werden, während in Lymphknoten mit reaktiver Lymphadenitis keine HIC1-Promotermethylierung auftrat. Eine 100%ige Methylierung des HIC1-Promoters, vergleichbar mit der Positivkontrolle konnte in keinem der untersuchten DLBCL detektiert werden, was das Vorhandensein normaler, nicht-neoplastischer Zellen im untersuchten Tumormaterial nahe legte. Allerdings konnte bereits mittels FISH gezeigt werden, dass eine HIC1-Deletion nicht in allen untersuchten Zellen auftrat, sondern nur jeweils 20-40% der Zellen betraf. Das parallele Auftreten von methyliertem und unmethyliertem Promoterprodukt in Tumorproben wurde auch in anderen Studien bei der Analyse von Primärmaterial bereits beobachtet^{111,172,185}.

5.7. HIC1 als potentielles Tumorsuppressorgen in DLBCL

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei Deletionen von Chromosom 17p der TP53-Lokus nicht das alleinige Ziel dieser Alteration darstellt. Vielmehr wurde nachgewiesen, dass eine zusätzliche Inaktivierung des TSG HIC1 in der Bande 17p13.3 auftrat. Dass ein Verlust von HIC1 in DLBCL bislang unentdeckt blieb, liegt vermutlich an der Methodenauswahl zur Untersuchung von 17p-Alterationen. So wurden in bisherigen Studien in der Regel Deletionanalysen von Chromosom 17p und immunhistochemische Färbungen von p53-Protein durchgeführt, um Aussagen über die Inaktivierung des TSG TP53 treffen zu können. Obwohl im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass eine p53-Überexpression signifikant mit der Mutation des TP53-Gens korreliert war, konnte der vollständige Inaktivierungsstatus von TP53 in 18% der untersuchten DLBCL (10/55) nur durch zusätzliche Sequenzanalysen von TP53 dargelegt werden. Dabei traten TP53-Mutationen entweder ohne gleichzeitige Überexpression von p53-Protein auf (4/10), oder es lag ein positives p53-Färbemuster ohne die Mutation des TP53-Gens vor (6/10). Insbesondere in fünf 17p-deletierten Fällen konnte eine Überexpression von p53 nachgewiesen werden, wobei das Auftreten einer TP53-Mutation mittels Sequenzanalyse in diesen Fällen nicht bestätigt wurde.

Die detaillierte Untersuchung von 17p-deletierten Fällen, ohne Mutation des zweiten TP53-Allels legt die Vermutung nahe, dass HIC1 zusätzlich zu TP53 ein relevantes Ziel der 17p-Deletion darstellt. So konnte eine Deletion von Chromosom 17p in 34 DLBCL nachgewiesen werden. Während lediglich in 28 der 34 Fälle der TP53-Lokus von der Alteration betroffen war, lag in 33 der 34 17p-deletierten DLBCL eine HIC1-Deletion vor. Die Inaktivierung des zweiten TP53-Allels durch Mutation konnte in 46% der Fälle (13/28) gezeigt werden. Demgegenüber wurde in 64% der HIC1-deletierten DLBCL (22/33) eine Hypermethylierung des HIC1-Promoters nachgewiesen.

Ein weiteres Argument für eine tumorsuppressive Rolle des HIC1-Gens in DLBCL ist das Auftreten einer vollständigen, durch Deletion und Hypermethylierung verursachten, HIC1-Inaktivierung auch in sieben Fällen, die einen Wildtyp TP53-Status aufwiesen.

Interessanterweise wurde beschrieben, dass HIC1 ein direktes Target von p53 darstellt^{95,117,186} und dass HIC1 in einer Feedback-Regulation zur Repression der SIRT1-Deacetylase involviert ist. Dabei wurde gezeigt, dass die Inaktivierung von HIC1 zur Überexpression der SIRT1-Deacetylase führt, zu deren Substrat u.a. p53 zählt. Die Deacetylierung von p53 resultiert in unmittelbarer Ubiquitinierung und Degradierung des Proteins. Somit ist die Aktivität von HIC1 essentiell für die Stabilität von p53¹⁸⁷. Die gestörte Feedback-Regulation von HIC1 und SIRT1 bei einer vollständigen HIC1-Inaktivierung könnte eine mögliche Erklärung für das Auftreten von TP53-Mutationen in vier DLBCL ohne aberrante Expression des p53-Proteins darstellen. Somit würde eine HIC1-Inaktivierung, die in allen vier Fällen vorlag, in der Überexpression der SIRT1-Deacetylase resultieren, die möglicherweise die Degradierung von mutiertem p53-Protein zur Folge hat.

Ein möglicher synergetischer Effekt von TP53 und HIC1 konnte auch im Mausmodell bereits beschrieben werden. Hierbei wurde gezeigt, dass in HIC1/TP53 doppelt heterozygoten Mäusen der Verlust von HIC1 in TP53-alterierten Mäusen mit einer rascheren Tumorbildung und mit einer erhöhten Aggressivität der Tumoren assoziiert ist¹⁸².

In der vorliegenden Arbeit konnte ein ähnlicher Effekt, hinsichtlich der Überlebenszeit der DLBCL Patienten beobachtet werden. Während die durchschnittliche Überlebenszeit von Patienten mit biallelischer TP53-Inaktivierung 26 Monate betrug, war die durchschnittliche Überlebenszeit von Patienten mit gleichzeitiger TP53- und HIC1-Inaktivierung mit sechs Monaten deutlich reduziert, auch wenn nur von wenigen Patienten klinische Daten verfügbar waren.

Die gleichzeitige Inaktivierung von HIC1 und TP53, wie sie im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, sowie die deutlich verkürzte Überlebenszeit der Patienten mit einem Verlust beider TSG, könnte somit in DLBCL signifikante Auswirkungen auf die Progression des Tumors haben. Im Hinblick auf zukünftige risikoadaptierte Therapiestrategien ist eine zuverlässige Abschätzung der Aggressivität des Lymphoms zum

Diagnosezeitpunkt von großer Bedeutung. Ob HIC1 tatsächlich einen prognostischen Faktor in der Pathogenese von DLBCL und möglicherweise auch in anderen Entitäten von B-NHL darstellt, müssen weitere Studien mit größeren Fallzahlen klären.

Obwohl in früheren Studien gezeigt wurde, dass die Methylierung des Exon 1A-Promoters mit einer verminderten HIC1-RNA und -Proteinexpression assoziiert war, muss berücksichtigt werden, dass weitere Promotoren in der 5'-untranslatierten Region die HIC1-Genexpression beeinflussen können. In der vorliegenden Arbeit wurde lediglich der Exon 1a-Promoter des HIC1-Gens analysiert; daher müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um die Auswirkungen der Exon 1A-Hypermethylierung auf die HIC1-Transkription und die -Translation zu analysieren.

5.8. Ausblick

Die Analyse von epigenetischen Alterationen liefert nicht nur Erklärungen für die deregulierte Genexpression von TSG, sondern eröffnet auch neue Möglichkeiten in der Behandlung von Tumorerkrankungen. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Hypermethylierung des DNA-Reparaturgens O⁶MGMT in DLBCL-Patienten, die eine Cyclophosphamid-basierende Chemotherapie erhielten, signifikant mit einer erhöhten Überlebensdauer und einem längeren progressionsfreien Krankheitsverlauf assoziiert war. Die Hypermethylierung von O⁶MGMT führt möglicherweise zu einer gesteigerten Sensitivität der Lymphomzellen gegenüber alkylierenden Agentien, da die durch Chemotherapie induzierten DNA-Schäden durch die Inaktivierung von O⁶MGMT nicht wiederhergestellt werden ¹⁸⁸.

Die Ursachen einer aberranten HIC1-Methylierung sind zwar noch weitestgehend ungeklärt, allerdings konnte eine erhöhte Expression von DNA-Methyltransferasen allgemein mit Leukämien in Verbindung gebracht werden ¹⁸⁹. Insofern bietet die Veränderung des HIC1-Methylierungsstatus die Möglichkeit, neue Therapiestrategien zu entwickeln, um somit die Funktion von HIC1 beispielsweise durch die Inhibierung von DNA-Methyltransferasen zu reaktivieren.

6. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine detaillierte Analyse des Chromosom 17p-Status in DLBCL durchgeführt, welches das TSG TP53 beinhaltet. Eine monoallelische Deletion dieses Gens fand sich in 16% der Patienten (28/172), darüber hinaus lag in 3% (6/172) der Patienten ein Verlust in Chromosom 17p ohne Alteration des TP53-Lokus vor.

Zur Untersuchung des zweiten TP53-Allels wurden an allen 28 Patienten mit sowie an 27 Patienten ohne TP53-Deletion Mutationsanalysen durchgeführt:

- Eine vollständige Inaktivierung des TP53-Gens durch Deletion und Mutation konnte in 46% der 17p-deletierten Fälle (13/28) gezeigt werden.
- In 54% der 17p-deletierten DLBCL (15/28) lag lediglich eine monoallelische TP53-Deletion ohne gleichzeitige Mutation des zweiten Allels vor.
- 26% der DLBCL mit nicht-deletiertem TP53 (7/27) zeigten eine monoallelische Mutation des TP53-Gens.

Diese Ergebnisse deuteten auf weitere TSG in der chromosomalen Region 17p13 hin. Mit der Durchführung einer detaillierten Deletionsanalyse von Chromosom 17p13.1 bis 17p13.3 wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- In insgesamt 41% der DLBCL mit nicht-deletiertem TP53-Gen (11/27) konnte eine minimal deletierte Region identifiziert werden, welche die chromosomale Bande 17p13.3 einschließlich des genetischen Lokus des TSG HIC1 betraf.
- Eine Deletion von TP53 war in allen untersuchten Fällen mit einem subtotalen Verlust des kurzen Armes von 17p einschließlich der o.g. minimal deletierten Region verbunden.

Mehrere Hinweise deuten darauf hin, dass die Inaktivierung von HIC1 eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von DLBCL einnimmt:

- In 55% der untersuchten DLBCL (30/55) wurde eine Hypermethylierung des HIC1-Promoters nachgewiesen.
- In 90% der HIC1-hypermethylierten DLBCL (27/30) lag zudem eine gleichzeitige Deletion des HIC1-Lokus vor, was eine biallelische Inaktivierung des TSG, analog der „two-hit“-Hypothese nach Knudson, nahe legte.
- Eine vollständige durch Hypermethylierung und Deletion verursachte HIC1-Inaktivierung konnte auch in sieben Fällen mit Wildtyp TP53-Status gezeigt werden.
- Die Überlebenszeit von Patienten mit einer gleichzeitigen HIC1- und TP53-Inaktivierung war im Vergleich zu Patienten mit alleiniger Inaktivierung von TP53 deutlich verkürzt.

Es konnte somit gezeigt werden, dass in den untersuchten DLBCL, über die klinisch bedeutsame und prognostisch relevante Inaktivierung von TP53 hinaus, ein weiteres TSG unabhängig von oder in Kombination mit TP53 alteriert ist, und einen Einfluss auf die Überlebenszeit der Patienten hat.

6. Summary

In the present study, a detailed deletion mapping of chromosome 17p, involving the TSG TP53, was performed in DLBCL. A monoallelic deletion of TP53 was identified in 16% DLBCL (28/172). The loss of the chromosomal arm 17p, without affecting the TP53-locus has been shown in 3% DLBCL (6/172).

To investigate the status of the second TP53-allele, mutation analysis was performed in 28 patients with and in 27 patients without harbouring TP53-deletion:

- simultaneous mutation and deletion of TP53 was evident in 46% of 17p-deleted cases (13/28), indicating a complete inactivation of TP53 gene
- a monoallelic deletion of TP53 without mutation of the remaining allele was identified in 54% of 17-deleted DLBCL (15/28)
- in 26% DLBCL with non-deleted TP53 (7/27) a monoallelic TP53-mutation was detected

These findings support for the notion that genomic deletions involving the TP53 locus may not always target TP53 itself and raises the question whether other TSGs may be targeted by deletions in this genomic region. Detailed deletion mapping of the region telomeric to TP53 (17p13.1 to 17p13.3) resulted in the following results:

- a minimal deleted region in band 17p13.3, including the TSG HIC1 was delineated in 41% DLBCL with non-deleted TP53-gene (11/27)
- a TP53-deletion was associated with a subtotal loss of chromosome 17p in all cases, including the above mentioned minimal deleted region

According to these results, several line of evidence suggest a putative tumor suppressive role for HIC1 in DLBCL:

- methylated products of HIC1-promoter were identified in 55% DLBCL (30/55)
- in 90% DLBCL (27/30) HIC1-hypermethylation was associated with deletion of the remaining HIC1-allele, indicating complete inactivation of HIC1, in accordance to Knudson's "two-hit"-hypothesis
- complete inactivation of of HIC1 by both hypermethylation and allelic loss was identified in seven DLBCL with wildtype TP53 status.
- clinical survival data suggest that DLBCL patients with complete inactivation of both TP53 and HIC1 may have an even inferior clinical course than patients with complete inactivation of TP53 alone

In addition to clinical and prognostic relevance of TP53-inactivation, it was elucidated that another TSG in the chromosomal band 17p13.3 is altered independent of or in association with TP53 aberration, potentially influencing patients' survival.

7. Literaturverzeichnis

1. Jaffe, E. et al. *World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues.*, 171-174 (2001).
2. Lennert, K. & Feller, A. Histopathology of Non-Hodgkin's lymphoma (based on the updated Kiel classification). *Springer, Berlin Heidelberg New York* (1992).
3. Fisher, R.I. et al. Comparison of a standard regimen (CHOP) with three intensive chemotherapy regimens for advanced non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* **328**, 1002-6 (1993).
4. Philip, T. et al. Autologous bone marrow transplantation as compared with salvage chemotherapy in relapses of chemotherapy-sensitive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* **333**, 1540-5 (1995).
5. Coiffier, B., Pfreundschuh, M., Stahel, R., Vose, J. & Zinzani, P.L. Aggressive lymphoma: improving treatment outcome with rituximab. *Anticancer Drugs* **13 Suppl 2**, S43-50 (2002).
6. Rosenwald, A. et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* **346**, 1937-47 (2002).
7. Rosenwald, A. et al. Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. *J Exp Med* **198**, 851-62 (2003).
8. Savage, K.J. et al. The molecular signature of mediastinal large B-cell lymphoma differs from that of other diffuse large B-cell lymphomas and shares features with classical Hodgkin lymphoma. *Blood* **102**, 3871-9 (2003).
9. Delhalle, S. et al. An introduction to the molecular mechanisms of apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* **1010**, 1-8 (2003).
10. Sanchez-Beato, M., Sanchez-Aguilera, A. & Piris, M.A. Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas. *Blood* **101**, 1220-35 (2003).
11. Pezzella, F. et al. Expression of the bcl-2 oncogene protein is not specific for the 14;18 chromosomal translocation. *Am J Pathol* **137**, 225-32 (1990).
12. Hockenbery, D.M., Zutter, M., Hickey, W., Nahm, M. & Korsmeyer, S.J. BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 6961-5 (1991).
13. Bea, S. et al. Clinicopathologic significance and prognostic value of chromosomal imbalances in diffuse large B-cell lymphomas. *J Clin Oncol* **22**, 3498-506 (2004).
14. Berglund, M. et al. Chromosomal imbalances in diffuse large B-cell lymphoma detected by comparative genomic hybridization. *Mod Pathol* **15**, 807-16 (2002).

15. Monni, O. et al. BCL2 overexpression associated with chromosomal amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* **90**, 1168-74 (1997).
16. Monni, O., Joensuu, H., Franssila, K. & Knuutila, S. DNA copy number changes in diffuse large B-cell lymphoma--comparative genomic hybridization study. *Blood* **87**, 5269-78 (1996).
17. Rao, P.H. et al. Chromosomal and gene amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* **92**, 234-40 (1998).
18. Weiss, L.M., Warnke, R.A., Sklar, J. & Cleary, M.L. Molecular analysis of the t(14;18) chromosomal translocation in malignant lymphomas. *N Engl J Med* **317**, 1185-9 (1987).
19. Jacobson, J.O. et al. bcl-2 rearrangements in de novo diffuse large cell lymphoma. Association with distinctive clinical features. *Cancer* **72**, 231-6 (1993).
20. Barrans, S.L. et al. The t(14;18) is associated with germinal center-derived diffuse large B-cell lymphoma and is a strong predictor of outcome. *Clin Cancer Res* **9**, 2133-9 (2003).
21. Huang, J.Z. et al. The t(14;18) defines a unique subset of diffuse large B-cell lymphoma with a germinal center B-cell gene expression profile. *Blood* **99**, 2285-90 (2002).
22. Iqbal, J. et al. BCL2 translocation defines a unique tumor subset within the germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Pathol* **165**, 159-66 (2004).
23. Karin, M. & Lin, A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* **3**, 221-7 (2002).
24. Davis, R.E., Brown, K.D., Siebenlist, U. & Staudt, L.M. Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J Exp Med* **194**, 1861-74 (2001).
25. Nigg, E.A. Targets of cyclin-dependent protein kinases. *Curr Opin Cell Biol* **5**, 187-93 (1993).
26. Sherr, C.J. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* **79**, 551-5 (1994).
27. Phan, R.T. & Dalla-Favera, R. The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature* **432**, 635-9 (2004).
28. Shaffer, A.L. et al. BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control. *Immunity* **13**, 199-212 (2000).
29. Bastard, C. et al. LAZ3 rearrangements in non-Hodgkin's lymphoma: correlation with histology, immunophenotype, karyotype, and clinical outcome in 217 patients. *Blood* **83**, 2423-7 (1994).
30. Lo Coco, F. et al. Rearrangements of the BCL6 gene in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* **83**, 1757-9 (1994).

31. Akasaka, H. et al. Molecular anatomy of BCL6 translocations revealed by long-distance polymerase chain reaction-based assays. *Cancer Res* **60**, 2335-41 (2000).
32. Chen, W., Iida, S., Louie, D.C., Dalla-Favera, R. & Chaganti, R.S. Heterologous promoters fused to BCL6 by chromosomal translocations affecting band 3q27 cause its deregulated expression during B-cell differentiation. *Blood* **91**, 603-7 (1998).
33. Pasqualucci, L. et al. Mutations of the BCL6 proto-oncogene disrupt its negative autoregulation in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* **101**, 2914-23 (2003).
34. Cattoretti, G. et al. BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells. *Blood* **86**, 45-53 (1995).
35. Seyfert, V.L., Allman, D., He, Y. & Staudt, L.M. Transcriptional repression by the proto-oncogene BCL-6. *Oncogene* **12**, 2331-42 (1996).
36. Lossos, I.S. Molecular pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* **23**, 6351-7 (2005).
37. Kramer, M.H. et al. Clinical relevance of BCL2, BCL6, and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* **92**, 3152-62 (1998).
38. Ladanyi, M., Offit, K., Jhanwar, S.C., Filippa, D.A. & Chaganti, R.S. MYC rearrangement and translocations involving band 8q24 in diffuse large cell lymphomas. *Blood* **77**, 1057-63 (1991).
39. Vitolo, U. et al. Rearrangements of bcl-6, bcl-2, c-myc and 6q deletion in B-diffuse large-cell lymphoma: clinical relevance in 71 patients. *Ann Oncol* **9**, 55-61 (1998).
40. Fritsche, M., Haessler, C. & Brandner, G. Induction of nuclear accumulation of the tumor-suppressor protein p53 by DNA-damaging agents. *Oncogene* **8**, 307-18 (1993).
41. Hall, P.A., McKee, P.H., Menage, H.D., Dover, R. & Lane, D.P. High levels of p53 protein in UV-irradiated normal human skin. *Oncogene* **8**, 203-7 (1993).
42. Jin, S. & Levine, A.J. The p53 functional circuit. *J Cell Sci* **114**, 4139-40 (2001).
43. Bode, A.M. & Dong, Z. Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* **4**, 793-805 (2004).
44. Chehab, N.H., Malikzay, A., Stavridi, E.S. & Halazonetis, T.D. Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13777-82 (1999).
45. Saito, S. et al. ATM mediates phosphorylation at multiple p53 sites, including Ser(46), in response to ionizing radiation. *J Biol Chem* **277**, 12491-4 (2002).
46. Sherr, C.J. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res* **60**, 3689-95 (2000).
47. Miyashita, T. & Reed, J.C. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* **80**, 293-9 (1995).

48. McCurrach, M.E., Connor, T.M., Knudson, C.M., Korsmeyer, S.J. & Lowe, S.W. bax-deficiency promotes drug resistance and oncogenic transformation by attenuating p53-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 2345-9 (1997).
49. Yin, C., Knudson, C.M., Korsmeyer, S.J. & Van Dyke, T. Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo. *Nature* **385**, 637-40 (1997).
50. Jurgensmeier, J.M. et al. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 4997-5002 (1998).
51. Barak, Y., Juven, T., Haffner, R. & Oren, M. mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *Embo J* **12**, 461-8 (1993).
52. Wu, X., Bayle, J.H., Olson, D. & Levine, A.J. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev* **7**, 1126-32 (1993).
53. Momand, J., Zambetti, G.P., Olson, D.C., George, D. & Levine, A.J. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* **69**, 1237-45 (1992).
54. Honda, R., Tanaka, H. & Yasuda, H. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett* **420**, 25-7 (1997).
55. Kamijo, T. et al. Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8292-7 (1998).
56. Pomerantz, J. et al. The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* **92**, 713-23 (1998).
57. Zhang, Y., Xiong, Y. & Yarbrough, W.G. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell* **92**, 725-34 (1998).
58. Sui, G. et al. Yin Yang 1 is a negative regulator of p53. *Cell* **117**, 859-72 (2004).
59. Knudson, A.G., Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**, 820-3 (1971).
60. Vogelstein, B. et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* **319**, 525-32 (1988).
61. Mackay, J., Steel, C.M., Elder, P.A., Forrest, A.P. & Evans, H.J. Allele loss on short arm of chromosome 17 in breast cancers. *Lancet* **2**, 1384-5 (1988).
62. Baker, S.J. et al. p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* **50**, 7717-22 (1990).
63. Baker, S.J. et al. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* **244**, 217-21 (1989).
64. Offit, K., Jhanwar, S.C., Ladanyi, M., Filippa, D.A. & Chaganti, R.S. Cytogenetic analysis of 434 consecutively ascertained specimens of non-Hodgkin's lymphoma:

- correlations between recurrent aberrations, histology, and exposure to cytotoxic treatment. *Genes Chromosomes Cancer* **3**, 189-201 (1991).
65. Clodi, K. et al. Analysis of p53 gene deletions in patients with non-Hodgkin's lymphoma by dual-colour fluorescence in-situ hybridization. *Br J Haematol* **98**, 913-21 (1997).
 66. Greiner, T.C. et al. p53 mutations in mantle cell lymphoma are associated with variant cytology and predict a poor prognosis. *Blood* **87**, 4302-10 (1996).
 67. Hernandez, L. et al. p53 gene mutations and protein overexpression are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas. *Blood* **87**, 3351-9 (1996).
 68. Ichikawa, A. et al. Mutations of the p53 gene as a prognostic factor in aggressive B-cell lymphoma. *N Engl J Med* **337**, 529-34 (1997).
 69. Ichikawa, A. et al. Mutations of p53 gene and their relation to disease progression in B-cell lymphoma. *Blood* **79**, 2701-7 (1992).
 70. Lo Coco, F. et al. p53 mutations are associated with histologic transformation of follicular lymphoma. *Blood* **82**, 2289-95 (1993).
 71. Sander, C.A. et al. p53 mutation is associated with progression in follicular lymphomas. *Blood* **82**, 1994-2004 (1993).
 72. Villuendas, R. et al. p21WAF1/CIP1 and MDM2 expression in non-Hodgkin's lymphoma and their relationship to p53 status: a p53+, MDM2-, p21-immunophenotype associated with missense p53 mutations. *J Pathol* **181**, 51-61 (1997).
 73. Koduru, P.R. et al. Correlation between mutation in P53, p53 expression, cytogenetics, histologic type, and survival in patients with B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* **90**, 4078-91 (1997).
 74. Bea, S. et al. Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene-expression-based survival prediction. *Blood* **106**, 3183-90 (2005).
 75. Stokke, T. et al. Loss of chromosome 11q21-23.1 and 17p and gain of chromosome 6p are independent prognostic indicators in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Cancer* **85**, 1900-13 (2001).
 76. Tagawa, H. et al. Comparison of genome profiles for identification of distinct subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* **106**, 1770-7 (2005).
 77. Rinaldi, A. et al. Comparative genome-wide profiling of post-transplant lymphoproliferative disorders and diffuse large B-cell lymphomas. *Br J Haematol* **134**, 27-36 (2006).
 78. Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. & Harris, C.C. p53 mutations in human cancers. *Science* **253**, 49-53 (1991).

79. Harris, C.C. The 1995 Walter Hubert Lecture--molecular epidemiology of human cancer: insights from the mutational analysis of the p53 tumour-suppressor gene. *Br J Cancer* **73**, 261-9 (1996).
80. Levine, A.J. et al. The 1993 Walter Hubert Lecture: the role of the p53 tumour-suppressor gene in tumorigenesis. *Br J Cancer* **69**, 409-16 (1994).
81. Bartek, J. et al. Immunohistochemical analysis of the p53 oncoprotein on paraffin sections using a series of novel monoclonal antibodies. *J Pathol* **169**, 27-34 (1993).
82. Toledo, F. & Wahl, G.M. Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer* **6**, 909-23 (2006).
83. Momand, J., Jung, D., Wilczynski, S. & Niland, J. The MDM2 gene amplification database. *Nucleic Acids Res* **26**, 3453-9 (1998).
84. Moller, M.B., Nielsen, O. & Pedersen, N.T. Oncoprotein MDM2 overexpression is associated with poor prognosis in distinct non-Hodgkin's lymphoma entities. *Mod Pathol* **12**, 1010-6 (1999).
85. Friedman, P.N., Chen, X., Bargonetti, J. & Prives, C. The p53 protein is an unusually shaped tetramer that binds directly to DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 3319-23 (1993).
86. Camacho, E. et al. ATM gene inactivation in mantle cell lymphoma mainly occurs by truncating mutations and missense mutations involving the phosphatidylinositol-3 kinase domain and is associated with increasing numbers of chromosomal imbalances. *Blood* **99**, 238-44 (2002).
87. Tort, F. et al. CHK2-decreased protein expression and infrequent genetic alterations mainly occur in aggressive types of non-Hodgkin lymphomas. *Blood* **100**, 4602-8 (2002).
88. Erkeland, S.J. et al. The gene encoding the transcriptional regulator Yin Yang 1 (YY1) is a myeloid transforming gene interfering with neutrophilic differentiation. *Blood* **101**, 1111-7 (2003).
89. Phillips, N.J. et al. Allelic deletion on chromosome 17p13.3 in early ovarian cancer. *Cancer Res* **56**, 606-11 (1996).
90. Risio, M., Casorzo, L., Chiecchio, L., De Rosa, G. & Rossini, F.P. Deletions of 17p are associated with transition from early to advanced colorectal cancer. *Cancer Genet Cytogenet* **147**, 44-9 (2003).
91. Seitz, S. et al. Detailed deletion mapping in sporadic breast cancer at chromosomal region 17p13 distal to the TP53 gene: association with clinicopathological parameters. *J Pathol* **194**, 318-26 (2001).

92. Saxena, A. et al. Evidence for the involvement of a potential second tumor suppressor gene on chromosome 17 distinct from p53 in malignant astrocytomas. *Cancer Res* **52**, 6716-21 (1992).
93. Konishi, H. et al. Detailed deletion mapping suggests the involvement of a tumor suppressor gene at 17p13.3, distal to p53, in the pathogenesis of lung cancers. *Oncogene* **17**, 2095-100 (1998).
94. Sankar, M. et al. Identification of a commonly deleted region at 17p13.3 in leukemia and lymphoma associated with 17p abnormality. *Leukemia* **12**, 510-6 (1998).
95. Wales, M.M. et al. p53 activates expression of HIC-1, a new candidate tumour suppressor gene on 17p13.3. *Nat Med* **1**, 570-7 (1995).
96. Schultz, D.C. et al. Identification of two candidate tumor suppressor genes on chromosome 17p13.3. *Cancer Res* **56**, 1997-2002 (1996).
97. Cvekl, A., Jr., Zavadil, J., Birshtein, B.K., Grotzer, M.A. & Cvekl, A. Analysis of transcripts from 17p13.3 in medulloblastoma suggests ROX/MNT as a potential tumour suppressor gene. *Eur J Cancer* **40**, 2525-32 (2004).
98. Konishi, H. et al. Detailed characterization of a homozygously deleted region corresponding to a candidate tumor suppressor locus at distal 17p13.3 in human lung cancer. *Oncogene* **22**, 1892-905 (2003).
99. Chong, S.S., Tanigami, A., Roschke, A.V. & Ledbetter, D.H. 14-3-3 epsilon has no homology to LIS1 and lies telomeric to it on chromosome 17p13.3 outside the Miller-Dieker syndrome chromosome region. *Genome Res* **6**, 735-41 (1996).
100. Flaman, J.M. et al. A simple p53 functional assay for screening cell lines, blood, and tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 3963-7 (1995).
101. Ishioka, C. et al. Screening patients for heterozygous p53 mutations using a functional assay in yeast. *Nat Genet* **5**, 124-9 (1993).
102. Hans, C.P. et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* **103**, 275-82 (2004).
103. Birnboim, H.C. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol* **100**, 243-55 (1983).
104. Birnboim, H.C. & Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-23 (1979).
105. Rigby, P.W., Dieckmann, M., Rhodes, C. & Berg, P. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol* **113**, 237-51 (1977).

106. Bond, G.L. et al. A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell* **119**, 591-602 (2004).
107. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-7 (1977).
108. Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. & Watson, R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* **11**, 1026-30 (1993).
109. Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J. & Williams, P.M. Real time quantitative PCR. *Genome Res* **6**, 986-94 (1996).
110. Herman, J.G., Graff, J.R., Myohanen, S., Nelkin, B.D. & Baylin, S.B. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 9821-6 (1996).
111. Dong, S.M., Kim, H.S., Rha, S.H. & Sidransky, D. Promoter hypermethylation of multiple genes in carcinoma of the uterine cervix. *Clin Cancer Res* **7**, 1982-6 (2001).
112. Chomczynski, P. & Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-9 (1987).
113. Waridel, F. et al. Field cancerisation and polyclonal p53 mutation in the upper aerodigestive tract. *Oncogene* **14**, 163-9 (1997).
114. Smardova, J., Pavlova, S. & Koukalova, H. Determination of optimal conditions for analysis of p53 status in leukemic cells using functional analysis of separated alleles in yeast. *Pathol Oncol Res* **8**, 245-51 (2002).
115. Issa, J.P., Zehnbauser, B.A., Kaufmann, S.H., Biel, M.A. & Baylin, S.B. HIC1 hypermethylation is a late event in hematopoietic neoplasms. *Cancer Res* **57**, 1678-81 (1997).
116. Melki, J.R., Vincent, P.C. & Clark, S.J. Concurrent DNA hypermethylation of multiple genes in acute myeloid leukemia. *Cancer Res* **59**, 3730-40 (1999).
117. Britschgi, C. et al. Identification of the p53 family-responsive element in the promoter region of the tumor suppressor gene hypermethylated in cancer 1. *Oncogene* **25**, 2030-9 (2006).
118. Imamura, J., Miyoshi, I. & Koeffler, H.P. p53 in hematologic malignancies. *Blood* **84**, 2412-21 (1994).
119. Stokke, T. et al. Oncogenic aberrations in the p53 pathway are associated with a high S phase fraction and poor patient survival in B-cell Non-Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer* **89**, 313-24 (2000).
120. Villuendas, R. et al. The expression of p53 protein in non-Hodgkin's lymphomas is not always dependent on p53 gene mutations. *Blood* **82**, 3151-6 (1993).

121. Kocialkowski, S. et al. Mutations in the p53 gene are not limited to classic 'hot spots' and are not predictive of p53 protein expression in high-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol* **89**, 55-60 (1995).
122. Barnard, R., Futo, V., Pecheniuk, N., Slattery, M. & Walsh, T. PCR bias toward the wild-type k-ras and p53 sequences: implications for PCR detection of mutations and cancer diagnosis. *Biotechniques* **25**, 684-91 (1998).
123. Liu, Q., Thorland, E.C. & Sommer, S.S. Inhibition of PCR amplification by a point mutation downstream of a primer. *Biotechniques* **22**, 292-4, 296, 298, passim (1997).
124. Duddy, P.M., Hanby, A.M., Barnes, D.M. & Camplejohn, R.S. Improving the detection of p53 mutations in breast cancer by use of the FASAY, a functional assay. *J Mol Diagn* **2**, 139-44 (2000).
125. Meinhold-Heerlein, I. et al. Evaluation of methods to detect p53 mutations in ovarian cancer. *Oncology* **60**, 176-88 (2001).
126. Nenutil, R. et al. Discriminating functional and non-functional p53 in human tumours by p53 and MDM2 immunohistochemistry. *J Pathol* **207**, 251-9 (2005).
127. Milner, J. & Medcalf, E.A. Cotranslation of activated mutant p53 with wild type drives the wild-type p53 protein into the mutant conformation. *Cell* **65**, 765-74 (1991).
128. Milner, J., Medcalf, E.A. & Cook, A.C. Tumor suppressor p53: analysis of wild-type and mutant p53 complexes. *Mol Cell Biol* **11**, 12-9 (1991).
129. Kern, S.E. et al. Oncogenic forms of p53 inhibit p53-regulated gene expression. *Science* **256**, 827-30 (1992).
130. de Vries, A. et al. Targeted point mutations of p53 lead to dominant-negative inhibition of wild-type p53 function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 2948-53 (2002).
131. Friedlander, P., Haupt, Y., Prives, C. & Oren, M. A mutant p53 that discriminates between p53-responsive genes cannot induce apoptosis. *Mol Cell Biol* **16**, 4961-71 (1996).
132. Ryan, K.M. & Vousden, K.H. Characterization of structural p53 mutants which show selective defects in apoptosis but not cell cycle arrest. *Mol Cell Biol* **18**, 3692-8 (1998).
133. Davis, P. et al. Dominance of wild-type p53-mediated transcriptional activation in breast epithelial cells. *Oncogene* **13**, 1315-22 (1996).
134. Park, D.J. et al. Transactivational and DNA binding abilities of endogenous p53 in p53 mutant cell lines. *Oncogene* **9**, 1899-906 (1994).
135. Sun, Y., Dong, Z., Nakamura, K. & Colburn, N.H. Dosage-dependent dominance over wild-type p53 of a mutant p53 isolated from nasopharyngeal carcinoma. *Faseb J* **7**, 944-50 (1993).

136. Williams, A.C. et al. Mutant p53 is not fully dominant over endogenous wild type p53 in a colorectal adenoma cell line as demonstrated by induction of MDM2 protein and retention of a p53 dependent G1 arrest after gamma irradiation. *Oncogene* **11**, 141-9 (1995).
137. Martinez-Delgado, B. et al. Correlation between mutations in p53 gene and protein expression in human lymphomas. *Am J Hematol* **55**, 1-8 (1997).
138. Wynford-Thomas, D. P53 in tumour pathology: can we trust immunocytochemistry? *J Pathol* **166**, 329-30 (1992).
139. Vogelstein, B., Lane, D. & Levine, A.J. Surfing the p53 network. *Nature* **408**, 307-10 (2000).
140. Prives, C. & Hall, P.A. The p53 pathway. *J Pathol* **187**, 112-26 (1999).
141. Hartmann, E. et al. Increased MDM2 expression is associated with inferior survival in mantle cell lymphoma, but not related to the MDM2 SNP309. *Haematologica* **92**, 574-5 (2007).
142. Kononen, J. et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* **4**, 844-7 (1998).
143. Kawamata, N. et al. mdm-2 oncogene expression in non-Hodgkin's lymphomas. *Diagn Mol Pathol* **5**, 33-8 (1996).
144. Watanabe, T. et al. The MDM2 oncogene overexpression in chronic lymphocytic leukemia and low-grade lymphoma of B-cell origin. *Blood* **84**, 3158-65 (1994).
145. Gronroos, E., Terentiev, A.A., Punga, T. & Ericsson, J. YY1 inhibits the activation of the p53 tumor suppressor in response to genotoxic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 12165-70 (2004).
146. Bartek, J., Falck, J. & Lukas, J. CHK2 kinase--a busy messenger. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 877-86 (2001).
147. Hirao, A. et al. DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science* **287**, 1824-7 (2000).
148. Ahn, J., Urist, M. & Prives, C. Questioning the role of checkpoint kinase 2 in the p53 DNA damage response. *J Biol Chem* **278**, 20480-9 (2003).
149. Jallepalli, P.V., Lengauer, C., Vogelstein, B. & Bunz, F. The Chk2 tumor suppressor is not required for p53 responses in human cancer cells. *J Biol Chem* **278**, 20475-9 (2003).
150. Dornan, D. et al. The ubiquitin ligase COP1 is a critical negative regulator of p53. *Nature* **429**, 86-92 (2004).
151. Dornan, D. et al. COP1, the negative regulator of p53, is overexpressed in breast and ovarian adenocarcinomas. *Cancer Res* **64**, 7226-30 (2004).

152. Leng, R.P. et al. Pirh2, a p53-induced ubiquitin-protein ligase, promotes p53 degradation. *Cell* **112**, 779-91 (2003).
153. Luo, J. et al. Acetylation of p53 augments its site-specific DNA binding both in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 2259-64 (2004).
154. Shvarts, A. et al. MDMX: a novel p53-binding protein with some functional properties of MDM2. *Embo J* **15**, 5349-57 (1996).
155. Vaziri, H. et al. hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* **107**, 149-59 (2001).
156. Qu, L. et al. Endoplasmic reticulum stress induces p53 cytoplasmic localization and prevents p53-dependent apoptosis by a pathway involving glycogen synthase kinase-3beta. *Genes Dev* **18**, 261-77 (2004).
157. Masuya, D. et al. The HAUSP gene plays an important role in non-small cell lung carcinogenesis through p53-dependent pathways. *J Pathol* **208**, 724-32 (2006).
158. Herman, J.G., Jen, J., Merlo, A. & Baylin, S.B. Hypermethylation-associated inactivation indicates a tumor suppressor role for p15INK4B. *Cancer Res* **56**, 722-7 (1996).
159. Agirre, X. et al. Methylation of CpG dinucleotides and/or CCWGG motifs at the promoter of TP53 correlates with decreased gene expression in a subset of acute lymphoblastic leukemia patients. *Oncogene* **22**, 1070-2 (2003).
160. Agirre, X. et al. TP53 is frequently altered by methylation, mutation, and/or deletion in acute lymphoblastic leukaemia. *Mol Carcinog* **38**, 201-8 (2003).
161. Stoffel, A., Filippa, D. & Rao, P.H. The p73 locus is commonly deleted in non-Hodgkin's lymphomas. *Leuk Res* **28**, 1341-5 (2004).
162. De Laurenzi, V. et al. Two new p73 splice variants, gamma and delta, with different transcriptional activity. *J Exp Med* **188**, 1763-8 (1998).
163. Zaika, A.I. et al. DeltaNp73, a dominant-negative inhibitor of wild-type p53 and TAp73, is up-regulated in human tumors. *J Exp Med* **196**, 765-80 (2002).
164. Tokuchi, Y. et al. The expression of p73 is increased in lung cancer, independent of p53 gene alteration. *Br J Cancer* **80**, 1623-9 (1999).
165. Douc-Rasy, S. et al. DeltaN-p73alpha accumulates in human neuroblastic tumors. *Am J Pathol* **160**, 631-9 (2002).
166. Cuadros, M. et al. Allelic expression and quantitative RT-PCR study of TAp73 and DeltaNp73 in non-Hodgkin's lymphomas. *Leuk Res* **30**, 170-7 (2006).
167. Moll, U.M. & Slade, N. p63 and p73: roles in development and tumor formation. *Mol Cancer Res* **2**, 371-86 (2004).

168. Concin, N. et al. Transdominant DeltaTAp73 isoforms are frequently up-regulated in ovarian cancer. Evidence for their role as epigenetic p53 inhibitors in vivo. *Cancer Res* **64**, 2449-60 (2004).
169. Dohner, H. et al. p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood* **85**, 1580-9 (1995).
170. Nicoll, G. et al. Expression of the Hypermethylated in Cancer gene (HIC-1) is associated with good outcome in human breast cancer. *Br J Cancer* **85**, 1878-82 (2001).
171. Fujii, H. et al. Methylation of the HIC-1 candidate tumor suppressor gene in human breast cancer. *Oncogene* **16**, 2159-64 (1998).
172. Waha, A. et al. Analysis of HIC-1 methylation and transcription in human ependymomas. *Int J Cancer* **110**, 542-9 (2004).
173. Ahuja, N. et al. Association between CpG island methylation and microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* **57**, 3370-4 (1997).
174. Bruening, W. et al. Expression of OVCA1, a candidate tumor suppressor, is reduced in tumors and inhibits growth of ovarian cancer cells. *Cancer Res* **59**, 4973-83 (1999).
175. Chen, C.M. & Behringer, R.R. Cloning, structure, and expression of the mouse Ovca1 gene. *Biochem Biophys Res Commun* **286**, 1019-26 (2001).
176. Chen, C.M. & Behringer, R.R. Ovca1 regulates cell proliferation, embryonic development, and tumorigenesis. *Genes Dev* **18**, 320-32 (2004).
177. Prowse, A.H. et al. OVCA2 is downregulated and degraded during retinoid-induced apoptosis. *Int J Cancer* **99**, 185-92 (2002).
178. Pinte, S. et al. The tumor suppressor gene HIC1 (hypermethylated in cancer 1) is a sequence-specific transcriptional repressor: definition of its consensus binding sequence and analysis of its DNA binding and repressive properties. *J Biol Chem* **279**, 38313-24 (2004).
179. Deltour, S., Guerardel, C. & Leprince, D. Recruitment of SMRT/N-CoR-mSin3A-HDAC-repressing complexes is not a general mechanism for BTB/POZ transcriptional repressors: the case of HIC-1 and gammaFBP-B. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14831-6 (1999).
180. Deltour, S., Pinte, S., Guerardel, C., Wasyluk, B. & Leprince, D. The human candidate tumor suppressor gene HIC1 recruits CtBP through a degenerate GLDLSKK motif. *Mol Cell Biol* **22**, 4890-901 (2002).
181. Chen, W.Y. et al. Heterozygous disruption of *Hic1* predisposes mice to a gender-dependent spectrum of malignant tumors. *Nat Genet* **33**, 197-202 (2003).
182. Chen, W. et al. Epigenetic and genetic loss of *Hic1* function accentuates the role of p53 in tumorigenesis. *Cancer Cell* **6**, 387-98 (2004).

183. Makos, M. et al. DNA hypermethylation is associated with 17p allelic loss in neural tumors. *Cancer Res* **53**, 2715-8 (1993).
184. Galm, O., Herman, J.G. & Baylin, S.B. The fundamental role of epigenetics in hematopoietic malignancies. *Blood Rev* **20**, 1-13 (2006).
185. Rathi, A. et al. Aberrant methylation of the HIC1 promoter is a frequent event in specific pediatric neoplasms. *Clin Cancer Res* **9**, 3674-8 (2003).
186. Guerardel, C. et al. Identification in the human candidate tumor suppressor gene HIC-1 of a new major alternative TATA-less promoter positively regulated by p53. *J Biol Chem* **276**, 3078-89 (2001).
187. Chen, W.Y. et al. Tumor suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-dependent DNA-damage responses. *Cell* **123**, 437-48 (2005).
188. Esteller, M. et al. Hypermethylation of the DNA repair gene O(6)-methylguanine DNA methyltransferase and survival of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J Natl Cancer Inst* **94**, 26-32 (2002).
189. Melki, J.R., Warnecke, P., Vincent, P.C. & Clark, S.J. Increased DNA methyltransferase expression in leukaemia. *Leukemia* **12**, 311-6 (1998).
190. Pavlova, S., Mayer, J., Koukalova, H. & Smardova, J. High frequency of temperature-sensitive mutations of p53 tumor suppressor in acute myeloid leukemia revealed by functional assay in yeast. *Int J Oncol* **23**, 121-31 (2003).

8. Anhang

Tabelle 1: Übersicht über den TP53- und HIC1-Status in diffusen großzelligen B-Zell Lymphomen

Fall	Kopienzahl 17p (Zytogenetik)	Kopienzahl TP53 (FISH)	p53 Protein (in % Zellen)	TP53 Mutation (FASAY)	TP53 Mutation (Sequenzanalyse)	TP53 Mutation	TP53 Status	Kopienzahl RP11-433M14	Kopienzahl HIC1 (FISH)	HIC1-Deletion qPCR	HIC1 Methylierung	HIC1 Status	Überleben (Monate)
1	2	2	0	Nein	Nein		+/+	n.a.	2	n.a.	Nein	+/+	162
2	2	2	0	Nein	Nein		+/+	2	2	Nein	Nein	+/+	5
3	2	2	0	Nein	Nein		+/+	2	2	Nein	Ja	+/-	1
4	2	2	5	Nein	Nein		+/+	1	1	Ja	Ja	-/-	126
5	2	2	10	Nein	Nein		+/+	1	1	Ja	Ja	-/-	
6	2	2	10	Nein	Nein		+/+	2	2	n.a.	Ja	+/-	58
7	2	2	10	Nein	Nein		+/+	1	n.a.	Ja	Nein	+/-	24
8	2	2	10		Nein		+/+	1	1	Ja	Ja	-/-	
9	2	2	10	Nein	Nein		+/+	2	2	n.a.	Nein	+/+	76
10	2	2	10		Nein		+/+	2	2	n.a.	n.a.	n.a.	32
11	2	2	10	Nein	Nein		+/+	1	1	Ja	Ja	-/-	14
12	2	2	10		Nein		+/+	2	2	n.a.	n.a.	n.a.	90
13	2	2	15		Nein		+/+	2	2	n.a.	Nein	+/+	91
14	2	2	0		Nein		+/+	2	2	n.a.	Nein	+/+	51
15	2	2	0		Nein		+/+	n.a.	n.a.	n.a.	Nein	+/+	76
16	2	2	0	Nein	Nein		+/+	2	2	n.a.	Nein	+/+	40
17	2	2	10	Nein	Nein		+/+	1	1	Ja	Ja	-/-	8
18	2	2	20		Nein		+/+	2	2	n.a.	n.a.	n.a.	20
19	1	2	15	Nein	Nein		+/+	1	n.a.	Ja	Ja	-/-	
20	1	2	0	Nein	Nein		+/+	1	1	Ja	Ja	-/-	
21	2	2	20	Ja	Nein	D324Y	+/-	2	2	Nein	Ja	+/-	85
22	2	2	75	Ja	Ja	I232S	+/-	2	2	Nein	Nein	+/+	7
23	2	2	90	Ja	Ja	R249M	+/-	n.a.	n.a.	Ja	Ja	-/-	
24	1	2	10	Ja	Nein	n.a.	+/-	1	1	Ja	Ja	-/-	
25	1	2	10	Ja	Nein	n.a.	+/-	1	1	Ja	Ja	-/-	
26	1	2	80	Ja	Nein	n.a.	+/-	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	3

Anhang

Fall	Kopienzahl 17p (Zytogenetik)	Kopienzahl TP53 (FISH)	p53 Protein (in % Zellen)	TP53 Mutation (FASAY)	TP53 Mutation (Sequenz- analyse)	TP53 Mutation	TP53 Status	Kopienzahl RP11- 433M14	Kopienzahl HIC1 (FISH)	HIC1- Deletion qPCR	HIC1 Methylierung	HIC1 Status	Überleben (Monate)
27	1	2	100	Ja	Ja	C176W	+/-	1	1	Ja	Ja	-/-	
28	1	1	0	Nein	Nein		+/-	1	1	n.a.	Ja	-/-	113
29	1	1	0	Nein	Nein		+/-	1	1	n.a.	Nein	+/-	19
30	1	1	5	Nein	Nein		+/-	2	1	Ja	Ja	-/-	
31	1	1	10		Nein		+/-	1	1	n.a.	n.a.	n.a.	7
32	1	1	10		Nein		+/-	2	1	n.a.	Nein	+/-	14
33	1	1	10	Nein	Nein		+/-	1	1	n.a.	Ja	-/-	1
34	1	1	10	Nein	Nein		+/-	1	1	n.a.	Ja	-/-	13
35	1	1	10		Nein		+/-	2	1	Ja	Ja	-/-	121
36	1	1	10	Nein	Nein		+/-	1	1	Ja	Ja	-/-	
37	1	1	10	Nein	Nein		+/-	2	1	Ja	Nein	+/-	1
38	1	1	20		Nein		+/-	2	1	Ja	Nein	+/-	100
39	1	1	20	Nein	Nein		+/-	1	1	n.a.	Ja	-/-	52
40	1	1	30	Nein	Nein		+/-	1	1	n.a.	Ja	-/-	71
41	1	1	30	Nein	Nein		+/-	1	1	Ja	Nein	+/-	127
42	1	1	30		Nein		+/-	1	1	n.a.	Nein	+/-	36
43	1	1	30		Ja	G266E	-/-	1	1	n.a.	Ja	-/-	5
44	1	1	40	Ja	Ja	G266E	-/-	1	1	n.a.	Ja	-/-	
45	1	1	50	Ja	Nein	del(125-131)	-/-	1	1	n.a.	Ja	-/-	1
46	1	1	50	Ja	Ja	H179R	-/-	1	1	n.a.	Ja	-/-	5
47	1	1	50		Ja	R248W	-/-	1	1	n.a.	Nein	+/-	5
48	1	1	60	Ja	Nein	del(189)	-/-	1	1	n.a.	Nein	+/-	
49	1	1	80		Ja	V173M	-/-	1	1	n.a.	Ja	-/-	12
50	1	1	80	Ja	Ja	R282W	-/-	1	1	n.a.	n.a.	n.a.	19
51	1	1	80	Ja	Ja	Y205C	-/-	1	1	n.a.	Ja	-/-	
52	1	1	100	Ja	Nein	L344R	-/-	1	1	n.a.	Nein	+/-	144
53	1	1	0	Ja	Nein	A159V	-/-	1	1	n.a.	Ja	-/-	
54	1	1	25		Ja	R181H	-/-	1	1	n.a.	Nein	+/-	13
55	1	1	0	Ja	Nein	A159V	-/-	1	1	n.a.	Ja	-/-	

Tab. 1: Übersicht über den TP53- und HIC1-Status in DLBCL (Kopienzahl 2: normal, Kopienzahl 1: deletiert; n.a.: nicht analysiert).

Tabelle 2: Übersicht über BAC- und PAC-Klone aus der Chromosom 17p-Contig-Region NT-010718 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/clone>)

Bezeichnung	Accesion-Nummer	Klon	Antibiotikum-Resistenz
RP5-1029F21	AC015853	PAC (human)	Kanamycin
RP11-818O24	AC032044	BAC (human)	Chloramphenicol
CTD-2231E3	AC100748	BAC (human)	Chloramphenicol
RP11-433M14	AC068936 / AC126406	BAC (human)	Chloramphenicol
RP11-961A15	AC130343	BAC (human)	Chloramphenicol
RP11-4F24	AC007873	BAC (human)	Chloramphenicol
CTD-2545H1	AC099684	BAC (human)	Chloramphenicol
RP11-667K14	AC090617	BAC (human)	Chloramphenicol
RP4-765O5	AL137038	PAC (human)	Kanamycin
RP11-431C14	AQ555034 / AQ555037	BAC (human)	Chloramphenicol
RP11-357O7	AZ254624 / AZ254625	BAC (human)	Chloramphenicol
RP11-74E22	AC005696	BAC (human)	Chloramphenicol
CTB-11O23	AC002316	BAC (human)	Chloramphenicol
CTD-3060P21	AC015921	BAC (human)	Chloramphenicol
CTD-2513A7	AC097370	BAC (human)	Chloramphenicol
CTD-2309O5	AC090282	BAC (human)	Chloramphenicol
RP11-64J4	AC087498	BAC (human)	Chloramphenicol
RP11-147K14	AC025125	BAC (human)	Chloramphenicol
RP11-208J12	AQ419404 / AZ519259	BAC (human)	Chloramphenicol
RP11-545O6	AZ254609 / AZ254610	BAC (human)	Chloramphenicol
RP11-167N20	AC005940	BAC (human)	Chloramphenicol
RP11-314A20	AC091153	BAC (human)	Chloramphenicol
RP11-333E1	AC087500	BAC (human)	Chloramphenicol
RP11-199F11	AC087388	BAC (human)	Chloramphenicol
RP11-1030A12	AC007732	PAC (human)	Kanamycin
RP11-1030O14	AC007421	PAC (human)	Kanamycin

Tabelle 3: Übersicht über die STS („Short Tagged Sequence“) Oligonukleotide zur Verifizierung der BAC- und PAC-Klone mittels STS-PCR

Bezeichnung	STS-Primer For	STS-Primer Rev
RP5-1029F21	TTTATTTTAAACATCTCATATTGCC	ACTTTCCAATTGTGTTTCAAAGA
RP11-818O24	TGATGCAAGCATCTAAGAGAGA	AGTCCCTCCCCAAACCAC
CTD-2231E3	CCTGTGGAAAACCGATGG	CTTCACGGGGGTGGAAC
RP11-433M14	CCTTCAGGAGCGGAATGAACT	ACCGCTGGAAGTAGGCCAG
RP11-961A15	GGTCTGGCTGTGGAAGGATGTGT	TCATGGATGGGGAACTGAGACT
RP11-4F24	ATATTCTTTGGTTGTGAATCCTA	AATCTTCGGGTTTATAATGAGTT
CTD-2545H1	GCGCTCTCCGCGTTCTTCCAG	CTGGAGGGCGCAGCGTTCC
RP11-667K14	AGCTCGGTGGCTACTACTTCC	CTTATCAGTTGGGTTTTTCAGCC
RP4-765O5	ACCCTTCTTTCCCAAGAGGA	GGAATCAAGACCACCTTGTGA
RP11-431C14	ACCCTTCTTTCCCAAGAGGA	GGAATCAAGACCACCTTGTGA
RP11-357O7	CCAGTCTGGGAAACATAGGG	CTACCACACGCGGCTAATTT
RP11-74E22	CAGATTCATGTTGAAAAACAACT	TGTGTCATGGTACAAATCACTATTC
CTB-11O23	TGCCCATGCTGACATA	GACCTGACTAAAANACTCCA
CTD-3060P21	ATTAGCAAACCTTGAGGAAGCGTG	TGTGGACAGTAATGAGGTCATCC
CTD-2513A7		
CTD-2309O5		
RP11-64J4	GACCTGGCTAAGACCTCC	ATCAAAGCAAATTCTGAGTAAC
RP11-147K14	ATGACTCTGGAAAGGGTACCTC	TTCCACTGGGAATTTTATTTGG
RP11-208J12		
RP11-545O6	TAAAACACTCTTATAGAGTT	ACTTTTATAGAGTTAGTGGA
RP11-167N20	AGCCCCCTCCACTCCACT	TCTCTGACCCTTCACCCG
RP11-314A20	TATGCTCAGAAACAAAGAA	GTGTTCATACTAAATTTTCTG
RP11-333E1	TCAACATTCAGTTAAAACATTCCA	TCGTCTATGTTAGGCTTTTTGAAA
RP11-199F11	CTACTGAGGTGACGGCATA	CAAGATGGTTGCTTTGTCC
RP11-1030A12	TTCACCAGCGTTGGGAC	GGATAGGGCTTGACAGTATCACC
RP11-1030O14	TTTGGGTCTTTGAACCCTTG	CCACAACAAAACACCAGTGC

Tabelle 4: Übersicht über die an normalen Lymphknoten ermittelten Cut off-Werte für eine Deletion der einzelnen BAC- und PAC-Klone

Klon	Cut off [in %]
RP11-314A20	10,57
RP11-74E22	8,08
RP11-167N20	10,79
RP11-433M14	10,77
RP5-1029F21	10,2
RP11-333E1	10,24
RP11-199F11	11,74
RP11-64J4	12,57
RP11-667K14	11,77
RP11-818O24	12,25
CTD-3060P21	19,9
CTB-11O23	9,31
CTD-2545H1	11,71
CTD-2309O5	11,31
RP11-147K16	11,09
CTD-2513A7	10,97
CTD-2231E3	10,71
RP11-961A15	13,82
RP11-208J12	11,62
RP11-545O6	21,06
RP11-4F24	13,11
RP4-765O5	13,77
RP11-431C14	13,85
RP11-357O7	14,25

Tabelle 5: Übersicht über die Oligonukleotide zur Amplifikation genomischer TP53-DNA, sowie die zugehörigen Bedingungen

TP53 AC087388	Primer- Bezeichnung		Annealing	Primer FOR	Koordinaten	Primer REV	Koordinaten	Produkt (bp)
Exon 2/3	PCR_2/3rb	Primär-PCR	58,5	CACAGGAAGCCGAGCTGTC	78365-78383	GGGGACTGTAGATGGGTGAA	78823-78842	
Exon 2/3	PCR_1/3rc	Nested-PCR	56,4	TTGGAAGTGTCTCATGCTG	78446-78464	TGGGTGAAAAGAGCAGTCAG	78811-78829	385
Exon 4	PCR_1/PCR_3	Primär-PCR	58,5	TTGGAAGTGTCTCATGCTG	78446-78464	CAGGCATTGAAGTCTCATGG	79142-79161	
Exon 4	4f/PCR_3	Nested-PCR	56,4	CGTTCTGGTAAGGACAAG	78722-78739	CAGGCATTGAAGTCTCATGG	79142-79161	420
Exon 5/6	5-6forII/5-6revI	PCR	59,1	GGAGGTGCTTACGCATGTTT	79771-79759	TGGGGTTATAGGGAGGTCAA	80349-80368	597
Exon 7/9	7-9forII/7-9revI	PCR	59,1	GCACTGGCCTCATCTTGG	80784-80800	TGAAAGCTGGTCTGGTCCTT	81768-81787	1003
Exon 10	10f_II/10r	PCR	58,5	CCATCTTTTACTCAGGTAC	84279-84298	GAAGGCAGGATGAGAATG	84569-84586	251
Exon 11	11f/11r	PCR	56,4	TTCCCGTTGTCCCAGCCTTAG	85311-85330	CAAGCAAGGGTTCAAAGA	85575-85594	283

Tabelle 6: Übersicht über TP53-Oligonukleotide zur Sequenzierung genomischer DNA

TP53 AC087388	Primer FOR	Koordinaten	Primer REV	Koordinaten
Exon 2/3	TTGGAAGTGTCTCATGCTG	78446-78464	TGGGTGAAAAGAGCAGTCAG	78811-78829
Exon 4	CGTTCTGGTAAGGACAAG	78722-78739	CAGGCATTGAAGTCTCATGG	79142-79161
Exon 5/6	GGAGGTGCTTACGCATGTTT	79771-79759	TGGGGTTATAGGGAGGTCAA	80349-80368
Exon 7/9	GCACTGGCCTCATCTTGG	80784-80800	TGAAAGCTGGTCTGGTCCTT	81768-81787
Exon 10	CCATCTTTTACTCAGGTAC	84279-84298	GAAGGCAGGATGAGAATG	84569-84586
Exon 11	TTCCCGTTGTCCCAGCCTTAG	85311-85330	CAAGCAAGGGTTCAAAGA	85575-85594

Tabelle 7: Oligonukleotide für die Einzelamplifikation von Exon 7, 8 und 9 des TP53-Gens

TP53 AC087388	Primer FOR	Koordinaten	Primer REV	Koordinaten
Exon 7	GCACTGGCCTCATCTTGG	80784-80800	GGTAGTAGTATGGAAGAAATCG	81013-810334
Exon 8	GGTTGGGAGTAGATGGAG	81180-81197	CTTGCTTACCTCGCTTAG	81401-81418
Exon 9	CTAAGCGAGGTAAGCAAG	81401-81418	TGAAAGCTGGTCTGGTCCTT	81768-81787

Tabelle 8: Übersicht über die Oligonukleotide zur Amplifikation von HIC1 und TP53 mittels quantitativer Real-time PCR

Gen	Lokus	Accession-Nr.	Primer FOR	Primer REV	Koordinaten	Produkt (bp)
B2M	15q21	AC087828	GGAATTGATTGGGAGAGCATC	CAGGTCCTGGCTCTACAATTTACTAA	26233-26311	78
HBB	11q15	DQ659148	ACCCTTAGGCTGCTGGTGG	GGAGTGGACAGATCCCCAAA	299-369	70
TP53	17p13.1	AC007421	TTTGGGTCTTTGAACCCTTG	CCACAACAAAACACCAGTGC	2633-2749	116
HIC-1	17p13.3	AC090617	CTCCGTATCACTTCCCCCAA	CCGATTTAAGTAAAATGTCCGC	170768-170886	118

Tabelle 9: Oligonukleotide zur Amplifikation von TP53 mittels „FASAY“, „Split Assay“ und Sequenzanalyse von cDNA (nach ^{100,190})

TP53 AC087388		Koordinaten
P3 For	CCTTGCCGTCCTCAAGCAATGGATGAT	352-377
P4 Rev	ACCCTTTTTGGACTTCAGGTGGCTGGAGT	1345-1373
P16 For	GCGATGGTCTGGCCCCCTCCTCAGCATCTTA	805-834
P17 Rev	GCCGCCCATGCAGGAAGTGTACACAT	960-986
F1 For	GACACGCTCCCTGGATTGGC	204-224
R1 Rev	GATTCTCTCCTCTGTGCGCCG	1095-1116
F4 For	TGCCCTCAACAAGATGTTTTGC	635-656
R4 Rev	CGCACACCTATTGCAAGCAAGGG	1517-1539

Tabelle 10: Oligonukleotide zur Amplifikation von Exon 1a-Promoter des HIC1-Gens nach Bisulfit-Behandlung genomischer DNA (nach ¹¹¹)

HIC-1 L41919		analog Dong et al, 2001, Clin Cancer Res
HIC-1 (1106-1128)	WT-Sequenz	CCGGGCCCGGCCTTCGCGCTCTG
UM_FOR	Bisulfit-Behandlung	TTGGGTTTGGTTTTGTGTTTTG
HIC-1 (1204-1223)	WT-Sequenz	GCCAGGGCGCGCCAGGGCG
	Bisulfit-Behandlung	GTTAGGGTGGTGTTAGGGTG
UM_REV	Antisense	CACCCTAACACCACCCTAAC
HIC-1 (1106-1131)	WT-Sequenz	CCGGGCCCGGCCTTCGCGCTCTGCCCGC
M_FOR	Bisulfit-Behandlung	TCGGGTTCGGTTTTCGCGTTTTGTTCGT
HIC-1 (1185-1207)	WT-Sequenz	CGAGGGTTGACAGCCCCCGGCCA
	Bisulfit-Behandlung	CGAGGGTTGATAGTTTTCGGTTA
M_REV	Antisense	TAACCGAAAATCAACCCCTCG

CpG-Dinukleotide sind durch Markierung hervorgehoben. Durch die Behandlung der DNA mit Bisulfit wurden unmethylierte Cytosinreste zu Uracil konvertiert, während methylierte Cytosinreste unverändert bleiben. Eine anschließende Desulphonierung bewirkte die Umschreibung von Uracil zu Thymin. Die Oligonukleotid-entsprechenden Koordinaten sind in Klammern angegeben. (UM: unmethyliert, M: methyliert, WT: Wildtyp)

Tabelle 11: Stimulantien zur Inkulturnahme von Lymphozyten aus Frischmaterial, sowie die entsprechende Inkubationszeit bei 37°C

B-Zell-Lymphome	Stimulantien	Inkubation
hochmaligne	Phorbol-12,13-Dibutyrat (P)	24 h
niedrig-maligne	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (TPA) + Lipopolysaccharid (LPS)	4-5 Tage

Tabelle 12: Immunhistochemisch verwendete Antikörper, deren Verdünnung, Vorbehandlung und Positivkontrollen

Antigen	Klon	Verdünnung	Vorbehandlung	Hersteller	Positivkontrolle
p53	DO-7	1:40	Citrat, pH 6,0	Dako	hochmalignes Lymphom
CHK2	DCS-270.1	1:50	Citrat, pH 7,0	Sigma-Aldrich	Colon/Tonsille
YY1	H-10	1:50	Target Retrieval	Santa Cruz	Prostata-Karzinom
p21	EA10	1:40	Target Retrieval	Calbiochem	Colon
MDM2	IF2	1:20	Tris-HCl pH 7,0	Calbiochem	Liposarkom

Tabelle 13: Übersicht über die mittels quantitativer real-time PCR ermittelten Werte bezüglich HIC1- und TP53-Deletion in DLBCL

Fall	HIC1/B2M	TP53/B2M	HIC1/HBB	TP53/HBB
4	0,26	0,88	0,21	0,88
5	0,06	0,94	0,07	1,41
7	0,7	1,43	0,64	1,32
8	0,55	1,08	0,72	1,41
11	0,52	0,95	0,47	1,03
17	0,26	0,92	0,27	0,94
19	0,61	1,11	0,59	1,05
20	0,07	1,05	0,07	1,01
24	0,6	1,38	0,58	1,24
25	0,2	0,78	0,23	0,89
27	0,66	1,59	0,55	1,33
36	0,49	0,39	0,47	0,38
41	0,68	0,32	0,51	0,25
21	1,32	1,08	1,24	1,01
22	1,3	1,38	1,32	1,41
LK 1	0,72	0,881	0,783	0,896
LK 2	0,834	0,915	0,924	0,904
LK 3	0,967	0,978	0,856	0,892

9. Abkürzungsverzeichnis

17cen	Zentromer von Chromosom 17
5'UTR	untranslatierte Region im 5'-Bereich des Gens
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ABC	“Activated B-cell-like“-Subtyp der DLBCL
B2M	“beta-2-Microglobulin“
BAC	“Bacterial Artificial Chromosome“
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
Carnoy	Methanol : Eisessig (3:1)
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
CDK	“Cyclin-dependent kinase“
CGH	Komparative genomische Hybridisierung
CHK2	“Checkpoint kinase 2“
Cot-DNA	aus humaner Placenta extrahierte DNA
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
C _T	Schwellenwertzyklus (Threshold cycle)
del	deletiert
del(17p)	Deletion von Chromosom 17p
del(17p13.1)	Deletion der chromosomalen Bande 17p13.1
del(17p13.3)	Deletion der chromosomalen Bande 17p13.3
DLBCL	Diffus großzelliges B-Zell Lymphom
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Deoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DPH2L1 (OVCA1)	“DPH2-like 1“; “Ovarian cancer-associated gene 1“-Gen
FASAY	“Functional analysis of seperated alleles in yeast“
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
G	Guanin
GCB	“Germinal center B-cell like“-Subtyp der DLBCL
h	Stunde
HBB	“Hemoglobin, beta“-Gen
HE	Hämatoxilin und Eosin-Färbung
HIC1	„Hypermethylated in cancer 1“-Gen
HIC1+/-	HIC1-Wildtyp

HIC1+/-	HIC1 monoallelisch inaktiviert
HIC1-/-	HIC1 biallelisch inaktiviert
IHC	Immunhistochemie
kb	Kilo-Basenpaare
L	Liter
LEU	Leucin
m	milli (10^{-3})
M	Mol; methyliert
Mb	Mega-Basenpaare
MDR	Minimal deletierte Region
min	Minute
mRNA	messenger-RNA
miRNA	mikro-RNA
MS-PCR	Methylierungsspezifische PCR
mut	mutiert
μ	mikro (10^{-6})
n	nano (10^{-9})
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
nm	Nanometer
OT	Objekträger
OVCA2	“Ovarian cancer-associated gene 2“-Gen
p	kurzer Chromosomenarm; Signifikanzniveau; piko (10^{-12})
p53	Proteinprodukt von TP53
PAC	„Phage 1 Artificial Chromosome“
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pfu	Proofreading Polymerase
PM-DLBCL	Primäre mediastinale DLBCL
q	langer Chromosomenarm
q-RT-PCR	quantitative Real-time PCR
RGC	Ribosomales Gencluster
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
sec	Sekunde
SNP	„Single Nucleotide Polymorphism“
STS	„Sequence tagged sites“
t	Translokation
T	Thymin

Tab.	Tabelle
TP53	Tumorsuppressorgen p53
TP53+/+	TP53 Wildtyp
TP53+/-	TP53 monoallelisch inaktiviert
TP53-/-	TP53 biallelisch inaktiviert
TSG	Tumorsuppressorgen
U	Enzymaktivität (Units)
UM	unmethyliert
UV	Ultraviolett
V	Volt
WT	Wildtyp

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Hans Konrad Müller-Hermelink danke ich für die Möglichkeit diese Dissertation am Pathologischen Institut in Würzburg durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. German Ott für die Überlassung dieses interessanten und vielseitigen Themas. Sein großes Interesse am Fortgang der Arbeit, seine fortwährende Unterstützung und die Bereitstellung hervorragender Arbeitsbedingungen trugen wesentlich zum Gelingen der Arbeit bei.

Herrn Dr. Jörg Kalla danke ich für die erstklassige fachliche Betreuung sowohl bei der Planung und Ausführung der gesamten Fragestellung, sowie der persönlichen Unterstützung während der Bearbeitung der vorliegenden Arbeit.

Insbesondere bei Herrn Dr. Andreas Rosenwald möchte ich mich für die wertvollen Anregungen und das große Engagement während der Anfertigung des Manuskriptes bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Scharthl bedanke ich mich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Frau Dr. Jana Smardova und Herrn Prof. Dr. Jiri Macak (Institut für Pathologie, Brno, Tschechien) möchte ich meinen herzlichen Dank aussprechen für die Möglichkeit die Grundlagen des FASAY kennen zu lernen. Bedanken möchte ich mich auch für die Freundschaft und Hilfsbereitschaft bei meinem Aufenthalt in Brno.

Für die vielen wertvollen Anregungen in statistischen Fragen, sowie dem Umgang mit SPSS möchte ich Herrn Uwe Mäder danken.

Bei Frau Dr. Claudia Kalla möchte ich mich für die vielen hilfreichen Tipps zur Sequenzanalyse und für das Korrekturlesen des Manuskripts bedanken.

Von unschätzbarem Wert war die gute Zusammenarbeit mit allen Kollegen. Mein Dank gilt insbesondere Frau Dr. Eugenia Haralambieva, Dr. Elena Hartmann und Ellen Leich für viele wertvolle Diskussionen. Frau Heike Brückner und Irina Eichelbrönner gebührt mein Dank für die tatkräftige und kompetente Unterstützung bei allen zytogenetischen Fragen. Bei Frau Doris Hetzer möchte ich mich für die Erstellung des Arrayblocks bedanken. Frau Petra Stempfle danke ich für die Durchführung der immunhistochemischen Färbungen.

Der deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Graduiertenkollegs 639 „Molekulare und Strukturelle Grundlagen der Tumorstabilität“.

Mein herzlichster Dank gilt jedoch meiner Familie und Christopher, die mir durch ihr Verständnis und ihre stetige Unterstützung den privaten Rückhalt für die Anfertigung der vorliegenden Arbeit gaben.

1. Publikationen

Adam P, Steinlein C, Schmid M, Haralambieva E, Stöcklein H, Leich E, Rosenwald A, Müller-Hermelink HK, Ott G. Characterization of chromosomal aberrations in diffuse large B-cell lymphoma (DLBL) by G-banding and spectral karyotyping (SKY). *Cytogenet Genome Res* **114**, 274-8 (2006).

Hartmann E, Fernandez V, Stöcklein H, Hernandez L, Campo E, Rosenwald A. Increased MDM2 expression is associated with inferior survival in mantle cell lymphoma, but not related to the MDM2 SNP309. *Haematologica* **92**, 574-5 (2007).

Hutter G, Scheubner M, Ott G, Zimmermann Y, Hübner K, Roth S, Stilgenbauer S, Kalla J, Stöcklein H, Hiddemann W, Dreyling M. Genotyping reveals a hierarchy of genomic alterations associated with cell proliferation and a novel suppressor region on 17p13.3 in mantle cell lymphoma. In preparation.

Stöcklein H, Smardova J, Macak J, Katzenberger T, Höller S, Wessendorf S, Hutter G, Dreyling M, Haralambieva E, Mäder U, Müller-Hermelink HK, Rosenwald A, Ott G, Kalla J. Detailed deletion mapping of chromosome 17p13 reveals HIC1 as a novel tumor suppressor candidate telomeric to TP53 in diffuse large B-cell lymphoma. Submitted to *Oncogene*.

2. Beiträge zu Tagungsbänden

Stöcklein H, Katzenberger T, Höller S, Ott G, Müller-Hermelink HK, Kalla J. Search for an alternative tumor suppressor gene on chromosome 17p distal to TP53 in Non-Hodgkin lymphomas of B-cell type (B-NHL). 13. AEK Cancer Congress, Würzburg, March 2005, *Onkologie* 28 (Suppl.2):56 (2005).

Stöcklein H, Katzenberger T, Höller S, Ott G, Smardova J, Macak J, Müller-Hermelink HK, Kalla J. Deletions on chromosome 17p do not strictly correlate with p53 status in diffuse large B-cell lymphoma. 90th Meeting of German Society of Pathology, Berlin, April 2006, *Pathol. Res. Pract.* 202/4:349 (2006).

Stöcklein H, Katzenberger T, Höller S, Ott G, Smardova J, Macak J, Müller-Hermelink HK, Kalla J. Alterations of TP53 gene do not strictly correlate with deletions on

chromosome 17p in diffuse large B-cell lymphoma. 19th Meeting of European Association for Cancer Research, Budapest, July 2006, EACR19, 275.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Heike Stöcklein
Geburtsdatum: 10.04.1979
Geburtsort: Werneck
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulausbildung

1985-1989 Grundschule Gerolzhofen
1989-1998 Gymnasium Frankenlandschulheim Schloss Gaibach, Gaibach
1998 Allgemeine Hochschulreife

Hochschulstudium

1999-2003 Studium der Biologie and Bayerischen Julius-Maximilians-Universität in Würzburg. Abschluss: Diplom-Biologin.
Hauptfach: Pharmazeutische Biologie
Nebenfächer: Pflanzenphysiologie
Physiologische Chemie

08/2003-06/2004 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität in Würzburg.
Thema: „Enzymatischen und nicht-enzymatische Konjugation von Cyclopentenon-Oxylipinen an Peptide.“

07/2004-07/2007 Doktoranden-Stipendium im Rahmen des Graduiertenkollegs 639 „Molekulare und Strukturelle Grundlagen der Tumorstabilität“

Seit 07/2004 Anfertigung einer Dissertation am Pathologischen Institut der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität in Würzburg

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch zu keinem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Ich erkläre, dass ich bisher keine akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, den