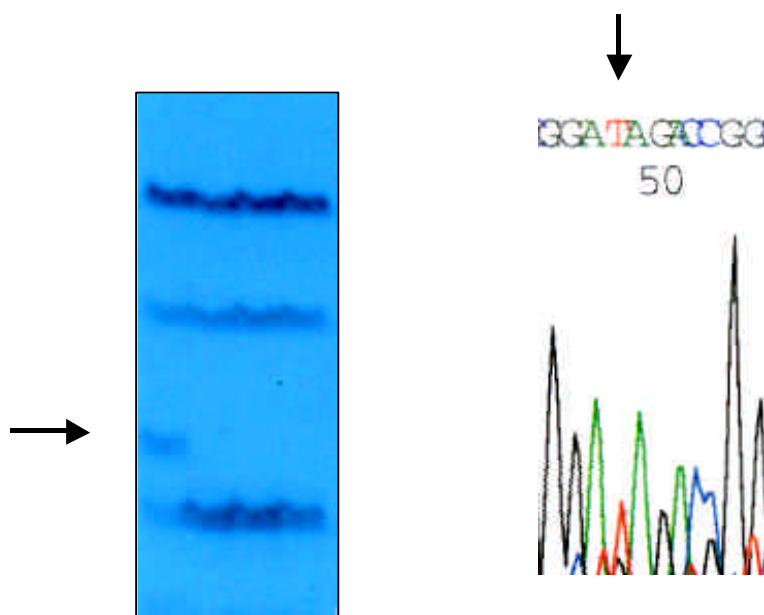


#### III.4.4. Mutación de p53 en un caso de linfoma del manto.

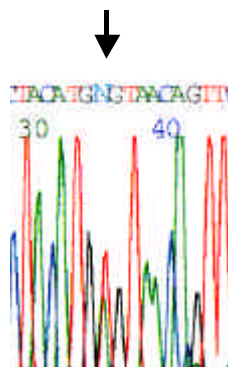
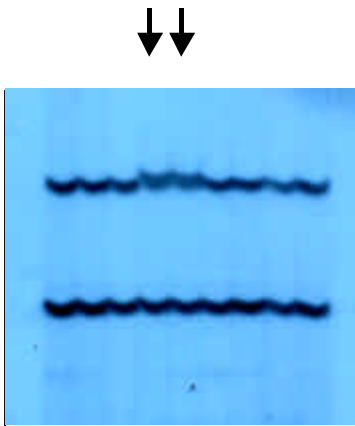
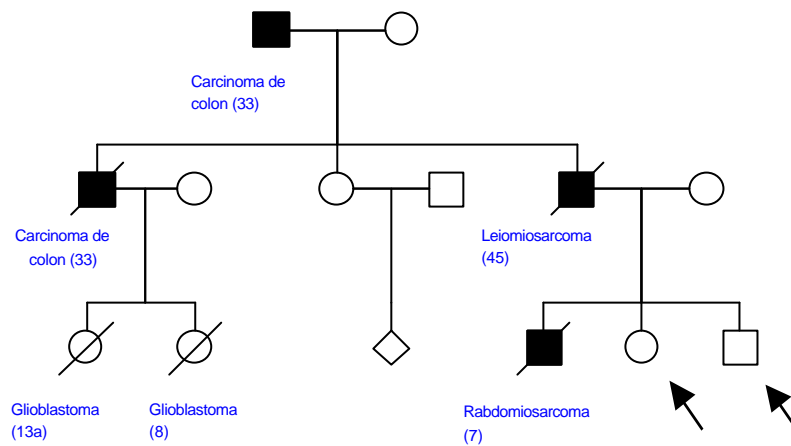
Un paciente de 62 años acudió a urgencias por presentar una hemorragia digestiva alta. La fibrogastroscoopia evidenció la presencia de una tumoración en el estómago. Coincidiendo con este cuadro se descubrió una linfocitosis de 7000 cels/mm formada en su mayor parte por elementos de cromatina finamente reticulada, núcleos hendidos con algún nucleolo ocasional y citoplasma moderadamente amplio. El patrón inmunofenotípico efectuado en sangre periférica fue el siguiente: CD5,FMC7,CD22,CD79b,CD38,CD10,CD19 y CD20 positivos; CD23, CD11c y CD25 negativos. Las células linfomatosas mostraban expresión fuerte de cadena ligera L.Una PCR efectuada con ADN genómico demostró el reordenamiento bcl1/Jh. Con el diagnóstico de linfoma del manto en fase blástica se efectuó análisis mutacional de p53 en el codon 280.El comportamiento clínico altamente agresivo inicial de este linfoma (la primera manifestación fue la hemorragia) se acompañaba de una lesión molecular de p53.



**AGA->ATA R280M**

III.5. SINDROME DE LI-FRAUMENI.

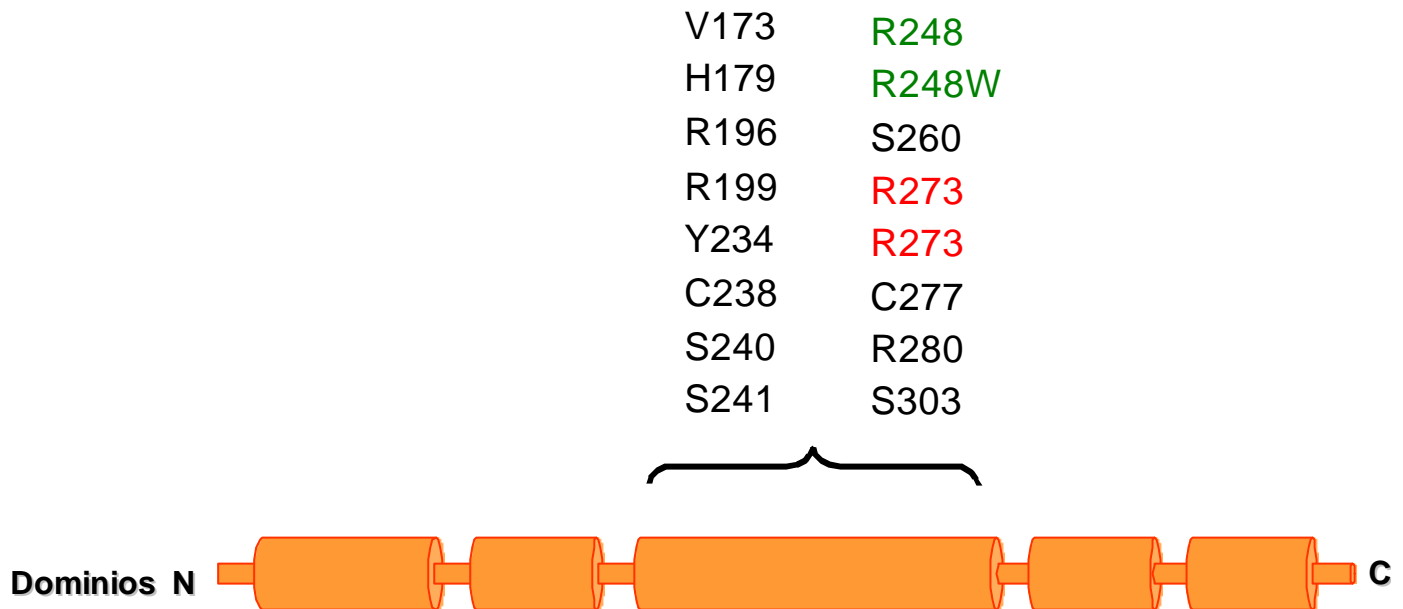
El estudio de dos hermanos pertenecientes a una familia con síndrome de Li-Fraumeni demostró la presencia en heterocigosis de una mutación de p53 en el codon 238. El estudio de una sección del leiomioma que acabó con la vida del padre de estos dos hermanos evidenció la misma mutación.



238TGT->AGT C238S

## III.6. Espectro mutacional.

## Mutaciones en neoplasias mieloides

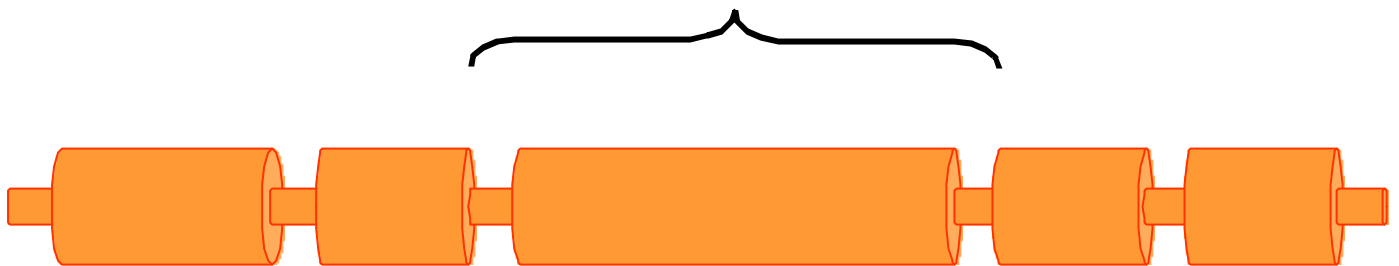


**Figura 11.** En los casos de neoplasias mieloides analizados en este trabajo se ha detectado la presencia de un total de 16 mutaciones por cambio de sentido. Todas ellas afectan al dominio de unión al ADN y se esquematizan en la figura siguiente. Aquellas señaladas en negro corresponden a las que se han identificado en un único caso.

En rojo se indica la única mutación identificada en dos pacientes. En verde se señalan aquellas mutaciones que afectan al mismo codón aunque con diferente cambio de aminoácido.

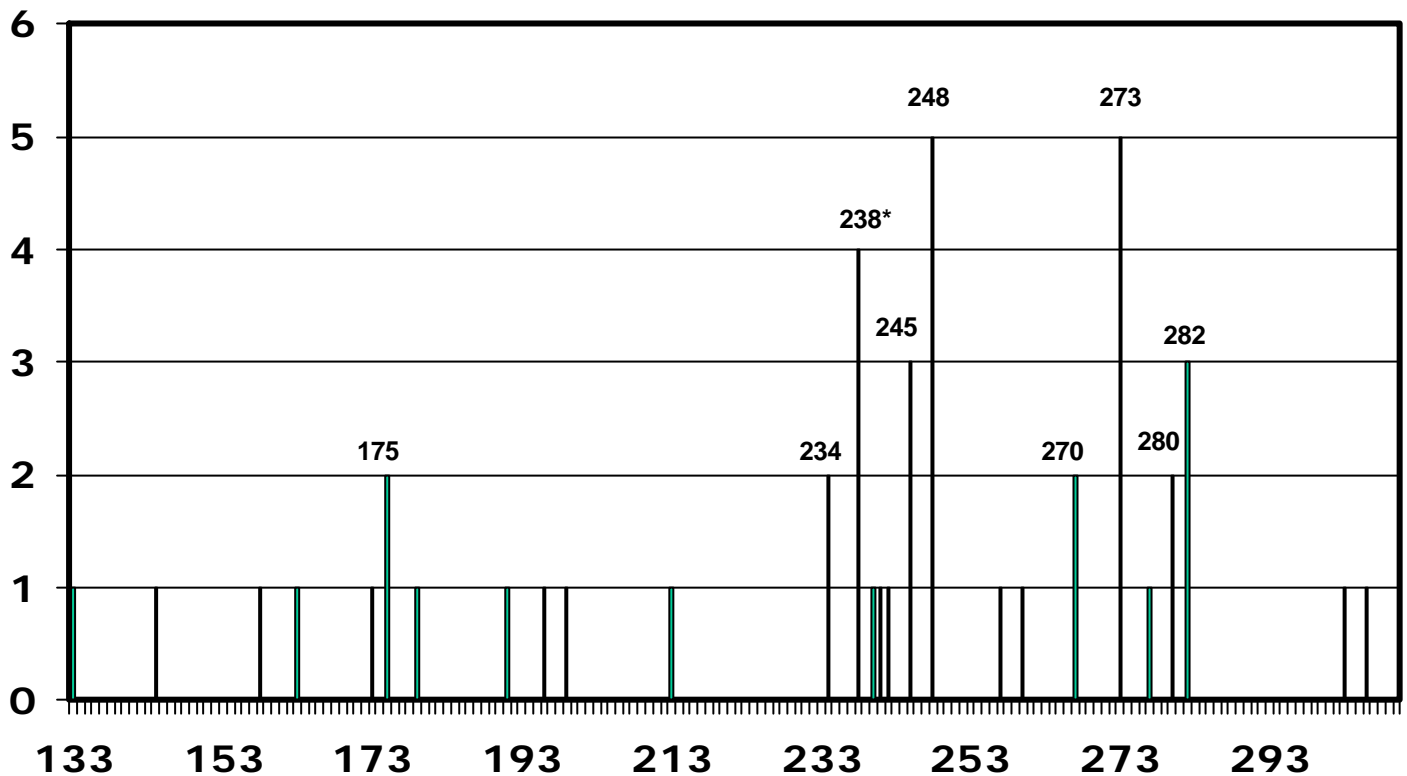
## Mutaciones en neoplasias linfoides

M133	R213	R248	R273
Q144	Y234	R248	R273
R158	C238	R248W	R280
Y163	C242	L257	R282W
R175	G245	R267W	R282W
R175	G245	R267W	R282W
P191	G245	R273C	R306



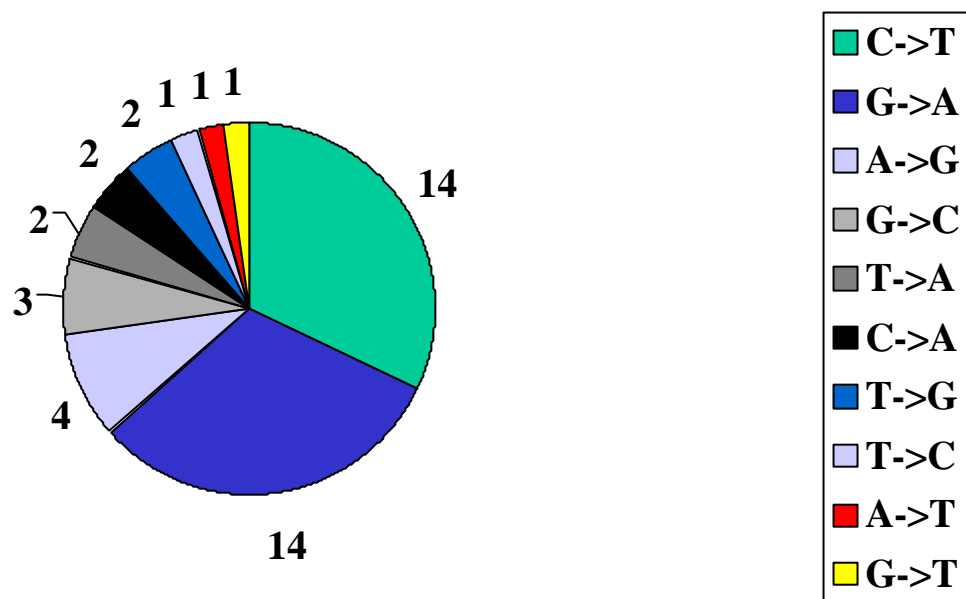
**Figura 12.** En el esquema se indican las mutaciones encontradas en todos los procesos de estirpe linfoides analizados en la presente tesis. Un total de 28 mutaciones por cambio de sentido y una mutación en el sitio de "splicing". En negro las mutaciones presentes en un solo caso, en rojo las mutaciones encontradas en más de una ocasión en esta categoría diagnóstica y en verde aquellas diferentes mutaciones pero localizadas en el mismo codon.

## ESPECTRO MUTACIONAL DE p53



**Figura 13.** En la siguiente figura se muestra el espectro mutacional de p53 en el que se puede apreciar una distribución similar a la ya conocida por los grandes registros mutacionales: predominio de mutaciones en aquellos aminoácidos con unión específica al ADN (mutaciones de contacto) como son los codificados por los codones 245, 248 y 273. Con un asterisco se indica la localización de la mutación en dos hermanos pertenecientes a una familia con el síndrome de Li-Fraumeni.

## CAMBIOS DE NUCLEOTIDOS EN MUTACIONES DE p53



**Figura 14.** El tipo de cambio de base observado en el estudio se muestra en la siguiente figura. Se puede observar que la mayoría de cambios son C->T y G->A, indicativos de una posible metilación espontánea de la citosina en zonas de dinucleótidos CpG y un posterior cambio a timina, ya sea en la hebra sentido (C->T) como en la hebra antisentido (G->A).

## IV. DISCUSIÓN

### IV.1. p53 en neoplasias mieloides

#### IV.1.1 Síndromes mieloproliferativos crónicos

Los síndromes mieloproliferativos crónicos son procesos neoplásicos que afectan a la *stem cell* hematopoyética con un curso típicamente bifásico. A una fase crónica de duración variable (meses-años) le sigue un periodo final indistinguible de una leucemia aguda, en que se constata un empeoramiento de los síntomas clínicos y una refractareidad al tratamiento. Los mecanismos moleculares implicados en esta transformación (fase blástica), empiezan a ser conocidos.

Uno de los mecanismos más estudiados es la inactivación de p53. En la serie de 49 pacientes con PV o TE incluidos en este trabajo, se analizó la presencia de mutaciones de p53 (Apartado III.2). Quince muestras se estudiaron en fase blástica. En 5 casos se pudo estudiar una muestra en fase crónica y otra en fase blástica. Las mutaciones de p53 se identificaron exclusivamente en muestras obtenidas cuando el paciente se encontraba en fase blástica (3/5 casos de PV y 4/10 TE). No se detectaron mutaciones en las muestras obtenidas en fase crónica, pero hay que tener en cuenta que se analizaron los exones 5-9 sin estudios de las zonas intrónicas. De los 15 casos estudiados en fase blástica sólo 1 tenía antecedente de un tratamiento con fósforo radiactivo, al que se le atribuye un importante papel leucemógeno. Este paciente mostraba una mutación en el codon 277 TGT->TAT. El resto de pacientes habían recibido como tratamiento hidroxiurea, pipobromán, busulfan o interferón. Sterkers et al (Sterkers, 1998) investigaron el riesgo leucemógeno de diferentes formas de tratamiento en pacientes que sufrían una TE. Estudiaron 326 pacientes con un seguimiento medio de 98 meses, de los cuales 6 desarrollaron una leucemia aguda y 11 un síndrome mielodisplásico. De estos 17 pacientes, 11 habían recibido hidroxiurea y sólo 3 fósforo radiactivo y busulfan. En dicha serie se demostró la asociación con deleciones de 17p y mutaciones de p53. Si bien la tasa de transformación fue baja (4.5%), estos trabajos sugieren que el uso de hidroxiurea en pacientes con un SMPc de curso relativamente benigno como la PV o TE comporta el peligro de favorecer el desarrollo de fase blástica asociada a inactivación de p53. Por ello deben investigarse nuevas estrategias no leucemógenas. Las mutaciones de p53 son responsables de casi la mitad de fases blásticas de PV y TE; este porcentaje es mucho mayor al observado en casos de LMC-Ph+ y se asemeja más al descrito en casos de síndromes mieloproliferativos crónicos bcr/abl- (Gaidano,1993).

#### IV.1.2 Leucemias agudas y síndromes mielodisplásicos

La importancia de las mutaciones de p53 en LAM y SMD se ha considerado en esta tesis desde dos puntos de vista:

- Presencia de mutaciones de p53 en LAM/SMD con translocaciones que afectan al cromosoma 17.

Se ha detectado una mutación (199 GGA->GTA) en el exon 6 del gen de p53 en un paciente con una AREB-t y la mutación 179 CAT->CGT en el exon 5 de p53 en un caso de LAM. Ambos pacientes presentaban una lesión citogenética idéntica: der(17;18)(q10;q10) (Apartado III.2.2). Los dos casos, además de esta translocación, mostraban una delección del cromosoma 5. Se ha propuesto (Castro, 2000; Andersen, 2001) que las lesiones del cromosoma 5 predispondrían, dentro de la evolución clonal de la leucemia, a la adquisición de mutaciones de p53 como las reportadas en nuestros dos casos por lo que el mecanismo básico podría estar relacionado con un fenotipo RER<sup>+</sup> (errores de replicación) (Horiike,1999). En modelos experimentales en ratones que carecen de proteína MSH2, el desarrollo de tumores inducido por el virus de Abelson se asocia a inactivaciones de p53 (Jenab-Wolcott ,2000).

Estos datos avalan el interés de la búsqueda de mutaciones de p53 en casos que muestran alteraciones estructurales de 17p.

- b) Presencia de mutaciones de p53 en LAM/SMD con lesiones citogenéticas de mala evolución: reordenamientos de 3q y del gen MLL.

Aunque la lesión citogenética del brazo largo del cromosoma 3 no es frecuente, se asocia de forma constante a un curso fatal. Estos pacientes presentan una LAM o un SMD con cifras normales o elevadas del número de plaquetas y distintos trastornos madurativos de la megacariopoyesis (Fonatsch,1994). Para determinar si la mala evolución de estos procesos se debe al poder transformante intrínseco de la lesión citogenética o se debe a la inactivación de p53 asociada, se analizaron 15 pacientes con lesiones de 3q (5 SMD y 10 LAM) (Apartado III.2.1). En ningún caso se pudo evidenciar una mutación de p53 o una lesión citogenética de 17p. Sin embargo, en 8 pacientes se encontró una monosomía 7, lo que sugiere que en este cromosoma podría localizarse algún gen involucrado en el origen y/o evolución clonal de este subgrupo de neoplasias mieloides.

Las translocaciones y reordenamientos del gen MLL, situado en 11q23, se asocian a mal pronóstico en pacientes con LAM, excepto cuando determinan una t(9;11) (Mrozek, 1997).

Se analizaron 29 casos con LAM y reordenamientos de MLL con presencia de mutaciones en 7 casos (Apartados III.2.1 y III.2.3). Tres casos con mutaciones correspondían a niños menores de un año. Para este tipo de asociación se ha propuesto un modelo de adquisición de la primera lesión (MLL) *in utero* (Gale,1997) debida a agentes infecciosos o a la influencia de la dieta rica en flavinoides de la madre, con rápida adquisición de nuevas lesiones moleculares entre las que se encuentra la mutación de p53.



Los resultados obtenidos en el presente trabajo contrastan con los reportados por Megonigal et al (Megonigal, 1998) que sólo encuentran 1 paciente con mutación en un niño de menos de un año que sufría una LAL en recaída. En dicho trabajo se analizaron 25 niños con reordenamientos de MLL, de los cuales 21 tenían menos de un año ("infant leukemias"). La baja incidencia de mutaciones de p53 reportada por Megonigal et al. puede ser debida a la utilización de una metodología poco sensible para el análisis mutacional. Debería considerarse además la posibilidad de la existencia de diferencias en la población analizada (americana frente a europea) así como el hecho de que la inactivación de p53 asociada a los reordenamientos de MLL puede no ser siempre mutacional sino que también se ha demostrado que puede deberse a una inhibición de la transcripción (Maki,1999).

La asociación de mutación de p53 en la línea germinal y amplificación de MLL en un caso de LAM, sugiere que la inestabilidad genómica asociada al síndrome de Li-Fraumeni puede afectar a las zonas más vulnerables del genoma, entre las que se encuentra la zona intrónica de MLL (Felix,1998).

En un caso de LAM del adulto con reordenamiento MLL (Apartado III.2.3), la mutación de p53 se asoció a un cariotipo complejo con múltiples lesiones citogenéticas que reflejan la inestabilidad genómica subyacente.

La inactivación concurrente de p53 y MLL puede tener diferente significado biológico en leucemias de niños y de adultos, no siempre se produciría por mecanismos mutacionales y podría ser indicativa de diferentes vías de leucemización (inestabilidad genómica constitucional, lesiones del ADN asociadas al mecanismo general de apoptosis) (Bigoni,1999; Stanulla,1997; Andersen, 2001).

## **IV.2. p53 en neoplasias linfoides: LAL, linfomas y SLPC**

### **IV.2.1.- Leucemias agudas linfoblásticas T (LAL-T).**

Son proliferaciones neoplásicas de los precursores linfoides T. Las lesiones moleculares que las originan afectan al receptor de célula T y a diferentes factores de transcripción. Se ha planteado el análisis de p53 como un posible mecanismo molecular adicional que podría tener alguna importancia en la estratificación pronóstica. En una serie consecutiva de 32 muestras con el diagnóstico de LAL-T correspondiente a 27 pacientes diferentes (Apartado III.3.1), sólo en un paciente en recaída se pudo constatar mutación de p53. El paciente falleció al cabo de poco tiempo con enfermedad refractaria a todos los tratamientos. Estos datos concuerdan con los obtenidos por otros grupos (Wada,1993; Felix,1994; Kawamura,1999) con la única excepción de los resultados obtenidos por Dicciani (Dicciani,1994) que describían mutaciones de p53 hasta en la cuarta parte de pacientes con LAL-T en recaída. En el trabajo más reciente (Kawamura,1999) se analizaron 57 casos en el momento del diagnóstico con 3 mutaciones y 14 en recaída con una sólo mutación. Estas mutaciones se localizaban en los codones 248 y 175. En la serie de Dicciani es de destacar también la particular localización de las mutaciones: 3/12 se localizaban en el exón e intron 4, 8 mutaciones estaban en el exón 5 (con 3 mutaciones en el codon 135) y sólo 1 mutación se localizaba en el exón 8 en el codon 282. La única mutación identificada en nuestra serie de pacientes se localiza en el codon 273, localización descrita en líneas celulares de LAL-T (Zhou,1995).

Si bien las mutaciones de p53 no son comunes en este tipo de leucemias, su identificación tiene dos aplicaciones clínicas claras: por una parte, delinear el pequeño subgrupo de pacientes en los que la presencia de una mutación de p53 indica una mala evolución y por otra, identificar las familias en las que la LAL-T forma parte del síndrome de Li-Fraumeni. Los casos de síndrome de Li-Fraumeni ilustran la importancia de investigar la historia familiar completa en cualquier tipo de neoplasia (Felix,1992).

El estudio de la inactivación por mecanismos no mutacionales, como ha sido demostrado para la leucemia/linfoma T del adulto asociado a la infección por HTLV-I, ha evidenciado que la inactivación de p53 sería debida a una estabilización o secuestro de la proteína p53 por productos virales, de forma análoga a lo observado para el HBV (Takemoto,2000). Estos datos junto con la investigación de mutaciones en la zona intrónica de p53, aportarán nuevas perspectivas a la visión actual de p53 en LAL-T.

### **IV.2.2.- Leucemia aguda linfoblástica B del niño (LAL-B del niño).**

La LAL de línea B (habitualmente también conocida como común o calla+) es el tumor más frecuente en la infancia. Representa la cuarta parte de todos los tumores y las tres cuartas partes de las leucemias del niño. Las lesiones moleculares descritas incluyen: cariotipos hiper e

hipodiploides, las t(9;22) y hasta en un 25% de los casos se ha identificado el reordenamiento TEL/AML-1 originado por una translocación críptica entre los cromosomas 12 y 21 (Golub,1995; Romana,1995).

Se analizaron 52 muestras de pacientes con el diagnóstico de LAL-B (15 en el momento del diagnóstico y 37 en recaída). Este elevado número de muestras en recaída se debe a que proceden de un Hospital de referencia para el trasplante de médula ósea (Apartado III.3.1). En 13 casos se evidenció un reordenamiento del gen TEL mediante Southern blot y/o RT-PCR. Se identificaron mutaciones de p53 en 4 casos en recaída (11% de las muestras en recaída). En tres casos se disponía de estudio citogenético y presentaban un cariotipo complejo con lesión de 17p en uno de los casos. Todos los pacientes con mutaciones de p53 fallecieron. Dos pacientes presentaban la misma mutación en el codon 245 (GGC->AGC).

Esta elevada frecuencia de las mutaciones de p53 en pacientes en recaída plantea la necesidad de investigar la inactivación de p53 por mecanismos mutacionales o no mutacionales (Zhou,2000) y cual es la influencia en la evolución del tratamiento post-recaída. La participación de las mutaciones de p53 en las leucemias con reordenamientos TEL/AML-1 es actualmente desconocida y nuestros datos sugieren que las mutaciones no son frecuentes (0/13). En este sentido, conviene remarcar que este subgrupo de LAL-B del niño tienen muy buen pronóstico con los tratamientos habituales. Blau et al (Blau,1997) estudiaron 25 niños con LAL de línea B y en tres casos en recaída encontraron mutaciones de p53. Esta frecuencia (12%) coincide con nuestros hallazgos. La frecuencia de las mutaciones de p53 en LAL-B en recaída en pacientes adultos parece ser todavía mayor. Tang et al (Tang,1998) investigaron la presencia de mutaciones de p53 en 24 casos y encontraron mutaciones en 6 (25%). En 5 de estos casos se demostró además pérdida del segundo alelo y un cariotipo complejo lo que sugiere, como se ha comentado al referirnos a la asociación con los reordenamientos MLL, que en estos casos las mutaciones de p53 asentarían en un substrato de inestabilidad genómica.

#### **IV.2.3 Linfoma de Burkitt**

Los linfomas de Burkitt y sus equivalentes leucémicos (LAL-L3) son neoplasias de linfocitos B post-germinales en cuya génesis participan, con cierta frecuencia, virus oncogénicos como EBV y HIV.

Se analizaron de forma retrospectiva 16 casos con Burkitt o LAL-B que presentaban una morfología de L3 aunque no se pudiera evidenciar la lesión molecular típica (reordenamientos de c-myc). Posteriormente se estudió un caso de Burkitt en un paciente infectado por HIV (Apartados III.3.1 y III.3.2). En estos 17 casos se han identificado 9 mutaciones. Sólo un paciente con mutación de p53 (245 GGC->AGC) sobrevivió. Esta mutación es la misma que se identificó en 2

pacientes en recaída con LAL-B pediátrica lo que evidencia la dificultad de establecer, de una forma simplista, la relación genotipo-fenotipo.

En tres pacientes de este grupo se identificó una mutación recurrente en el codon 282 (CGG->TGG) que se asoció a la presencia de una neoplasia sólida. Bhatia et al (Bhatia,1992) analizaron 27 casos de Burkitt y encontraron un 37% de mutaciones, con la mayoría de mutaciones localizadas en el segmento que comprende los codones 213 a 248. En este trabajo no se identificó ninguna mutación en el codon 273, si bien se reportó una mutación por desplazamiento del molde de lectura en el codon 282.

En la serie de Gaidano (Gaidano, 1991) la mutación CGG-TGG, del codon 282, se identificó en un caso de LAL-L3, en un síndrome de Richter y en la línea celular BL60. Por lo que podemos afirmar que la mutación en el codon 282, si bien fue identificada en primer lugar en tumores sólidos (Hernández-Boussard,1999), es muy común en linfomas de Burkitt.

Preudhomme et al (Preudhomme ,1995) analizaron 48 casos de BL/LAL-L3 y sólo detectaron mutaciones en 9 pacientes (19%). Esta baja frecuencia puede explicarse por empleo de una técnica subóptima o diferencias geográficas. Estos autores hallaron 2 casos con la misma mutación en el codon 136 (CAA->TAA).

En el presente trabajo, los datos obtenidos en el grupo de pacientes con BL y equivalente muestran una elevada incidencia de inactivación de p53 y coinciden con los publicados por otros autores (Gaidano,1991).

Se ha estudiado, además, la asociación de mutaciones de p53 con diferentes lesiones moleculares características de leucemias agudas y Burkitt (Apartado III.3.1). Constatamos que se asociaban a reordenamientos de c-myc (5/11casos) y a reordenamientos de MLL (3/16).

A pesar de la elevada frecuencia de las mutaciones de p53 en Burkitt, el significado pronóstico sólo ha sido valorado por Preudhomme et al (Preudhomme, 1995). Estos autores concluyen que la presencia de mutaciones de p53 no conlleva un pronóstico adverso. Todos estos datos indican que será necesario efectuar estudios adicionales que confirmen tanto la carencia de impacto pronóstico de las mutaciones de p53 en Burkitt como el significado de los diferentes tipos de mutantes.

#### **IV.2.4 . En síndromes linfoproliferativos**

Las mutaciones de p53 participan en la transformación agresiva de diferentes procesos linfoproliferativos B (Imamura,1994). Las mutaciones de p53 se han descrito en casos de LLC transformadas a linfomas de alto grado, en la transición a fase blástica de linfomas del manto y de linfomas foliculares. El estudio de un paciente con una mutación de p53 con linfoma folicular y doble reordenamiento de bcl2 (Apartado III.4.1) sugiere que las mutaciones de p53 son un evento tardío dentro de la evolución clonal de los linfomas.

En un caso de linfoma del manto con una presentación clínica agresiva (hemorragia digestiva alta) y una citología en sangre periférica sugestiva de fase blástica, pudimos evidenciar la presencia de una mutación de p53. En el linfoma del manto en fase blástica, como ha sido ampliamente reportado, (Louie 1995; Hernández 1996; Greiner 1996; Zoldan 1996) se detectan muy frecuentemente mutaciones de p53 . (Apartado III.4.4).

Durante un periodo de 18 meses, en todos los casos con reordenamientos bcl2/Jh que acudieron a nuestro centro, se analizaron las mutaciones de p53 (Apartado III.4.3). Se trataba de 26 pacientes de los cuales 25 correspondían a linfomas foliculares y 1 a una transformación agresiva de un linfoma folicular con reordenamiento de c-myc. En cinco casos se encontraron mutaciones: 4 casos correspondían a fases avanzadas de la enfermedad (estadios IV) y en 1 caso se trataba de un cambio histológico de un linfoma folicular (célula pequeña->célula grande). En 4 pacientes el reordenamiento de bcl-2 era del tipo MBR y en 1 paciente mcr. Todos los pacientes con mutación fallecieron en poco tiempo (<6meses). Estos hallazgos demuestran que las mutaciones de p53 son comunes en linfomas foliculares y que están presentes en casos en los que no se puede documentar transformación histológica. Estos hallazgos coinciden con los reportados por Sander et al (Sander, 1993) que encuentran 3 mutaciones de p53 en 25 casos de linfomas foliculares no transformados.

En la actualidad, se plantea que las mutaciones de p53 informarían de cuan evolucionada está una clona derivada del linfoma folicular inicial: los casos con mutaciones de p53 corresponderían tanto a linfomas foliculares “viejos” como a linfomas que se han visto sometidos a un stress mutagénico importante y los linfomas foliculares que carecen de mutaciones de p53 podrían considerarse como de aparición “reciente” y por lo tanto con una historia natural más larga. Si las mutaciones de p53 pueden ser utilizadas como criterios de estratificación terapéutica, sólo o en combinación con criterios clínicos derivados del IPI (Shipp,1993) su estudio en linfomas foliculares debería generalizarse, considerando la indicación de trasplante alogénico de médula ósea en estos casos.

La discordancia que se observa entre una sobreexpresión de p53 y la ausencia mutaciones en dicho gen es bien conocida en otros tipos de linfoma y ha sido estudiada en los linfomas con reordenamientos NPM/ALK que se asocian a los linfomas anaplásicos de célula grande (Apartado III.IV.1). Se estudiaron 5 casos, 2 de ellos con sobreexpresión de p53 en más del 70% de las células tumorales, y en ningún caso se pudieron encontrar mutaciones de p53. Tres casos eran heterocigotos para un polimorfismo común en el exón 6 (Serra,1994).

Al analizar de forma secuencial y en paralelo la expresión de p53 y la presencia de mutaciones, ocurre que en los primeros estadios hay una expresión aumentada de p53 junto con un estudio mutacional normal. En etapas sucesivas, aumenta la expresión de p53 sin que se detecten mutaciones, hasta que, en una fase final, con expresión de p53 en un porcentaje elevado de

células tumorales (>70%), se identifican mutaciones en el gen de p53 (Villuendas,1993). Este patrón es válido para los tumores en los que predominan las mutaciones por cambio de sentido, como en el caso de los linfomas. Las mutaciones que generan un codon de parada, las microdeleciones, las inserciones o mutaciones que afectan al sitio de "splicing" conllevan una ausencia de síntesis de p53. Esta situación se refleja en unos estudios de expresión negativos en presencia de una mutación en el ADN genómico (Hashimoto,1999).

#### **IV.2.5.- Neoplasias NK**

Los procesos neoplásicos de los linfocitos NK son muy raros en los países occidentales. Cursan como procesos neoformativos y destructivos de la línea media (granulomas letales de la línea media) o linfomas con leucemización posterior y curso altamente agresivo. El inmunofenotipo de las células neoplásicas es CD2,CD56,CD16,CD94 positivos con negatividad de antígenos T y B. Las lesiones citogenéticas asociadas son mal conocidas aunque se han implicado a las deleciones de 6q como mecanismo inicial. En estos casos se constata de forma prácticamente constante la integración de EBV (Kanavaros,1993).

En este trabajo, se han analizado 4 casos y en ninguno fue posible evidenciar mutaciones de p53 (Apartado III.4.2). Li et al (Li,2000) detectaron mutaciones de p53 en 20/42 casos procedentes del sudeste asiático aunque conviene señalar que algunas se localizaban en los intrones y no se conoce su importancia patogénica. En este mismo trabajo se encontraron diferencias geográficas. Así, en los casos procedentes de la región de Osaka, el 45% presentaban sobreexpresión de la proteína p53 mientras que sólo el 22% presentaban mutación mientras que en Beijing el 43% sobreexpresaban p53 y el 57% tenían mutaciones en el ADN genómico.

Se requieren estudios adicionales para valorar si los mecanismos de inactivación no mutacionales predominan en nuestro medio.

#### **IV.2.6.- Espectro mutacional**

La inmensa mayoría de las mutaciones de p53 se encuentran en la porción codificante del gen para la zona de unión al ADN (94.5%). Sólo el 2.6% de las mutaciones se localiza entre los codones 1-119 y el 2.9% entre los residuos 291 a 393. Esta distribución está sesgada porque la mayoría de estudios, como el efectuado en la presente tesis, analizan los exones 5-8 (codones 126 a 306). No obstante, en los estudios en los que se ha investigado la secuencia completa del cADN, el 87% de las mutaciones se localizaba en los exones 5-8, un 8% en el exón 4 y un 4% en el exón 10 (Hernández-Broussard, 1999).

El tipo de mutación también es variable dentro de la secuencia codificante de p53: en las regiones terminales (amino y carboxiterminal predominan las mutaciones sin sentido y con desplazamiento

del molde de lectura) mientras que en la zona central de unión al ADN predominan las mutaciones por cambio de sentido. En las bases de datos constaban hasta fecha reciente (Septiembre 2000) 14050 eventos mutacionales de p53 correspondientes a 1729 mutaciones diferentes. La mayoría de las mutaciones descritas en tumores humanos son puntuales (10204) y provocan un cambio en un aminoácido en la zona de unión al ADN (9812).

El 20% de las mutaciones se localizan en 5 codones :175, 245, 248, 249 y 273.

Estos hallazgos coinciden con los aportados en la presente tesis ya que todas las mutaciones, con excepción de un cambio en el lugar de splicing, originaban un cambio de aminoácido. La localización de las mutaciones en "puntos calientes" mutacionales ("hot spot") también se observaba en las muestras que hemos analizado con dos particularidades: la presencia de 3 mutaciones en el codon 282 en linfomas de Burkitt y la inactivación del codon 238 en 2 neoplasias hematológicas ( una mieloide y otra linfoide) y en 2 hermanos que formaban parte de una familia con síndrome de Li Fraumeni. Las Figuras 13 y 14 ilustran estos datos. Cabe destacar que la mutación en el codon 282 es la sexta en frecuencia cuando se consideran todas las neoplasias humanas.

Cuando se analiza la distribución de mutaciones por codones se observan diferencias correspondientes al tipo celular o de órgano: en el ovario predominan las mutaciones en los codones 273,245 y 248; en el colon 175,248,273,245 y 282; en el hígado predomina con mucho la mutación en el codon 249 seguida por el 273; en la vejiga urinaria el 280 (es este codon presentamos 2 mutaciones en la presente tesis), en la mama 175;248,273 y 245; en pulmón 273,248 y 157; en la piel el 248.

En cuanto al tipo de mutación, las bases de datos señalan que predominan las transiciones (C->T o G->A). En nuestra serie más de la mitad de las mutaciones corresponden a este tipo. Las transversiones (G->T) son más frecuentes en tumores de pulmón y de hígado.

Las mutaciones en el codon 175, 248 y 273 en leucemias son como en la mayoría de tumores del tipo GC->AT. Este tipo de cambio corresponde, a menudo, a localizaciones de dinucleótidos CpG. La información almacenada en las bases de datos indica que el 20% de los cambios GC->AT en leucemias afectan a dinucleótidos CpG (Figura 14) .

Cuando se analiza el espectro mutacional de p53 en la línea germinal y en la somática, se observa una gran similitud. Las mutaciones que afectan a las células germinales, que se encuentran protegidas frente a los mutágenos exógenos, se habrían originados por defectos en el proceso de replicación y reparación del ADN. Este mismo mecanismo originaría las mutaciones de p53 en la células somáticas. Asumiendo que la frecuencia de mutaciones de p53 en células germinales y en células somáticas es similar es posible especular que p53 actuaría como sensor en el sistema de vigilancia de la integridad del genoma y, a través de la carcinogénesis mediada por su

inactivación, causaría la muerte del individuo, preservando a la especie.



## V. CONCLUSIONES

- El análisis de los exones 5 a 9 de p53 mediante SSCP radiactivo y secuenciación directa permite identificar mutantes en neoplasias hematológicas. Esta técnica puede aplicarse de forma ordenada ante circunstancias en las que se dispone de muy poca cantidad de ADN (<1µg) , iniciando el estudio por aquellos exones con mayor probabilidad de encontrar mutación (exones 7 y 8).
- Las mutaciones de p53 son eventos moleculares comunes en las transformaciones agresivas de síndromes mieloproliferativos crónicos bcr/abl -. Se debe investigar en estos procesos la contribución de las diferentes modalidades de tratamiento, especialmente los empleados en cuadros relativamente indolentes en sujetos jóvenes.
- Las neoplasias hematológicas con reordenamientos de 17p presentan a menudo mutaciones del gen p53.
- Las neoplasias mieloides con lesiones estructurales del brazo largo del cromosoma 3, a pesar de su mal pronóstico, no muestran mutaciones de p53.
- Las leucemias agudas mieloides del adulto con reordenamientos del gen MLL pueden presentar mutaciones de p53. Esta asociación es particularmente relevante en casos con cariotipo complejo, deleciones del brazo largo del cromosoma 5 o en casos de LAM secundaria.
- Las mutaciones de p53 son especialmente frecuentes en dos subgrupos moleculares de leucemias agudas infantiles: las que presentan reordenamientos de c-myc y de MLL.
- Las mutaciones de p53 rara vez se asocian a LAL-T en el momento del diagnóstico, sin embargo, permiten identificar a un grupo de pacientes que presentan recaídas refractarias al tratamiento.
- En el 11% de los casos de LAL de línea B del niño en recaída se encuentran mutaciones de p53. Estos casos corresponden a cariotipos complejos y muy mala evolución. Los niños con reordenamientos del gen TEL no presentan mutaciones de p53 y sí deleciones de p16.

- Las LAL-B con morfología L3 y los linfomas de Burkitt presentan con frecuencia mutaciones de p53. La importancia pronóstica de esta lesión en este contexto es desconocida.
- Las mutaciones de p53 a menudo son responsables de la fase final agresiva de diferentes síndromes linfoproliferativos crónicos B como el linfoma folicular y el linfoma del manto.
- Los linfomas foliculares en estadios avanzados pueden presentar mutaciones de p53 en ausencia de transformación histológica evidente.
- En los casos de linfomas foliculares transformados a linfomas difusos de célula grande, la aparición de mutación de p53 va precedida de una fase con incremento progresivo de las células con inmunotinción positiva para p53.
- En linfomas con reordenamientos NPM/ALK no se detectaron mutaciones de p53 a pesar de evidenciarse sobreexpresión proteica mediante técnicas inmunohistoquímicas.
- No se han detectado mutaciones de p53 en linfomas/leucemias NK diagnosticadas en nuestro medio siguiendo criterios clínicos, histológicos, inmunofenotípicos y que presentaban integración monoclonal de EBV.
- La distribución de las mutaciones recogidas en el presente trabajo coincide con los hallazgos acumulados en las bases de datos internacionales: predominio de las mutaciones por cambio de sentido en la zona de unión al ADN, especialmente en los aminoácidos de contacto. En un caso se ha encontrado un cambio de base en la secuencia consenso de "splicing".
- También en p53 se hace difícil establecer correlaciones genotipo-fenotipo: una misma mutación puede ser erradicada con tratamiento quimioterápico o determinar una recaída refractaria a cualquier terapia.

## VI. REFERENCIAS

Ackermann J, Meidlinger P, Zojer N, Gisslinger H, Ludwig H, Huber H, Drach J. Absence of p53 deletions in bone marrow plasma cells of patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Br J Haematol* 1998; 103:1161-1163.

Adamson DJA, Thompson WD, Dawson AA, Bennett B, Haites NE. P53 mutation and expression in lymphoma. *Br J Cancer* 1995; 72:150-154.

Albor A, Kaku S, Kulesz-Martin M. Wild-type and mutant forms of p53 activate topoisomerase I: a possible mechanism for gain of function in mutants. *Cancer Res* 1998;58:2091-2094.

Albrechtsen N, Dornreiter I, Grosse F, Wiesmüller L, Deppert W. Maintenance of genomic integrity by p53: complementary roles for activated and non-activated p53. *Oncogene* 1999;18:7706-7717.

Andersen MK, Christiansen DH, Kirchoff M, Pedersen-Bjergaard J. Duplication or amplification of chromosome band 11q23, including the unrearranged MLL gene, is a recurrent abnormality in therapy-related MDS and AML, and is closely related to mutation of the TP53 gene and to previous therapy with alkylating agents. *Genes Chrom Cancer* 2001;31:33-41.

Andersen MK, Christiansen DH, Pedersen-Bjergaard J. Mutations with loss of heterozygosity of p53 are common in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia after exposure to alkylating agents and significantly associated with deletion or loss of 5q, a complex karyotype, and a poor prognosis. *J Clin Oncol* 2001;19:1405-1413.

Artandi SE, Chang S, Lee SL et al. Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice. *Nature* 2000;406:641-645.

Avigad S, Barel D, Blau O et al. A novel germ line p53 mutation in intron 6 in diverse childhood malignancies. *Oncogene* 1997; 14:1541-1545.

Baldini L, Fracchiolla NS, Cro LM et al. Frequent p53 gene involvement in splenic B-cell leukemia/lymphomas of possible marginal zone origin. *Blood* 1994; 84: 270-278.

Balint E, Reisman D. Increased rate of transcription contributes to elevated expression of the mutant p53 gene in Burkitt's lymphoma cells. *Cancer Res* 1996; 56: 1648-1653.

- Ballerini P, Gaidano G, Gonj C et al. Multiple genetic lesions in acquired immunodeficiency syndrome-related non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1993;81:166-176.
- Banin S, Moyal L, Shieh SY et al. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* 1998; 281: 1674-1679.
- Bell DW, Varley JM, Szydlo TE et al. Heterozygous germ-line mutations in Li-Fraumeni syndrome. *Science* 1999;286:2528-2531.
- Bertrand P, Ruillard D, Boulet A, Levalois C, Soussi T, López B. Increase of spontaneous intrachromosomal homologous recombination in mammalian cells expressing a mutant p53 protein. *Oncogene* 1997 ; 14 :117-1122
- Bhatia KG, Gutierrez MI, Huppi K, Siwarski D, Magrath IT. The pattern of p53 mutations in Burkitt's lymphoma differs from that of solid tumors. *Cancer Res* 1992; 52: 4273-4276.
- Bhatia K, Goldschmidts W, Gutierrez M, Gaidano G, Dalla-Favera R, Magrath I. Hemi- or homozygosity: a requirement for some but not other p53 mutant proteins to accumulate and exert a pathogenic effect. *FASEB J* 1993;7:951-956.
- Bhattacharya SK, Ramchandani S, Cervoni N, ZIF M. A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. *Nature* 1999; 397:579-583.
- Bigoni R, Cuneo A, Roberti MG et al. Therapy-related acute lymphoblastic leukaemia with t(4;11)(q21;q23):MLL rearrangement, p53 mutation and multilineage involvement. *Leukemia* 1999;13:704-707.
- Birch JM, Blair V, Kelsey AM et al. Cancer phenotype correlates with constitutional TP53 genotype in families with the Li-Fraumeni syndrome. *Oncogene* 1998;17:1061-1068.
- Blandino G, Levine AJ, Oren M. Mutant p53 gain of function: differential effects of different p53 mutants on resistance of cultured cells to chemotherapy. *Oncogene* 1999;18:477-485.
- Blau O, Avigad S, Stark B et al. Exon 5 mutation in the p53 gene in relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Leuk Res* 1997;21:721-729.
- Bonafe M, Olivier F, Mari D et al. p53 variants predisposing to cancer are present in healthy centenarians. *Am J Hum Genet* 1999;64:292-295.

Brachmann RK, Yu K, Eby Y, Pavletich NP, Boeke JD. Genetic selection of intragenic supresor mutations that reverse the effect of common p53 cancer mutations. *EMBO J* 1998;17:1847-1859.

Brachmann RK, Vidal M, Boeke JD. Dominant-negative p53 mutations selected in yeast hit cancer hot spots. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:4091-4095.

Britos-Bray M, Ramírez M, Cao W et al. CBF $\beta$ -SMMHC, expressed in M4Eo acute myeloid leukaemia , reduces p53 induction and slows apoptosis in hematopoietic cells exposed to DNA-damaging agents. *Blood* 1998; 92: 4344-4352.

Cameron EE, Bachman KE, Myöhänen S, Herman JG, Baylin SB. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nature Genet* 1999;21:103-107.

Caron de Fromentel C, May-levin F, Mouriesse H, Lemerle J, Chandrasekaran K, May P. Presence of circulating antibodies against cellular protein p53 in a notable proportion of children with B-cell lymphoma. *Int J Cancer* 1987;39:185-189.

Castro PD, Liang JC, Nagarajan L. Deletions of chromosome 5q13.3 and 17p loci cooperate in myeloid neoplasms. *Blood* 2000; 95: 2138-2143.

Cesarman E, Chadburn A, Inghirami G, Gaidano G, Knowles DM. Structural and functional analysis of oncogenes and tumor suppressor genes in adult T-cell leukemia/lymphoma shows frequent p53 mutations. *Blood* 1992;80:3205-3216.

Cesarman E, Inghirami G, Chadburn A, Knowles DM. High levels of p53 protein expression do not correlate with p53 gene mutations in anaplastic large cell lymphoma. *Am J Pathol* 1993; 143:845-856.

Clodi K, Younes A, Goodacre A et al. Analysis of p53 gene deletions in patients with non-Hodgkin's lymphom by dual-colour fluorescence *in-situ* hybridisation. *Br J Haematol* 1997; 98:913-921.

Cordone I, Masi S, Romana Mauro F et al. p53 expression in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: a marker of disease progression and poor prognosis. *Blood* 1998; 91:4342-4349.

Crawford LV, Pim DC, Bulbrook RD. Detection of antibodies against the cellular protein p53 in sera from patients with breast cancer. *Int J Cancer* 1982;30:403-408.

Crawford L. The 53.000-dalton cellular protein and its role in transformation. *Int Rev Exp Path* 1983; 25:1-50.

- Crook T, Parker GA, Rozycka M, Crossland S, Allday MJ. A transforming p53 mutant, which binds DNA, transactivates and induces apoptosis reveals a nuclear/cytoplasmic shuttling defect. *Oncogene* 1998;16:1429-1441.
- Cuneo A, De Angeli C, Roberti MG et al. Richter's syndrome in a case of atypical chronic lymphocytic leukaemia with the t(11 ;14)(q13 ;q32): role for a p53 exon 7 gene mutation. *Br J Haematol* 1996; 92:375-381.
- Chang C, Simmons DT, Martin MA, Mora PT. Identification and partial characterization of new antigens from simian virus-40 transformed mouse cells. *J Virol* 1979;31:463-471.
- Chen CY, Oliner JD, Zhan Q, Fornace AJ, Vogelstein B, Kastan MB. Interactions between p53 and MDM2 in a mammalian cell cycle checkpoint pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 2684-2688.
- Chen JX, Zheng Y, West M, Tang M. Carcinogens preferentially bind at methylated CpG in the p53 mutational hot spots. *Cancer Res* 1998; 58:2070-2075.
- Chen R, Petterson U, Beard C, Jackson-grusby L, Jaenisch R. DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature* 1998; 395:89-93.
- Cheng J, Yee JK, Yeargin J, Friedmann T, Haas M. Suppression of acute lymphoblastic leukemia by the human wild-type p53 gene. *Cancer Res* 1992; 52:222-226.
- Cherney BW, Bhatia KG, Sgadari C *et al.* Role of the tumor suppressor gene in the tumorigenicity of Burkitt's lymphoma cells. *Cancer Res* 1997; 57:2508-2515.
- Chin KV, Ueda K, Pastan I, Gottesman MM. Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by Ras and p53. *Science* 1992;255:459-462.
- Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* 1994;265:346-355.
- De Leo AB, Jay G, Appella E, Dubois GC, Law LW, Old LJ. Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:2420-2424.
- Denissenko MF, Chen JX, Tang M, Pfeifer GP. Cytosine methylation determines hot spots of DNA damage in the human p53 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3893-3898.

- Diamandidou E, Colome-Grimmer M, Fayad L, Duvic M, Kurzrock R. Transformation of mycosis fungoides/Sezary syndrome: clinical characteristics and prognosis. *Blood* 1998;92: 1150-1159.
- Dicciani MB, Yu J, Hsiao M, Mukherjee S, Shao LE, Yu AL. Clinical significance of p53 mutations in relapsed T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1994, 84:3105-3112.
- Dittmer D, Pati S, Zambetti G et al. Gain of function mutations in p53. *Nature Genet* 1993;4:42-46.
- Donehower LA, Harvey M, Slagle BL et al. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 1992;356:215-221.
- Döhner H, Fischer K, Bentz M et al. P53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood* 1995; 85:1580-1589.
- Doussis IA, Pezzella F, Lane DP, Gatter KC, Mason DY. An immunocytochemical study of p53 and bcl-2 protein expression in Hodgkin's disease. *Am J Clin Pathol* 1993; 99:663-667.
- Drach J, Ackermann J, Fritz E et al. Presence of a p53 gene deletion in patients with multiple myeloma predicts for short survival after conventional-dose chemotherapy. *Blood* 1998;92:802-809.
- Drexler H. Malignant hematopoietic cell lines: in vitro models for the study of myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 1999; 24:109-115.
- Du M, Peng H, Singh N, Isaacson PG, Pan L. The accumulation of p53 abnormalities is associated with progression of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Blood* 1995;86:4587-4593.
- Dullea RG, Robinson JF, Bedford JS. Nonrandom degradation of DNA in human leukemic cells during radiation-induced apoptosis. *Cancer Res* 1999;59:3712-3718.
- Eischen CM, Weber JD, Roussel MF, Sherr CJ, Cleveland JL. Disruption of the ARF-Mdm2-p53 tumor suppressor pathway in Myc-induced lymphomagenesis. *Genes Dev* 1999; 13:2658-2669.
- Epstein CB, Attiyeh EF, Hobson DA, Silver AL, Broach JR, Levine AJ. P53 mutations isolated in yeast based on loss of transcription factor activity: similarities and differences from p53 mutations detected in human tumors. *Oncogene* 1998;16:2115-2122.
- Farrugia MM, Duan LJ, Reis MD, Ngan BY, Berinstein N. Alterations of the p53 tumor suppressor gene in diffuse large cell lymphomas with translocations of the c-myc and bcl-2 proto-oncogenes. *Blood* 1994;83:191-198.

- Felix CA, Megonigal MD, Chervinsky DS et al. Association of germline p53 mutation with *MLL* segmental jumping translocation in treatment-related leukaemia. *Blood* 1998;91:4451-4456.
- Felix CA, Nau MN, Takahashi T et al. Hereditary and acquired p53 gene mutations in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest* 1992; 89: 640-647.
- Felix CA, Wasserman R, Lange BJ et al. Differentiation stages of childhood acute lymphoblastic leukemias with p53 mutations. *Leukemia* 1994; 8:963-967.
- Felix CA, D'Amico D, Mitsudomi T et al. Absence of hereditary p53 mutations in 10 familial leukemia pedigrees. *J Clin Invest* 1992; 90: 653-658.
- Fenaux P, Preudhomme C, Lai JL et al. Mutations of the p53 gene in B-cell chronic lymphocytic leukemia : a report on 39 cases with cytogenetic analysis. *Leukemia* 1992; 6:246-250.
- Fioretos T, Strombeck B, Sandberg et al. Isochromosome 17q in blast crisis of chronic myeloid leukemia and in other hematologic malignancies is the result of clustered breakpoints in 17p11 and is not associated with coding TP53 mutations. *Blood* 1999; 94:225-232.
- Flaman JM, Robert V, Lenglet S, Moreau V, Iggo R, Frebourg T. Identification of human p53 mutations with differential effects on the bax and p21 promoters using functional assays in yeast. *Oncogene* 1998;16:1369-1372.
- Fonatsch C, Gudat H, Lengfelder E et al. Correlation of cytogenetic findings with clinical features in 18 patients with inv(3) (q21;q26) or t(3;3)(q21;q26). *Leukemia* 1994;8:1318-1326.
- Frebourg T, Kassel J, Lam KT et al. Germ-line mutations of the p53 tumor suppressor gene in patients with high risk for cancer inactivate the p53 protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:6413-6417.
- Frebourg T, Friend SH. Cancer risks from germline p53 mutations. *J Clin Invest* 1992;90:1637-1641.
- Fu L, Minden MD, Benchimol S. Translational regulation of human p53 gene expression. *EMBO J* 1996;15:4392-4401.
- Fuchs SY, Adler V, Pincus MR, Ronai Z. MEKK1/JNK signalling stabilizes and activates p53. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:10541-10546.
- Fukasawa K, Choi T, Kuriyama R, Rulong S, Woude FV: Abnormal centrosome amplification in the absence of p53. *Science* 1996; 271: 1744-1747.



- Gaidano G, Ballerini P, Gong JZ et al. p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:5413-5417.
- Gaidano G, Guerrasio A, Serra A et al. Mutations in the p53 and RAS family genes are associated with tumor progresión of BCR/ABL negative chronic myeloproliferative disorders. *Leukemia* 1993; 7: 946-953.
- Gale KB, Ford AM, Repp R et al. Backtracking leukaemia to birth: Identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:13950-13954.
- Gandini D, Cuneo A, Carli MG, Lanza F, Castoldi GL, Del Senno L. Total loss of p53 DNA sequences in acute myeloid leukaemia. *Leuk Res* 1994; 18:63-65.
- Gandini D, Aguiari GL, Cuneo A, Piva R, Castoldi GL, Del Senno L. Novel small deletions of the p53 gene in late-stage B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1994; 88:881-885.
- Gao Y, Ferguson DO, Xie W et al. Interplay of p53 and DNA-repair protein XRCC4 in tumorigenesis, genomic stability and development. *Nature* 2000;404:897-900.
- Gebow D, Miselis N, Liber HL. Homologous and nonhomologous recombination resulting in deletion: effects of p53 status, microhomology, and repetitive DNA length and orientation. *Mol Cell Biol* 2000;20:4028-4035.
- Geisler CH, Philip P, Christensen BE et al. In B-cell chronic lymphocytic leukaemia chromosome 17 abnormalities and not trisomy 12 are the single most important cytogenetic abnormalities for the prognosis: a cytogenetic and immunophenotypic study of 480 unselected newly diagnosed patients. *Leuk Res* 1997; 21:1011-1023.
- Ginsberg D, Mechta F, Yaniv M, Oren M. Wild-type p53 can down-modulate the activity of various promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 991;88:9979-9983.
- Gobert C, Skladanowski A, Larsen ak. The interaction between p53 and DNA topoisomerase I is regulated differently in cells with wild-type and mutant p53. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96: 10355-10360.
- Golub TR, Barker GF, Bohlander SK et al. Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukaemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:4917-4921.
- Gottifredi V, Shieh SY, Taya C, Prives C. P53 accumulates but is functionally impaired when DNA synthesis is blocked. *Proc Natl Acad Sci USA*;2001;98:1036-1041.

- Greenblatt MS, Grollman AP, Harris CC. Deletions and insertions in the p53 tumor suppressor gene in human cancers: confirmation of the DNA polymerase slippage/misalignment model. *Cancer Res* 1996; 56:2130-2136.
- Greiner TC, Moynihan MJ, Chan WC et al. P53 mutations in mantle cell lymphoma are associated with variant cytology and predict a poor prognosis. *Blood* 1996; 87:4302-4310.
- Gronbaek K, de Nully Brown P, Moller MB et al. Concurrent disruption of p16<sup>INK4a</sup> and the ARF-p53 pathway predicts poor prognosis in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia* 2000; 14:1727-1735.
- Gruszka-Westwood AM, Hamoudi RA, Matutes E, Tuset E, Catovsky D. p53 abnormalities in splenic lymphoma with villous lymphocytes. *Blood* 2001;97:3552-3558.
- Gu W, Shi XL, Roeder RG. Synergistic activation of transcription by CBP and p53. *Nature* 1997;387:819-823.
- Gualberto A, Aldape K, Kozakiewicz K, Tlsty TD. An oncogenic form of p53 confers a dominant , gain-of-function phenotype that disrupts spindle checkpoint control. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:5166-5171.
- Gupta RK, Patel K, Bodmer WF, Bodmer JG. Mutation of p53 in primary biopsy material and cell lines from Hodgkin disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:2817-2821.
- Haber D, Harlow E. Tumour-suppressor genes: evolving definitions in the genomic age. *Nature Genet* 1997;16:320-322.
- Hann BC, Lane DP. The dominating effect of mutant p53. *Nature Genet* 1995; 9:221-222.
- Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the clinical advisory committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* 1999;17:3835-3849.
- Harris NL, Jaffe ES, Stein H et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma study group. *Blood* 1994;84:1361-1392.
- Harris CC. The 1995 Walter Hubert Lecture-molecular epidemiology of human cancer: insights from the mutational análisis of the p53 tumour- suppressor gene. *Br J Cancer* 1996;73:261-269.
- Hashimoto T, Tokuchi Y, Hayashi M et al. p53 null mutations undetected by immunohistochemical staining predict a poor outcome with early-stage non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res* 1999;59:5572-5577.

- Hernández L, Fest T, Cazorla M et al. P53 gene mutations and protein overexpression are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas. *Blood* 1996; 87:3351-3359.
- Hirao A, Kong YY, Matsuoka S et al. DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science* 2000;287:1824-1827.
- Hofmann WK, Miller CW, Tsukasaki K et al. Mutation analysis of the DNA-damage checkpoint gene CHK2 in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias. *Leuk Res* 2001;25:333-338.
- Holliday R, Ho T. Evidence for gene silencing by endogenous DNA methylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:8727-8732.
- Horiike S, Misawa S, Kaneko H et al. Distinct genetic involvement of the TP53 gene in therapy-related leukaemia and myelodysplasia with chromosomal losses of Nos 5 and/or 7 and its possible relationship to replication error phenotype. *Leukemia* 1999;13:1235-1242.
- Horiike S, Misawa S, Kaneko H et al. Distinct genetic involvement of the TP53 gene in therapy-related leukaemia and myelodysplasia with chromosomal losses of Nos 5 and/or 7 and its possible relationship to replication error phenotype. *Leukemia* 1999;13:1235-1242.
- Hu G, Zhang W, Deisseroth AB. P53 gene mutations in acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol* 1992;81:489-494.
- Huang LC, Clarkin KC, Wahl GM. Sensitivity and selectivity of the DNA damage sensor responsible for activating p53-dependent G1 arrest. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996: 93:4827-4832.
- Hussain SP, Harris CC. Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. *Cancer Res* 1998;58:4023-4037.
- Hwang BJ, Ford JM, Hanawalt PC, Chu G. Expression of the p48 xeroderma pigmentosum gene is p53-dependent and is involved in global genomic repair. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:424-428.
- Ichikawa A, Kinoshita T, Watanabe T et al. Mutations of the p53 gene as a prognostic factor in aggressive B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 1997; 337:529-534.
- Ichikawa A, Hotta T, Takagi N et al. Mutations of p53 gene and their relation to disease progression in B-cell lymphoma. *Blood* 1992;79:2701-2707.
- Imamura J, Miyoshi I, Koeffler P. P53 in hematologic malignancies. *Blood* 1994;84:2412-2421.

- Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993;363:558-561.
- Jenab-Wolcott J, Rodríguez-Correa D, Reitmair AH, Mak T, Rosenberg N. The absence of Msh2 alters abelson virus pre-B-cell transformation by influencing p53 mutation. *Mol Cell Biol* 2000;20:8373-8381.
- Jianyuan L, Delin S, Shiloh A, Wei G. Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis. *Nature* 2000; 408:377-381.
- Jiménez GS, Bryntesson F, Torres-Arzayus MI et al. DNA-dependent protein kinase is not required for p53-dependent response to DNA damage. *Nature* 1999;400:81-83.
- Jiménez GS, Nister M, Stommel JM et al. A transactivation-deficient mouse model provides insights into Trp53 regulation and function. *Nature Genet* 2000;26:37-43.
- Jonason AS, Kunala S, Price GJ et al. Frequent clones of p53-mutated keratinocytes in normal human skin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:14025-14029.
- Kanavaros P, Lescs MC, Brière J et al. Nasal T-cell lymphoma: a clinicopathologic entity associated with peculiar phenotype and with Epstein-Barr virus. *Blood* 1993;81:2688-2695.
- Kamijo T, Zindy F, Roussel MF et al. Tumor suppression at the Mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product P19<sup>ARF</sup>. *Cell* 1997;91:649-659.
- Kawamura M, Ohnishi H, Guo SX et al. Alterations of the p53, p21, p16, p15 and RAS genes in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 1999; 23:115-126.
- Kemp CJ, Wheldon T, Balmain A. p53-deficient mice are extremely susceptible to radiation-induced tumorigenesis. *Nature Genet* 1994;8:66-69.
- Kern SE, Pietsenpol JA, Thiagalingam S, Seymour A, Kinzler KE, Vogelstein B. Oncogenic forms of p53-inhibit p53-regulated gene expression. *Science* 1992; 256:827-830.
- Kikukawa M, Aoki N, Mori M. A case of myelodysplastic syndrome with an intronic point mutation of the p53 tumor suppressor gene at the splice donor site. *Br J Haematol* 1998; 100:564-566.
- Kinzler KW; Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996;87:159-170.

- Kinzler KW; Vogelstein B. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 1997;386:761-762.
- Kinzler KW; Vogelstein B. Life (and death) in a malignant tumour. *Nature* 1996;379:19-20.
- Knudson AG. Mutation and cancer. Statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971;68:820-826.
- Knudson AG. Antioncogenes and human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:10914-10921.
- Kocialkowski S, Pezzella F, Morrison H 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* 1995;89:55-60.
- Koduru PRK, Raju K, Vadmal V et al. Correlation between mutation in p53,p53 expression, cytogenetics, histologic type, and survival in patients with B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997; 90:4078-4091.
- Konig EA, Kusser WC, Day C et al. P53 mutations in hairy cell leukemia. *Leukemia* 2000; 14:706-711.
- Krawzack M, Smith-Sorensen B, Schmidtke J, Kakkar VV, Cooper DN, Hovig E. Somatic spectrum of cancer-associated single base pair substitutions in the TP53 gene is determined by endogenous mechanisms of mutation and selection. *Hum Mutat* 1995;5:48-57.
- Kuerbitz SJ, Plunkett BS, Walsh WV, Kastan MB. Wild-type p53 is a cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:7491-7495.
- Kurosawa M, Okabe M, Kunieda Y, Asaka M. Analysis of the p53 gene mutations in acute myelogenous leukemia: the p53 gene mutations associated with a deletion of chromosome 17. *Ann Hematol* 1995; 71:83-87.
- Kurosawa M, Okabe M, Kunieda Y, Miyazaki T. P53 gene mutation in the chronic phase was not detected in the myeloid crisis of a chronic myelocytic leukemia case. *Blood* 1994;83:2750-2.
- Lakin ND, Jackson SP. Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene* 1999; 18:7644-7655.
- Lane DP, Crawford LV. T-antigen is bound to host protein in SV40 transformed cells. *Nature* 1979;278:261-263.
- Lassus P, Bertrand C, Zugasti O et al. Anti-apoptotic activity of p53 maps to the COOH-terminal domain and is retained in a highly oncogenic natural mutant. *Oncogene* 1999;18:4699-4709.
- Lauritzen AF, Vejlsgaard GL, Hou-Jensen K, Ralfkaier E. p53 protein expression in cutaneous T-cell lymphomas. *Br J Dermatol* 1995;133:32-36.

- Lee S, Elenbaas B, Levine A, Griffith J. p53 and its 14 kDa C-terminal domain recognize primary DNA damage in the form of insertion/deletion mismatches. *Cell* 1995; 81:1013-1020.
- Lens D, Dyer MJS, García-Marco JM et al. P53 abnormalities in CLL are associated with excess of prolymphocytes and poor prognosis. *Br J Haematol* 1997; 99: 848-857.
- Lens D, De Schouwer JJC, Hamoudi RA et al. P53 abnormalities in B-cell prolymphocytic leukemia. *Blood* 1997; 89:2015-2023.
- Lens D, Coignet LJA, Brito-Babapulle V et al. B cell prolymphocytic leukaemia (B-PLL) with complex karyotype and concurrent abnormalities of the p53 and c-Myc gene. *Leukemia* 1999; 13:873-876.
- Levine AJ. P53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997;88:323-331.
- Li CCh, O'Connell CD, Beckwith M, Longo DL. Detection of p53 mutations in B-cell non-Hodgkin's lymphoma cell lines. *Leukemia* 1995;9:650-655.
- Li T, Hongyo T, Syafudin M et al. Mutations of the p53 gene in nasal NK / T-cell lymphoma. *Lab Invest* 2000; 80: 493-499.
- Linzer DIH, Levine AJ. Characterization of a 54 K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV-40 transformed cells and in infected embryonal carcinoma cells. *Cell* 1979;1:43-52.
- Liu PK, Kraus E, Wu TA, Strong LC, Tainsky MA. Analysis of genomic instability in Li-Fraumeni fibroblasts with germline p53 mutations. *Oncogene* 1996;12:2267-2278.
- Livingstone LR, White nA, Sprouse J, Livanos E, Jacks T, Tlsty TD. Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild type p53. *Cell* 1993;70:923-935.
- Lo Coco F, Gaidano G, Louie DC, Offit K, Chaganti RSK, Dalla-Favera R. p53 mutations are associated with histologic transformation of follicular lymphoma. *Blood* 1993; 82:2289-2295.
- Longo L, Trecca D, Biondi A et al. Frequency of RAS and p53 mutations in acute promyelocytic leukemias. *Leukemia and Lymphoma* 1993: 11:405-410.
- Luie DC, Offit K, Jaslow R et al. p53 overexpression as a marker of poor prognosis in mantle cell lymphomas with t(11;14)(q13;q32). *Blood* 1995;86:2892-2899.

- Maestro R, Gloghini A, Doglioni C et al. Human non-Hodgkin's lymphomas overexpress a wild-type form of p53 which is a functional transcriptional activator of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Blood* 1997; 89: 2523-2528.
- Maki K, Mitani K, Yamagata T et al. Transcriptional inhibition of p53 by the MLL/MEN chimeric protein found in myeloid leukemia. *Blood* 1999;93:3216-3224.
- Malkin D, Li FP, Strong LC et al. Germ-line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 1990;250:1233-1238.
- Marin MC, Jost CA, Brooks LA et al. A common polymorphism act as an intragenic modifier of mutant p53 behaviour. *Nat Genet* 2000; 25:47-53.
- Marino S, Vooijs M, van der Gulden H, Jonker J, Berns A. Induction of medulloblastomas in p53-null mutant mice by somatic inactivation of Rb in the external granular layer cells of the cerebellum. *Genes Dev* 2000;14:994-1004.
- Marks DI, Kurz BW, Link MP et al. High incidence of potential p53 inactivation in poor outcome childhood acute lymphoblastic leukemia at diagnosis. *Blood* 1996, 87:1155-1161.
- Martin A, Flaman JM, Frebourg T et al. Functional analysis of the p53 protein in AIDS-related non-Hodgkin's lymphomas and polymorphic lymphoproliferations. *Br J Haematol* 1998; 101:311-317.
- Martínez-Delgado B, Robledo M, Arranz E et al. Correlation between mutations in p53 gene and protein expresión in human lymphomas. *Am J Hematol* 1997; 55:1-8.
- Matozaki S, Nakagawa T, Kawaguchi R et al. Establishment of a myeloid leukaemic cell line (SKNO-1) from a patient with t(8;21) who acquired monosomy 17 during disease progression. *Br J Haematol* 1995; 89: 805-811.
- May P, May E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene* 1999;18:7621-7636.
- Mazars GR, Portier M, Zhang XG et al. Mutations of the p53 gene in human myeloma cell lines. *Oncogene* 1992;7:1015-1018.
- McGregor JM, Crook T, Fraser-Andrews A et al. Spectrum of p53 gene mutations suggests a possible role for ultraviolet radiation in the pathogenesis of advanced cutaneous lymphomas. *J Invest Dermatol* 1999;112:317-321.

- Mekeel KL, Tang W, Kachnic LA et al. Inactivation of p53 results in high rates of homologous recombination. *Oncogene* 1997;14:1847-1857.
- Melero JA, Stitt DT, Mangel WF, Carroll RB. Identification of new polypeptide species (48-55K) immunoprecipitable by antiserum to purified large T antigen and present in simian virus 40-infected and transformed cells. *J Virol* 1979;93:466-480.
- Megonigal M, Rappaport EF, Nowell PC, Lange BJ, Felix CA. Potential role for wild-type p53 in leukemias with MLL gene translocations. *Oncogene* 1998;16:1351-1356.
- Merlat A, Lai JL, Sterkers Y, Demory JL, Bauters F, Preudhomme C, Fenaux P. Therapy-related myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukaemia with 17p deletion. A report on 25 cases. *Leukemia* 1999; 13:250-257.
- Metz T, Harris AW, Adams JM. Absence of p53 allows direct immortalization of hematopoietic cells by the myc and raf oncogenes. *Cell* 1995;82:29-36.
- Milner J, Medcalf EA. Cotranslation of activated mutant p53 with wild type drives the wild-type p53 protein into the mutant conformation. *Cell* 1991;65:765-774.
- Misawa S, Horiike S, Kaneko H et al. Significance of chromosomal alterations and mutations of the N-ras and TP53 genes in relation to leukemogenesis of acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 1998; 22:631-637.
- Miyauchi J, Asada M, Tsunematsu Y, Kaneko Y, Kojima S, Mizutani S. Abnormalities of the p53 gene in juvenile myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1999;106:980-986.
- Moller MB, Ino Y, Gerdes AM, Skjodt K, Louis DN, Pedersen NT. Aberrations of the p53 pathway components p53, MDM2 and CDKN2A appear independent in diffuse large B cell lymphoma. *Leukemia* 1999;13:453-459.
- Montesinos-Rongen M, Roers A, Kuppers R, Rajewski K, Hansmann ML. Mutation of the p53 gene is not a typical feature of Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. *Blood* 1999; 94:1755-1760.
- Mrozek K, Heinonen K, Lawrence D et al. Adult patients with de novo acute myeloid leukaemia and t(9;11)(p22;q23) have a superior outcome to patients with other translocations involving band 11q23: a cancer and leukaemia B study. *Blood* 1997;90:4532-4538.
- Müller BF, Paulsen D, Deppert W. Specific binding of MAR/SAR DNA-elements by mutant p53. *Oncogene* 1996;12:1941-1952.



Mummenbrauer T, Janus F, Müller B, Wiesmüller L, Deppert W, Grosse F. p53 protein exhibits 3'-to-5' exonuclease activity. *Cell* 1996 ;85:1089-1099.

Nakai H, Misawa S, Toguchida J, Yandell DW, Ishizaki K. Frequent p53 gene mutations in blast crisis of chronic myelogenous leukaemia, especially in myeloid crisis harbouring loss of a chromosome 17p. *Cancer Res* 1992;52:6588- 6593.

Nakai H, Misawa S, Tanaka S et al. p53 gene mutations and loss of a chromosome 17p in Philadelphia Chromosome (Ph<sup>+</sup>) -positive acute leukaemia. *Leukemia* 1993; 7:1547-1551.

Nakano Y, Kiyoi H, Miyawaki S, Asou N, Ohno R, Saito H, Naoe T. Molecular evolution of acute myeloid leukaemia in relapse: unstable N-ras and FLT-3 genes compared with p53 gene. *Br J Haematol* 1999; 104:659-664.

Nakano Y, Naoe T, Kiyoi H et al. Prognostic value of p53 gene mutations and the product expression in *de novo* acute myeloid leukaemia. *Eur J Haematol* 2000;65:23-31.

Nakano Y, Naoe T, Kiyoi H et al. Poor clinical significance of p53 gene polymorphism in acute myeloid leukaemia. *Leuk Res* 2000; 24:349-352.

Neubauer A, He M, Schmidt CA, Huhn D, Liu ET. Genetic alterations in the p53 gene in the blast crisis of chronic myelogenous leukaemia: analysis by polymerase chain reaction based techniques. *Leukemia* 1993; 7:593-600.

Newcomb EW. P53 gene mutations in lymphoid diseases and their possible relevance to drug resistance. *Leukemia and Lymphoma* 1995;17:211-221.

Nicol CJ, Harrison ML, Laposa RR, Gimelshtein IL, Wells PG. A teratologic suppressor role for p53 in benzo(a)pyrene-treated transgenic p53-deficient mice. *Nature Genet* 1995;10:181-187.

Ollmann M, Young LM, Di Como CJ et al. *Drosophila* p53 is a structural and functional homolog of the tumor suppressor p53. *Cell* 2000;101:91-101.

Ottaggio L, Moro F, Fronza G et al. Derivative chromosome 17 in a case of Burkitt lymphoma with 8;14 translocation. *Cancer Genet Cytogenet* 1999;110:1-6.

Padua RA, Guinn BA, Al-Sabah A et al. RAS, FMS and p53 mutations and poor clinical outcome in myelodysplasias: a 10-year follow up. *Leukemia* 1998; 12:887-892.

- Palmero I, Pantoja C, Serrano M. p19<sup>ARF</sup> links the tumour supresor p53 to RAS. *Nature* 1998;395:125-126.
- Peller S, Yona R, Kopilova Y et. al. Molecular alterations in the TP53 gene of peripheral blood cells of patients with chronic myeloid leukaemia. *Genes Chrom Cancer* 1998; 21: 2-7.
- Piller GJ. Leukaemia- a brief historical review from ancient times to 1950. *Br J Haematol* 2001;112:282-292.
- Piris MA, Villuendas R, Martínez JC et al. P53 expression in non-Hodgkin´s lymphomas : a marker of p53 inactivation ? *Leukemia Lymphoma* 1995;17:35-42.
- Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liégeois NJ et al. The Ink4a tumor supresor gene product P19<sup>ARF</sup>, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2´s inhibition of p53. *Cell* 1998;92:713-723.
- Preudhomme C, Dervite I, Wattel E et al. Clinical significance of p53 mutations in newly diagnosed Burkitt´s lymphoma and acute lymphoblastic leukaemia: a report of 48 cases. *J Clin Oncol* 1995; 13:812-820.
- Preudhomme C, Vanrumbeke M, Detourmignies L et al. Very low incidence of p53 antibodies in adult non-Hodgkin´s lymphoma and multiple myeloma. *Br J Haematol* 1998;100:184-186.
- Prives C. Signaling to p53: breaking the MDM2-p53 circuit. *Cell* 1998;95:5-8.
- Prokocimer M, Rotter V. Structure and function of p53 in normal cells and their aberrations in cancer cells:projection on the hematologic cell lineages. *Blood* 1994;84:2391-2411.
- Radfar A, Unnikrishnan I, Lee HW, DePinho R, Rosenberg N. P19<sup>ARF</sup> induces p53-dependent apoptosis during Abelson-mediated pre-B cell transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:13194-13199.
- Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, Reed JC, Perucho M. Somatic mutations into the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* 1997;275:967-969.
- Reilly KM, Loisel DA, Bronson RT, McLaughlin ME, Jacks T. Nf1 ;Trp53 mutant mice develop glioblastoma with evidence of strain-specific effects. *Nature Genet* 2000;26:109-113.
- Rivas CI, Wisniewski D, Strife A et al. Constitutive expression of p53 protein in enriched normal human bone marrow blast cell populations. *Blood* 1992; 79: 1982-1986.
- Rodin SN, Rodin AS. Strand asymmetry of CpG transitions as indicator of G1 phase-dependent origin of múltiple tumorigenic p53 mutations in stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:11927-11932.

- Rodríguez MA, Ford RJ, Goodrace A, Selvanyagam P, Cabanillas F, Deisseroth AB. Chromosome 17p and p53 changes in lymphoma. *Br J Haematol* 1991; 79:575-582.
- Rolley N, Butcher S, Milner J. Specific DNA binding by different classes of human p53 mutants. *Oncogene* 1995;11:763-770.
- Romana SP, Poirel H, Leconiat M et al. High frequency of t(12 ;21) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukaemia. *Blood* 1995;86:4263-4269.
- Sah VP, Arradi LD, Mulligan GJ, Williams BO, Bronson RT, Jacks T. A subset of p53-deficient embryos exhibit exencephaly. *Nature Genet* 1995;10:175-180.
- Sander CA, Yano T, Clark HM et al. P53 mutation is associated with progression in follicular lymphomas. *Blood* 1993;82:1994-2004.
- Sands AT, Suraokar MB, Sánchez A, Marth JE, Donehower LA, Bradley A. P53 deficiency does not affect the accumulation of point mutations in a transgene target. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:8517-8521.
- Schmitt CA, McCurrach ME, Stanchina E, Wallace-Brodeur RR, Lowe SW. *INK4a* /ARF mutations accelerate lymphomagenesis and promote chemoresistance by disabling p53. *Genes Dev* 1999;13: 2670-2677.
- Schottelius A, Brennscheidt U, Ludwig WD et al. Mechanisms of p53 alterations in acute leukemias. *Leukemia* 1994; 8:1673-1681.
- Scutte J, Opalka B, Becher R et al. Analysis of the p53 gene in patients with isochromosome 17q and Ph-positive or negative myeloid leukemia. *Leuk Res* 1993;17:533-539.
- Seliger B, Papadileris S, Vogel D et al. Analysis of the p53 and MDM-2 gene in acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol* 1996; 57:230-240.
- Serra A, Gaidano G, Revello D et al. A new TaqI polymorphism in the p53 gene. *Nucleic Acids Res* 1992;20:928.
- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16<sup>INK4a</sup>. *Cell* 1997;88:593-602.
- Shaw GR, Kronberger DL. TP53 deletions but not trisomy 12 are adverse in B-cell lymphoproliferative disorders. *Cancer Genet Cytogenet* 2000; 119:146-154.
- Sherr CJ. The Pezcoller Lecture: Cancer cell cycles revisited. *Cancer Res* 2000; 60:3689-3695.

- Shiio Y, Yamamoto T, Yamaguchi N. Negative regulation of Rb expression by the p53 gene product. Proc Natl Acad Sci USA 1992;89:5206-5210.
- Shipp MA, Harrington DP *et al.* The International Non-Hodgkin's lymphoma prognostic factors project: a predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. N Engl J Med 1993;329:987-994.
- Sigalas I, Calvert H, Anderson JJ, Neal DE, Lunec J. Alternatively spliced mdm2 transcripts with loss of p53 binding domain sequences: transforming ability and frequent detection in human cancer. Nature Med 1996;2:912-917.
- Simms LA, Radford-Smith G, Biden KG *et al.* Reciprocal relationship between the tumor suppressors p53 and BAX in primary colorectal cancers. Oncogene 1998;17:2003-2008.
- Skorski T, Nieborowska-Skorska M, Wlodarski P *et al.* Blastic transformation of p53-deficient bone marrow cells by p210<sup>bcr/abl</sup> tyrosine kinase. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:13137-13142.
- Slingerland JM, Minden MD, Benchimol S. Mutation of the p53 gene in human acute myelogenous leukemia. Blood 1991; 77:1500-1507.
- Soenen V, Preudhomme C, Roumier C, Daudignon A, Lai JL, Fenaux P. 17p deletion in acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndrome. Analysis of breakpoints and deleted segments by fluorescence in situ. Blood 1998; 91: 1008-1015
- Soengas MS, Alarcón RM, Yoshida H *et al.* Apaf-1 and Caspase-9 in p53-dependent apoptosis and tumor inhibition. Science 1999; 284: 156-158.
- Soler J. Contribució dels estudis immunocitoquímics i immunogenotípics al diagnòstic i classificació de les leucèmies agudes. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona 1989.
- Srivastava S, Zou Z, Pirolo K, Blattner W, Chang EH. Germ-line transmission of a p53 mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. Nature 1990;348:747-749.
- Stanulla M, Wang J, Chervinsky DS, Thandla S, Aplan PD. DNA cleavage within the MLL breakpoint cluster region is a specific event which occurs as part of higher-order chromatin fragmentation during the initial stages of apoptosis. Mol Cell Biol 1997;17:4070-4079.

- Sterkers Y, Preudhomme C, Lai JL et al. Acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes following essential thrombocythemia treated with hydroxyurea : high proportion of cases with 17p deletion. *Blood* 1998;91:616-622.
- Stilgenbauer S, Döhner K, Bentz M, Lichter P, Döhner H. Molecular cytogenetic analysis of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Ann Hematol* 1998;76:101-110.
- Stock W, Tsai T, Golden C et al. Cell cycle regulatory gene abnormalities are important determinants of leukemogenesis and disease biology in adult acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000;95:2364-2371.
- Storey A, Thomas M, Kalita A et al. Role of a p53 polymorphism in the development of human papilloma-virus-associated cancer. *Nature* 1998; 393:229-234.
- Sugimoto K, Toyoshima H, Sakai R et al. Frequent mutations in the p53 gene in human myeloid leukemia cell lines. *Blood* 1992; 79:2378.
- Sugrue MM, Shin DY, Lee SW, Aaronson SA. Wild-type p53 triggers a rapid senescence program in human tumor cells lacking functional p53. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:9648-9653.
- Tao W, Levine AJ. P19<sup>ARF</sup> stabilizes p53 by blocking nucleo-cytoplasmic shuttling of Mdm2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:6937-6941.
- Tao W, Levine AJ. Nucleocytoplasmic shuttling of oncoprotein Hdm2 is required for Hdm2-mediated degradation of p53. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:3077-3080.
- Takemoto S, Trovato R, Cereseto A et al. p53 stabilization and functional impairment in the absence of genetic mutation or the alteration of the p14(ARF)-MDM2 loop in ex vivo and cultured adult T-cell leukaemia/lymphoma cells. *Blood* 2000;95:3939-3944.
- Tang JL, Tien HF, Lin MT, Chen PJ, Chen YC. Frequent p53 mutation in relapsed acute lymphoblastic leukaemia with cytogenetic instability: a longitudinal analysis. *Anticancer Res* 1998;18:1273-1278.
- Tapinos NI, Polihronis M, Moutsopoulos HM. Lymphoma development in Sjogren's syndrome. Novel p53 mutations. *Arthritis Rheum* 1999;42:1466-1472.
- Taylor WR, Agarwal ML, Agarwal A, Stacey DW, Stark GR. P53 inhibits entry into mitosis when DNA synthesis is blocked. *Oncogene* 1999; 18:283-295.

- Trecca D, Longo L, Biondi A et al. Analysis of p53 gene mutations in acute myeloid leukemia. *Am J Hematol* 1994; 46:304-309.
- Trumper LH, Brady G, Bagg A et al. Single-cell analysis of Hodgkin and Reed-Sternberg cells: molecular heterogeneity of gene expression and p53 mutations. *Blood* 1993; 81:3097-3115.
- Tsai T, Davalath S, Rankin C et al. Tumor suppressor gene alteration in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL). Analysis of retinoblastoma (Rb) and p53 gene expression in lymphoblasts of patients with *de novo*, relapsed, or refractory ALL treated in Southwest Oncology Group studies. *Leukemia* 1996;10:1901-1910.
- Ueda H, Ullrich SJ, Gangemi JD et al. Functional inactivation but not structural mutation of p53 causes liver cancer. *Nature Genet* 1995;9:41-47.
- Varley JM, Chapman P, McGown G et al. Genetic and functional studies of a germline TP53 splicing mutation in a Li-Fraumeni-like family. *Oncogene* 1998;16:3291-3298.
- Varley JM, McGown G, Thorncroft M et al. A previously undescribed mutation within the tetramerisation domain of TP53 in a family with Li-Fraumeni síndrome. *Oncogene* 1996;12:2437-2442.
- Varley JM, McGown G, Thorncroft M et al. Germ-line mutations of TP53 in Li-Fraumeni families: an extended study of 39 families. *Cancer Res* 1997;57:3245-3252.
- Venkatachalam S, Shi YP, Jones SN et al. Retention of wild-type p53 in tumors from p53 heterozygous mice : reduction of p53 dosage can promote cancer formation. *EMBO J* 1998;16:4657-4667.
- Villuendas R, Piris MA, Algara P et al. The expression of p53 protein in non-Hodgkin's lymphomas is not always dependent on p53 mutations. *Blood* 1993;82:3151-3156.
- Vogelstein B. A deadly inheritance. *Nature* 1990;348:681-682.
- Vogelstein B, Kinzler KW. P53 function and dysfunction. *Cell* 1992;70:523-526.
- Vogelstein B, Kinzler KW(Eds). *The genetic basis of human cancer*. McGraw Hill, New York.1998.
- Wada M, Bartram CR, Nakamura H et al. Analysis of p53 mutations in a large series of lymphoid hematologic malignancies of childhood. *Blood* 1993; 82: 3163-3169.
- Walker KK, Levine AJ. Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc Natl Acad Sci USA*;1996;93:15335-15340.

Walworth NC, Bernards R. *rad*-dependent response of the *chk1*-encoded protein kinase at the DNA damage checkpoint. *Science* 1996;271:1353-1356.

Wang P, Spielberger RT, Thangavelu M et al. Dic(15;17): a recurring abnormality in malignant myeloid disorders associated with mutations of TP53. *Genes Chrom Cancer* 1997; 20:282-291.

Waterman MJF, Stavridi ES, Waterman JLF, Halazonetis TD. ATM-dependent activation of p53 involves dephosphorylation and association with 14-3-3 proteins. *Nature Genet* 1998;19:175-178.

Wattel E, Preudhomme C, Hecquet B et al. P53 mutations are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematologic malignancies. *Blood* 1994;84:3148-3157.

Weintraub M, Lin AY, Franklin J, Tucker M, Magrath IT, Bhatia KG. Absence of germline p53 mutations in familial lymphoma. *Oncogene* 1996; 12:687-691.

Wieczorek AM, Waterman JLF, Waterman MJF, Halazonetis TD. Structure-based rescue of common tumor-derived p53 mutants. *Nature Med* 1996;2:1143-1146.

Willems PMW, Kuypers AWHM, Meijerink JPP, Holdrinet RSG, Mensink EJBM. Sporadic mutations of the p53 gene in multiple myeloma and no evidence for germline mutations in three familial multiple myeloma pedigrees. *Leukemia* 1993;7:986-991.

Willemze R, Kerl H, Sterry W et al. EORTC classification for primary cutaneous lymphomas: a proposal from the cutaneous lymphoma study group of the European Organization for Research and treatment of cancer. *Blood* 1997;90:354-371.

Wilson WH, Teruya-Feldstein J, Fest T et al. Relationship of p53, bcl-2 and tumor proliferation to clinical drug resistance in non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 1997;89:601-609.

Wong KB, DeDecker BS, Freund SM et al. Hot-spot mutants of p53 core domain evince characteristic local structural changes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:8438-8442.

Woo RA, McLure KG, Lees-Miller SP, Rancourt DE, Lee PWK. DNA-dependent protein kinase acts upstream of p53 in response to DNA damage. *Nature* 1998;394:700-704.

Wu JK, Ye Z, Darras, BT. Sensitivity of single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis in detecting p53 point mutations in tumors with mixed cells populations. *Am J Hum Genet* 1993, 52; 1273-1275.

- Wu X, Bayle JH, Olson D, Levine AJ. The p53-mdm2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev* 1993;7:1126-1132.
- Yeargin J, Cheng J, Yu AL, Gjerset R, Bogart M, Haas M. p53 mutation in acute T cell lymphoblastic leukemia is of somatic origin and is stable during establishment of T cell lymphoblastic leukemia cell lines. *J Clin Invest* 1993; 91: 2111-2117.
- Yin Y, Tainsky MA, Bischoff FZ, Strong LC, Wahl G. Wild-type p53 restores cell cycle control and inhibits gene amplification in cells with mutant p53 alleles. *Cell* 1992; 70:937-948.
- Yu j, Zhang L, Hwang PM, Rago C, Kinzler KW, Vogelstein B. Identification and classification of p53-regulated genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:14517-14522.
- Zhou M, Yeager AM, Smith SD, Findley HW. Overexpression of the MDM2 gene by childhood acute lymphoblastic leukemia cells expressing the wild-type p53 gene. *Blood* 1995;85:1608-1614.
- Zhou M, Gu L, Abshire TC, Homans A, Billett AL, Yeager AM, Findley HW. Incidence and prognostic significance of MDM2 oncoprotein overexpression in relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia* 2000; 14:61-67.
- Zhu YM, Das-Gupta EP, Russell NH. Microsatellite instability and p53 mutations are associated with abnormal expression of the MSH2 gene in adult acute leukaemia. *Blood* 1999; 94:733-740.
- Zhu YM, Foroni L, McQuaker IG, Papaioannou M, Haynes A, Russell HH. Mechanisms of relapse in acute leukaemia: involvement of p53 mutated subclones in disease progression in acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Cancer* 1999; 79:1151-1157.
- Zoldan MC, Inghirami G, Masuda Y et al. Large-cell variants of mantle cell lymphoma: cytologic characteristics and p53 anomalies may predict poor outcome. *Br J Haematol* 1996;93:475-486.