

Einfluss von Veränderungen im p53-Tumorsuppressorweg auf die Entstehung und Prognose von Ovarialkarzinomen

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat)



vorgelegt der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I
- Biowissenschaften -
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Diplom-Biochemikerin Anja Böhnke

geb. am 20.10.1981 in Zeitz

Gutachter: 1.

2.

3.

Halle/Saale,

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	
1.1	Das Ovarialkarzinom	1
1.1.2	Molekulare Mechanismen des Therapieversagens beim Ovarialkarzinom	3
1.2	Das p53-Protein	5
1.3	MDM2 und MDMX: Inhibitoren der p53-vermittelten Transaktivierung	8
1.3.1	MDMX, MDM2 und der p53-Feedback-Loop	9
1.3.2	MDM2- und MDMX-Spleißvarianten	11
1.3.3	MDM2 und MDMX – Veränderungen im Ovarialkarzinom	13
1.3.4	MDM2 und MDMX als Target in der Krebstherapie	14
1.4	Die Rolle von microRNAs in Tumoren	16
1.5	Die Rolle von Polymorphismen in Tumoren	18
1.6	Zielsetzung	21
2.	Material	
2.1	Tumormaterial und Patientengut	22
2.2	Primer und Oligonukleotide	24
2.3	Taqman Assays	26
2.4	Antikörper	27
2.5	Enzyme	27
2.6	Kits	27
2.7	Vektoren	28
2.8	Chemikalien und Reagenzien	28
2.9	Geräte und Verbrauchsmaterialien	30
2.10	Puffer und Lösungen	30
3.	Methoden	
3.1	Zellkultur	32
3.2	Präparation von Nukleinsäuren	33
3.2.1	DNA-Isolation aus Zellkulturen	33
3.2.2.	DNA-Isolation aus Blut	34
3.2.3	Isolation von Plasmid-DNA	35
3.2.4	DNA-Konzentrationsbestimmung	35
3.2.5	RNA-Isolation aus Zellkultur	36
3.2.6	RNA-Isolation aus Gefriermaterial / microRNA-Isolation aus Zellkultur	36
3.2.7	Gesamt-RNA und microRNA-Isolation aus Paraffinmaterial	37
3.2.8	RNA-Konzentrationsbestimmung	37
3.3	Reverse Transkription	37
3.3.1	cDNA-Synthese zur mRNA-Expressionsanalyse	37
3.3.2.	cDNA-Synthese zur microRNA-Expressionsanalyse	38
3.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	38

3.5	quantitative real-time PCR	39
3.6	Genotypisierung mittels real-time PCR	40
3.7	Sequenzierreaktion	41
3.8	DNA-Untersuchungen	42
3.8.1	Agarose-Gelelektrophorese	42
3.8.2	Aufreinigung von DNA aus Agarose-Gelen	42
3.8.3	TBE-Gelelektrophorese (SSCP-Analyse)	42
3.8.3.1	Probenvorbereitung und Gellauf	42
3.8.3.2	Silberfärbung	43
3.9	Klonierung von DNA-Fragmenten	43
3.9.1	Ligation	43
3.9.2	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	44
3.9.3	Analyse positiver Transformanden	45
3.10	Western-Blot Analysen	45
3.10.1	Proteinisolation durch Lyse der Zellen nach Giordano	45
3.10.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	45
3.10.3	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	46
3.10.4	Übertragung der Proteine auf eine PVDF-Membran	46
3.10.5	Immundetektion	46
3.11	Transfektionsversuche	47
3.11.1	Transfektion von Oligonukleotiden /Antagomirs	47
3.11.2	Transfektion von Expressionsvektoren / Luciferasevektoren	48
3.12	Luciferase-Assay	48
3.13	Affinitätsreinigung nach Transfektion von Biotin-markierter mir-191	49
3.14	Immunhistochemie	49
3.15	Suchalgorithmen für microRNA-Proteintargets	51
3.16	Statistische Analysen	51
4.	Ergebnisse	
4.1	Untersuchungen zur MDM2- und MDMX-Genamplifikation	53
4.2	Untersuchung zur Bedeutung von p53-Veränderungen und des SNP309	57
4.2.1	p53-Mutations- und Proteinexpressionsstatus	57
4.2.2	Beziehung von p53-Gen- und Proteinexpressionsstatus	60
4.2.3	Korrelation von p53-Status und Ansprechen auf Chemotherapie	61
4.2.4	SNP309-Status im MDM2-P2-Promotor	61
4.2.5	Einfluss des p53- und SNP309-Status auf das Gesamtüberleben	62
4.3	MDMX-Mutationsanalyse	67
4.3.1	Hsa-microRNA-191 bindet bevorzugt an das MDMX-C-Transkript des SNP34091	69
4.3.2	Unterschiedliche Regulation der MDMX-Allelvarianten durch miR-191	70
4.3.3	Expressionsniveau von MDMX-A und MDMX-C-mRNA und miR-191	72

4.3.4	Wachstum von Ovarialkarzinomzelllinien im Zusammenhang mit dem SNP34091	74
4.3.5	MDMX-Expression in Ovarialkarzinomen in Korrelation mit dem SNP34091	74
4.3.6	SNP34091-Status und Einfluss auf das Gesamtüberleben	75
4.3.7	Abhängigkeit des Überlebens vom SNP34091-Status und der ER-Expression	76
4.4	Rolle des SNP31112 im Intron 9 des MDMX-Gens bei Ovarialkarzinompatientinnen	79
4.5	Rolle des SNP31274 im Intron 10 des MDMX-Gens bei Ovarialkarzinompatientinnen	80
4.6	Rolle des SNP31826 im Intron 10 des MDMX-Gens bei Ovarialkarzinompatientinnen	81
5.	Diskussion	85
5.1	MDM2- und MDMX-Genamplifikationen	86
5.2	p53-Mutations- und Expressionsanalyse	88
5.3	Rolle des SNP309 im Ovarialkarzinom	91
5.4	Alterationen im MDMX-Gen	92
5.4.1	Die prognostische Bedeutung des Polymorphismus 34091 für das Ovarialkarzinom	94
5.4.2	Die prognostische Bedeutung weiterer Polymorphismen des MDMX-Gens	97
6.	Zusammenfassung und Ausblick	99
7.	Literatur	101
8.	Anhang	
8.1	Abkürzungen	117
8.2	pTNM-Klassifikation und FIGO-Stadien des Ovarialkarzinoms	119
8.3	Zusammenfassung der molekularen Daten und einiger klinischer Parameter	120
	Publikationsliste / Preise und Auszeichnungen	
	Curriculum Vitae	
	Danksagung	
	Erklärung	

1. Einleitung

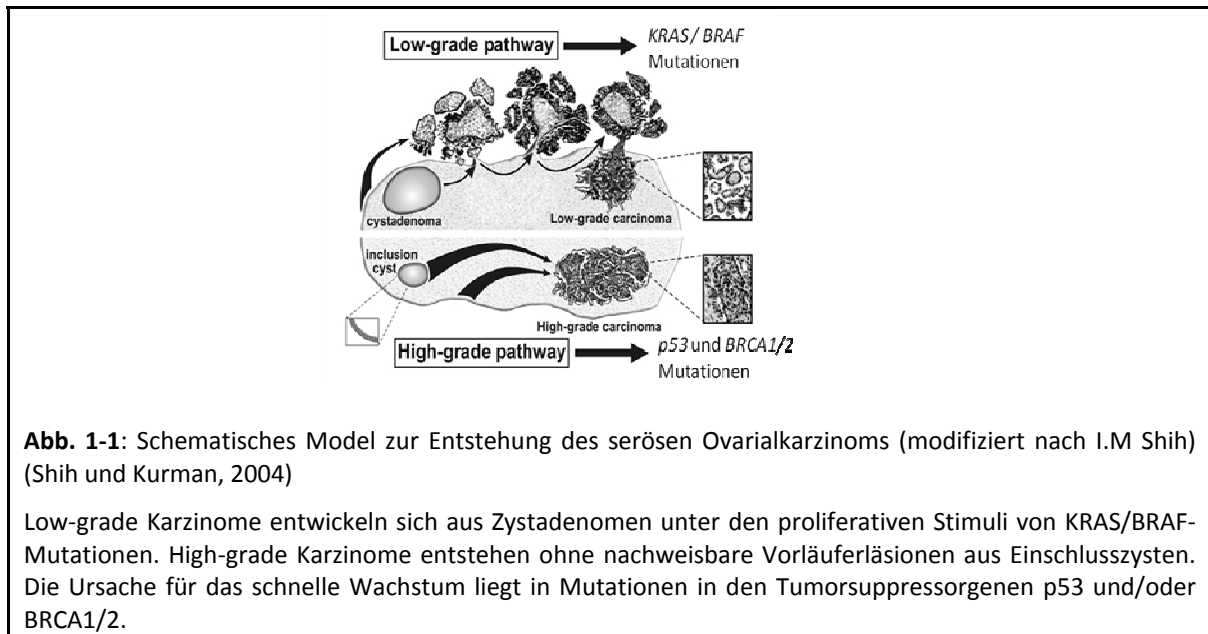
1.1 Das Ovarialkarzinom

Das Ovarialkarzinom ist in vielen westlichen Ländern nach dem Zervix- und dem Endometriumkarzinom das dritthäufigste weibliche Genitalkarzinom. Es weist jedoch von allen gynäkologischen Tumoren die höchste Sterblichkeitsrate auf. In Deutschland erkranken jährlich circa 10.000 Frauen an einem Ovarialkarzinom. Aufgrund des relativ beschwerdefreien Wachstums befinden sich zum Zeitpunkt der Diagnosestellung etwa 75 % der Tumoren in einem fortgeschrittenen Stadium und mehr als 6000 Frauen versterben pro Jahr an dieser Erkrankung. Damit steht dieser Tumor an fünfter Stelle bei den Krebstodesursachen der Frauen. Das mittlere Erkrankungsalter liegt zwischen 67 und 68 Jahren.

Hohe Inzidenzraten finden sich in den hoch entwickelten Industriestaaten Skandinaviens, Westeuropas und den USA, niedrige Inzidenzraten dagegen in Afrika und Asien. Zu den Risikofaktoren gehören unter anderem das Alter der Frau, eine frühe Menarche, späte Menopause und Kinderlosigkeit. Es wurde gezeigt, dass eine längerfristige Einnahme oraler Kontrazeptiva, häufige Schwangerschaften und Stillzeiten, das Risiko an einem Ovarialkarzinom zu erkranken reduzieren (Pignata und Vermorken, 2004; Purdie *et al.*, 1995; Stadel, 1975; Tavani *et al.*, 1993). Die Ursache für diese protektive Wirkung liegt vermutlich darin, dass diese Faktoren die Anzahl der Ovulationen reduzieren und so das Risiko einer malignen Transformation senken.

Über 90 % der ovariellen Neoplasien entstehen an der epithelialen Oberfläche des Ovars, der Rest entwickelt sich aus Keimzellen oder Stromazellen. Unter den epithelialen Neoplasien wird zwischen serösen (30-70%), endometrioden (10-20%), muzinösen (5-20%), klarzelligen (3-10%), transitionalzelligen (< 5%) und undifferenzierten (1%) unterschieden. Dabei zeigen die serösen (20-35%) und die undifferenzierten (11-29%) die schlechtesten 5-Jahres-Überlebensraten (Bjorkholm *et al.*, 1982; Hogberg *et al.*, 1993; Sorbe *et al.*, 1982). Bei der größten Gruppe der epithelialen Tumoren, den serösen Ovarialkarzinomen, werden zwei Mechanismen der Tumorentstehung unterschieden, der low-grade und der high-grade-Weg (Abbildung 1-1) (Shih und Kurman, 2004). 60-70 % der low-grade Karzinome besitzen aktivierende Mutationen im KRAS- oder BRAF-Gen, welche in high-grade Karzinomen kaum nachweisbar sind (Singer *et al.*, 2003). Hingegen zeigen high-grade Karzinome häufig Mutationen der Tumorsuppressorgene p53 und BRCA1/2

(Breast Cancer) (Landen, Jr. *et al.*, 2008). Seröse high-grade Karzinome wachsen schnell, haben keine nachweisbaren Vorläuferläsionen und zeigen ausgedehnte Kernatypien. Dies sind Zeichen für genomische Instabilität verursacht durch Fehlfunktion des p53- und/oder BRCA1/2-Proteins. Seröse low-grade Karzinome hingegen behalten ihre genomische Inte-



grität und wachsen langsam unter den proliferativen Stimuli einer KRAS- oder BRAF-Aktivierung. BRCA1- oder BRCA2-Mutationen finden sich nicht nur im sporadischen high-grade Karzinom sondern auch in den hereditären serösen high-grade Karzinomen. Etwa 5-10 % aller Ovarialkarzinome sind genetisch bedingt. Bei diesen Patientinnen liegen Keimbahnmutationen in den Genen BRCA1 und/oder BRCA2 vor, deren Genprodukte an der DNA-Reparatur beteiligt sind. Durch diese Mutationen wird das Risiko, an einem Ovarial- oder Mammakarzinom zu erkranken, stark erhöht (Welch und King, 2001). Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass die hochmalignen serösen Ovarialkarzinome möglicherweise ihren Ursprung im Epithel des Fimbrientrichter nehmen (Crum, 2009). Von hier kommt es durch die Öffnung des Fimbrientrichters schnell zur peritonealen Ausbreitung, bevor ein größerer, Screeninguntersuchungen zugänglicher Tumor entstehen kann. Die Früherkennung des Ovarialkarzinoms beschränkt sich zurzeit auf regelmäßige gynäkologische Untersuchungen. Dabei hat die transvaginale Sonographie unter den bildgebenden Verfahren zur Erkennung eines möglichen Ovarialkarzinoms den höchsten Stellenwert (Badgwell und Bast, 2007). Der Tumormarker CA-125 ist bei mehr als 80% der Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom im Serum erhöht. Bei vielen entzündlichen Krankheiten (z.B. der Leber) ist der CA-125 Wert

jedoch ebenfalls erhöht, weswegen sowohl Spezifität als auch Sensitivität diesen Test als verlässliches Screening-Verfahren nicht zulassen. Daher wird der Tumormarker CA-125 nur zur Verlaufskontrolle bei bereits diagnostizierten Ovarialkarzinompatientinnen genutzt (Rosenthal, 1998; Zurawski, Jr. *et al.*, 1988). Jeder klinisch nachgewiesene Tumor des Ovars muss operativ entfernt und histologisch beurteilt werden. Die Stadieneinteilung erfolgt nach den Vorgaben der *Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique* (FIGO) und des *American Joint Committee on Cancer* (siehe Tabelle 8-1). Die Prognose wird weitestgehend durch das Ausmaß der operativen Tumorentfernung bei der ersten Operation bestimmt. Der Tumorrest ist derzeit der einzige Prognosefaktor, der sich effektiv beeinflussen lässt. Die beste Prognose haben Patientinnen, die postoperativ keinen Tumorrest aufweisen. Patientinnen mit Resttumor ≤ 1 cm haben zwar einen signifikanten Überlebensvorteil gegenüber Patientinnen mit Resttumor > 1 cm, der Gewinn ist aber klein verglichen zur Komplettresektion. Der operativen Tumorentfernung schließt sich außer bei Patientinnen mit FIGO-Stadium IA eine Chemotherapie an. Die momentane Standardtherapie besteht in einer Kombinationsbehandlung aus Carboplatin und Paclitaxel. Nur etwa die Hälfte der Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom erfährt durch die Platin-Taxan-Kombination eine Komplettremission. Bei den meisten Frauen tritt innerhalb der ersten 3 Jahre ein Rezidiv auf. Dabei wird zwischen einem primären Progress, Früh- und Spätrezidiven unterschieden. Frührezidive entwickeln sich innerhalb der ersten 6 Monate nach Primäroperation und sind häufig durch eine Platinresistenz gekennzeichnet, welche eine weitere Therapie deutlich erschwert. Trotz der Fortschritte in der Behandlung von Ovarialkarzinomen zählen nur etwa 20 % der Patientinnen mit Ovarialkarzinom zu den Langzeitüberlebenden. Ziel der Forschung ist es daher, Resistenzentwicklungen vorherzusagen bzw. Resistenzmechanismen zu umgehen und so die Therapie an den einzelnen Patienten anzupassen.

1.1.1 Molekulare Mechanismen des Therapieversagens beim Ovarialkarzinom

Chemoresistenz limitiert deutlich die Behandlungseffektivität unterschiedlichster Tumorarten. Viele Tumoren entwickeln dabei nicht nur eine Resistenz gegen das primär eingesetzte Chemotherapeutikum sondern auch sogenannte „Kreuzresistenzen“ gegen andere Medikamente. Es wird vermutet, dass das Therapieversagen bei Patientinnen mit

metastasierten Karzinomen auf Chemoresistenzen zurückzuführen ist. Tumorzellen können auf verschiedenen Wegen eine Chemoresistenz erwerben. Dazu gehören eine verringerte Aufnahme von Medikamenten in die Zelle, ein verstärkter Export, Mechanismen der Inaktivierung von Chemotherapeutika, Veränderungen im Weg der Reparatur von DNA-Schäden sowie verringerte Apoptoseraten (Longley und Johnston, 2005). Die bei der Therapie des Ovarialkarzinoms verwendeten Platinverbindungen verursachen DNA-Schäden durch eine Intra- und Interstrang-Verknüpfung der DNA. Die entstandenen DNA-Schäden werden durch die Zelle entweder repariert, oder wenn der Schaden irreparabel ist, geht die Zelle in den programmierten Zelltod (Apoptose) über. Die Nukleotid-Excisions-Reparatur (NER) ist der Hauptweg um Platin-DNA-Komplexe zu entfernen und die beschädigte DNA zu reparieren (Reardon *et al.*, 1999). Eine der wichtigsten Komponenten des NER-Weges ist das Protein ERCC1 (**excision repair cross-complementing 1**). In vielen präklinischen Studien konnte gezeigt werden, dass eine verstärkte ERCC1-Expression mit Platinresistenz einhergeht (Melton *et al.*, 1998; Youn *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2009). Nach Einsatz von Platinverbindungen leitet die Tumorzelle keine Apoptose ein, da aufgrund der Überexpression von ERCC1 die DNA-Schäden besser repariert werden können. Klinisch korreliert ein hohes ERCC1-Expressionsniveau in Ovarialkarzinomen, Magenkarzinomen und nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen mit einem schlechten Ansprechen auf eine Platin-basierte Chemotherapie (Dabholkar *et al.*, 1992; Metzger *et al.*, 1998; Lord *et al.*, 2002; Steffensen *et al.*, 2009).

Ein weiterer wichtiger Faktor bei der Antwort auf eine Platin-basierte Chemotherapie ist das Tumorsuppressorprotein p53. Die Funktionalität von p53 kann durch Mutationen oder veränderte Expression von regulatorischen Proteinen im p53-Pathway gestört sein. Die Mutationsrate des p53-Gens liegt im Ovarialkarzinom zwischen 40-80 % (Fallows *et al.*, 2001; Reles *et al.*, 2001; Havrilesky *et al.*, 2003; Feki and Irminger-Finger, 2004). In den letzten Jahren gab es viele Untersuchungen zur Bedeutung von p53 bei der Entwicklung von Chemoresistenzen. In vielen Studien konnten gezeigt werden, dass der Verlust von funktionellem p53 mit einem chemoresistenten Phänotyp assoziiert ist (Righetti *et al.*, 1996; Marx *et al.*, 1998; Reles *et al.*, 2001). Andere Autoren konnten jedoch keinen Zusammenhang zwischen verändertem p53 und der Prognose für Ovarialkarzinompatientinnen nachweisen (Kohler *et al.*, 1993; Niwa *et al.*, 1994; Kupryjanczyk, 2006). Ursachen für diese Diskrepanz könnten darin liegen, dass eine

Überexpression des p53 Proteins nicht zwangsläufig mit einer Mutation einhergeht und dass bei ausschließlich immunhistochemischen Untersuchungen keine verkürzten Proteine, die durch Insertionen/Deletionen oder non-sense Mutationen entstehen erkannt werden.

1.2 Das p53-Protein

P53 wurde bereits 1979 entdeckt (DeLeo *et al.*, 1979; Lane und Crawford, 1979; Linzer und Levine, 1979). Seine Funktion, als Tumorsuppressor zu fungieren, wurde jedoch erst zehn Jahre später erkannt (Finlay *et al.*, 1989). Aufgrund seiner zentralen Rolle bei der Koordination der zellulären Antwort auf eine Vielzahl von Stresssignalen wird p53 „zellulärer Torhüter“ (Levine, 1997) oder „Wächter des Genoms“ (Lane, 1992) genannt. Die Bedeutung von p53 wird auch daran deutlich, dass Familien mit Keimbahnmutationen des p53-Gens, dem sogenannten Li-Fraumeni-Syndrom, an einer Vielzahl verschiedener Tumoren erkranken (Malkin *et al.*, 1990). In über 50 % der sporadischen Tumoren ist das p53-Gen ebenfalls mutiert (Hollstein *et al.*, 1991). Damit spielt p53 die wahrscheinlich wichtigste Rolle in der Kontrolle von Zellzyklus und Zellüberleben als Antwort auf genomischen Stress, Hypoxie, Hitzeschock oder der Expression von viralen Onkogenen (Levine, 1997). Obwohl das Protein nicht für Wachstum und Entwicklung der ungestressten Zelle benötigt wird, so ist p53 doch eine kritische Komponente im Schutz vor Tumorentstehung. Donehower konnte 1992 zeigen, dass sich p53-„knock-out“ Mäuse zwar normal entwickeln, aber sehr häufig spontan Tumoren bilden (Donehower *et al.*, 1992). Die am besten verstandene Funktion von p53 ist seine Fähigkeit, als Transkriptionsfaktor die Feinabstimmung der zellulären Antwort auf eine Vielzahl von Stresssignalen zu steuern und so das Wachstum von anomalen Zellen zu verhindern (Brooks and Gu, 2003; Laptenko and Prives, 2006). Die Inhibierung des Zellwachstums geschieht über verschiedene Wege: Zellzyklusarrest, Differenzierung und Seneszenz. Ist der DNA-Schaden jedoch zu groß, kann auch Apoptose eingeleitet werden (Sionov und Haupt, 1999). P53 kann weiterhin durch seine Funktion als Transkriptionsfaktor direkt in die DNA-Reparatur eingreifen (Janus *et al.*, 1999), als Inhibitor der Angiogenese fungieren oder Teile des Stoffwechsels der Zelle steuern (Vogelstein *et al.*, 2000). Das auf Chromosom 17p13.1 lokalisierte p53-Gen kodiert für ein aus 393 Aminosäuren (53 kDa) bestehendes Phosphoprotein, das in fünf funktionelle Domänen unterteilt werden kann.

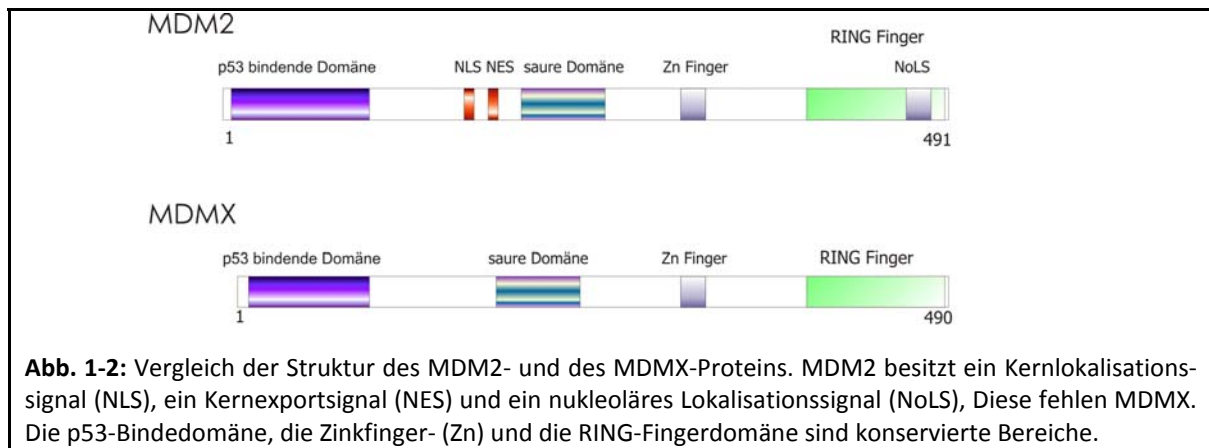
Der N-Terminus enthält eine transaktivierende Domäne (AS 1-42), die in der Lage ist, mit der Transkriptionsmaschinerie zu interagieren, und so die Genexpression zu regulieren. Die transkriptionelle Aktivität von p53 kann durch die N-terminale Bindung des MDM2- und des MDMX-Proteins inhibiert werden (Shvarts *et al.*, 1996). Die Region zwischen der N-terminalen Aktivierungsdomäne und der DNA-bindenden Kerndomäne enthält fünf Wiederholungen der Sequenz Prolin-X-X-Prolin, welche in der Lage ist, an SH3-Domänen zu binden. Eine Deletion dieser Domäne reduziert den p53-vermittelten Zellzyklusarrest und Apoptose (Walker and Levine, 1996). Die zentrale DNA-bindende Domäne (AS 96-296) verleiht p53 die Fähigkeit, als Transkriptionsfaktor zu agieren (Cho *et al.*, 1994). Die meisten Punktmutationen befinden sich innerhalb der DNA-bindenden Domäne von p53 (Hollstein *et al.*, 1991). Durch Kristallisation von p53 konnte gezeigt werden, dass natives p53-Protein als Tetramer vorliegt. Für den Prozess der Oligomerisierung ist die Domäne von Aminosäurerest 325 bis 363 verantwortlich (Jeffrey *et al.*, 1995). Dieses p53-Tetramer kann spezifisch an ein 10 bp Motiv, welches in 2 Kopien vorliegt, binden und so die Transkription von p53-Zielgenen bewirken. Die C-terminale Domäne (AS 364-393) reguliert die Fähigkeit, über die zentrale Kerndomäne an spezifische DNA-Sequenzen zu binden. Vermutungen gehen dahin, dass strukturelle Veränderungen in der C-terminalen Domäne benötigt werden, um p53 für die sequenzspezifische DNA-Bindung zu aktivieren. So bewirkt zum Beispiel eine Phosphorylierung dieser Domäne durch Proteinkinase C oder Caseinkinase II eine Aktivierung der sequenzspezifischen DNA-Bindung durch die zentrale Kerndomäne (Hupp und Lane, 1995). P53 ist in ungestressten Zellen aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit von circa zwanzig Minuten meist nicht detektierbar. Die Ubiquitin-vermittelte Proteolyse durch die E3-Ubiquitin-Ligase MDM2 spielt bei dem schnellen turn-over von p53 die wahrscheinlich wichtigste Rolle (Haupt *et al.*, 1997; Honda *et al.*, 1997; Kubbutat *et al.*, 1997). DNA-Schäden, wie z.B. Doppelstrangbrüche durch ionisierende Strahlung, Thymin-dimere durch UV-Strahlung oder durch Chemotherapeutika ausgelöst, führen zu einer Aktivierung von p53. Die Mechanismen, durch die p53 nach zellulärem Stress aktiviert werden kann, sind noch nicht vollständig geklärt. Es werden sowohl das Ansteigen des p53-Proteinniveaus, als auch die Aktivierung durch posttranslationale Modifizierung diskutiert. Ein wichtiger Signaltransduktionsweg wird dabei durch die Kinasen ATM (**a**taxia **t**elangiectasia **m**utated) und ATR (**A**TM related) vermittelt. DNA-Schäden führen zur Aktivierung der ATM-Kinase, die daraufhin die Kinase

Chk2 (cell cycle **check**point **kinase 2**) modifiziert (Steegenga *et al.*, 1996). Die ATM-Kinase kann das p53-Protein aber auch direkt am Serin-Rest 15 phosphorylieren. Chk2 hingegen phosphoryliert p53 am Serin-Rest 20. Die Aktivierung von ATR und Chk1 erfolgt durch UV-Licht induzierte DNA-Schäden (Caspari, 2000). Beide Kinasen phosphorylieren das p53-Protein an verschiedenen Serin-Resten. Diese Modifikationen reduzieren die Bindungsaffinität von p53 gegenüber MDM2 und MDMX und erhöhen so die transkriptionelle Aktivität von p53 (Haupt *et al.*, 1997; Lambert *et al.*, 1998). Die wichtigste Funktion von p53 liegt darin, die Anhäufung potentiell onkogener Mutationen zu verhindern und so die genomische Integrität zu bewahren (Lane, 1992). Ein wichtiges Zielgen von p53 bei der Zellzyklusregulation ist p21, ein Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinase Cdk2 (cyclin **d**ependent **k**inase 2). Durch die Bindung des p21-Proteins an diese Kinase wird deren Kinaseaktivität inhibiert. Dies führt zu einer Akkumulation von hypophosphoryliertem Retinoblastom-Genprodukt. Dieses bleibt an den Transkriptionsfaktor E2F gebunden, wodurch die Aktivierung der E2F-abhängigen Gene nicht erfolgen kann. Der Übergang von der G₁-Phase zur S-Phase des Zellzyklus wird somit verhindert, und es kommt zum Zellzyklusarrest (Waldman *et al.*, 1995). Damit besteht für die Zelle die Möglichkeit, DNA-Schäden zu reparieren. Die DNA-Reparatur kann durch das p53-Protein direkt und indirekt beeinflusst werden. Zum einen wirkt p53 aktivierend auf die Transkription verschiedener DNA-Reparatur-Gene (z.B. GADD45). Es besitzt aber auch eine interne 3'-5'-Exonukleaseaktivität, womit defekte DNA-Bereiche entfernt und repariert werden können. Ist die Anzahl der DNA-Schäden jedoch zu groß, wird der p53-vermittelte programmierte Zelltod (Apoptose) ausgelöst. Es wurde gezeigt, dass p53 in den Mitochondrien lokalisiert sein kann. Dort kann es zu einer Interaktion mit den antiapoptotischen Proteinen BclX und Bcl2 kommen, was zu einer Freisetzung von Cytochrom C führt und so die Caspase-Kaskade auslöst (Mihara und Moll, 2003). Desweiteren aktiviert p53 PUMA (**p**53 **u**pregulated **m**odulator of **a**poptosis). PUMA hat eine inhibierende Wirkung auf Bcl2, welches die Apoptoseinduktion blockiert. Eine erhöhte Expression von PUMA lässt somit auf eine Aktivierung des Apoptose-Weges schließen. Obwohl in den letzten 30 Jahren sehr viele Ergebnisse über die Funktionen von p53 publiziert wurden, so sind noch zahlreiche Fragen zur Rolle von p53 bei der Verhinderung der Tumorentstehung bzw. Tumorentstehung ungeklärt. Zum Beispiel die

Frage, in welchem Maß kann das p53-Protein durch die Onkoproteine MDM2 und MDMX in seiner Funktion eingeschränkt sein.

1.3 MDM2 und MDMX: Inhibitoren der p53-vermittelten Transaktivierung

Die Funktion von p53 ist in etwa der Hälfte aller Tumoren durch Mutationen gestört (Hollstein *et al.*, 1991). In der anderen Hälfte der Tumoren, welche Wildtyp-p53 besitzen, finden sich bei einem großen Prozentsatz Veränderungen in der Expression von MDM2 und MDMX (Momand *et al.*, 1998; Riemenschneider *et al.*, 1999). Das murine „*double minute*“ 2 (MDM2) Gen wurde als eines von drei Genen (*MDM1*, 2, 3) identifiziert, die in der spontan transformierten Maus-Zelllinie 3T3-DM in bis zu 50 Kopien vorliegen (Fakharzadeh *et al.*, 1991). Die *MDM*-Gene liegen auf kleinen extra-chromosomalen Kernkörperchen, die als „*double minutes*“ bezeichnet werden. Bei der Analyse dieser Gene zeigte sich, dass nur das Produkt des MDM2-Gens nach Überexpression in der Lage ist, Zellen spontan zu transformieren (Cahilly-Snyder *et al.*, 1987). Kurz nach der Identifizierung des MDM2-Gens wurde die Ursache für sein transformierendes Potential entdeckt. Das MDM2-Protein bindet an das Tumorsuppressorprotein p53 und inhibiert die p53-vermittelte Transaktivierung (Momand *et al.*, 1992). Zur gleichen Zeit konnte gezeigt werden, dass das auf der Chromosomenregion 12q13-14 lokalisierte MDM2-Gen in nahezu 1/3 aller Sarkome amplifiziert vorliegt (Oliner *et al.*, 1992). Das MDMX-Protein (auch MDM4 genannt) wurde bei der Suche nach p53-Bindeproteinen entdeckt (Shvarts *et al.*, 1996). Das MDMX-Gen ist auf dem Chromosomenarm 1q32 lokalisiert (Shvarts *et al.*, 1997). Kurze Zeit später konnte bei „*yeast-two-hybrid*“ Untersuchungen gezeigt werden, dass die Proteine MDMX und MDM2 Heterodimere bilden können (Sharp *et al.*, 1999; Tanimura *et al.*, 1999). Dabei sind die Heterodimere von MDM2 und MDMX stabiler als die Homodimere von MDM2 oder MDMX allein. Der Vergleich der Proteinstruktur von MDM2 und MDMX ergab eine hohe Homologie der beiden Proteine (siehe Abbildung 1-2). Die am höchsten konservierten Domänen der beiden Proteine sind die N-terminale p53-Bindungsdomäne, das Zinkfinger-Motiv und die C-terminale RING-Finger-Domäne (Shvarts *et al.*, 1996). Die Homologien in der p53-Bindungsdomäne beider Proteine sind Voraussetzung, um an p53 zu binden (Bottger *et al.*, 1999). MDMX und MDM2 interagieren über die C-terminale RING-Finger-Domäne, während die Funktion des Zinkfinger-Motivs weitgehend unbekannt ist. Im Gegensatz zum MDM2-Protein fehlt dem



MDMX-Protein ein funktionelles Kernlokalisierungssignal (NLS) sowie ein Kernexportsignal (NES) (Gu *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2002; Migliorini *et al.*, 2002a). Das legt die Vermutung nahe, dass MDMX für den Transport in den Kern an andere Proteine gebunden werden muss. Die saure Domäne, die in beiden Proteinen vorkommt, ist in der Aminosäuresequenz weniger stark konserviert.

Die Bedeutung der Proteine MDM2 und MDMX bei der p53-Regulation wird dadurch hervorgehoben, dass ein MDMX-„Knockout“, wie auch ein MDM2-„Knockout“, für Mäuse letal ist. Diese letale Wirkung kann jedoch durch einen zusätzlichen Knockout von p53 aufgehoben werden (Finch *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 1995; Migliorini *et al.*, 2002b; Parant *et al.*, 2001). MDMX-„Knockout“ Embryonen sterben zwischen Tag 7,5-12 und sind durch ein deutlich verzögertes Wachstum sowie massive p53-induzierte Apoptose im Neuroepithel charakterisiert (Finch *et al.*, 2002; Migliorini *et al.*, 2002b). Weiterhin ist die Expression der Cyclin-abhängigen Kinase p21 stark erhöht. MDM2-„Knockout“ Mäuse hingegen sterben an massiver Apoptose zwischen Tag 3,5-6 (Jones 1995, Montes Oca de Luna 1995). Dies zeigt, dass sich die Proteine MDMX und MDM2 in ihrer Funktion nicht gegenseitig ersetzen können, zumindest nicht in der frühen embryonalen Entwicklung. Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass MDMX und MDM2 unabhängige Funktionen im p53-Weg und möglicherweise auch darüber hinaus haben.

1.3.1 MDMX, MDM2 und der p53-Feedback-Loop

Die RING-Finger-Domäne von MDM2 besitzt eine E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität, mit der das p53-Protein für den proteasomalen Abbau markiert werden kann (Haupt *et al.*, 1997; Honda *et al.*, 1997; Kubbutat *et al.*, 1997). Obwohl zwischen den MDM2- und MDMX-Proteinen eine hohe Homologie (über 50 %) innerhalb der RING-Domäne vorliegt, besitzt

MDMX diese Ligase-Funktion jedoch nicht (Jackson and Berberich, 2000; Stad *et al.*, 2000). Es konnte gezeigt werden, dass geringe MDM2-Proteinmengen zu einer Monoubiquitinylierung des p53-Proteins führen (Lai *et al.*, 2001), während große MDM2-Proteinmengen eine Polyubiquitinylierung und die anschließende proteasomale Degradation des Proteins bewirken (Li *et al.*, 2003; Xirodimas *et al.*, 2001). Desweiteren kann MDM2 sich selbst ubiquitinylieren und so seinen eigenen Abbau induzieren (Honda and Yasuda, 2000; Li *et al.*, 2003). Die Proteine MDMX und MDM2 können über ihre RING-Finger-Domänen interagieren, was zu einer Unterdrückung der Autoubiquitinylierung von MDM2 und damit zu dessen Stabilisierung beiträgt (Li *et al.*, 2003; Sharp *et al.*, 1999; Stad *et al.*, 2000). Dies stellt möglicherweise einen einfachen Mechanismus dar, um unter bestimmten Bedingungen genügend funktionelles MDM2-Protein bereitzustellen. Nach Induktion von DNA-Schäden durch UV-Licht, Bestrahlung oder Adriamycin kommt es zum Abbau des MDMX-Proteins. Das Protein ist Substrat für die Ubiquitin-Ligase-Aktivität von MDM2. Für die Ubiquitinylierung und Degradation des MDMX-Proteins wird, im Gegensatz zur p53-Regulation, nur die intakte RING-Fingerdomäne des MDM2-Proteins benötigt (Kawai *et al.*, 2003; Pan und Chen, 2003). Das p53-Protein aktiviert die Transkription vieler Zielgene, unter anderem die des MDM2-Gens (Barak *et al.*, 1993). Dabei bindet p53 an den P2-Promotor des MDM2-Gens und führt so zu einer transkriptionellen Aktivierung. Da das MDM2-Protein wiederum die p53-Aktivität inhibiert, bildet dies einen negativen Feedback-Loop (siehe Abbildung 1-3).

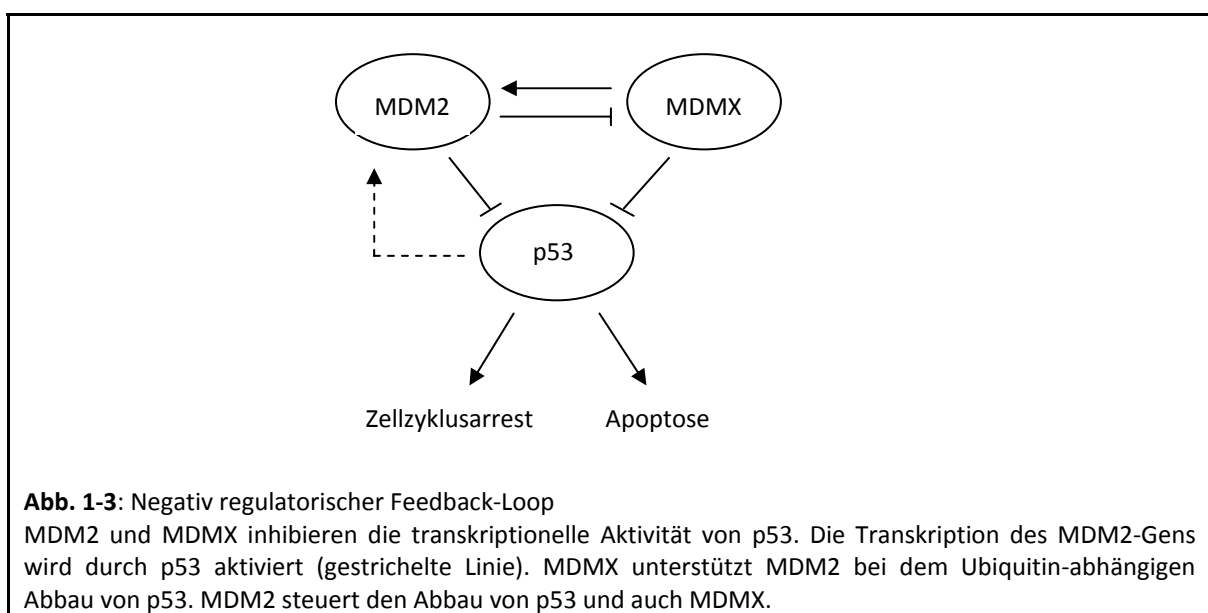


Abb. 1-3: Negativ regulatorischer Feedback-Loop

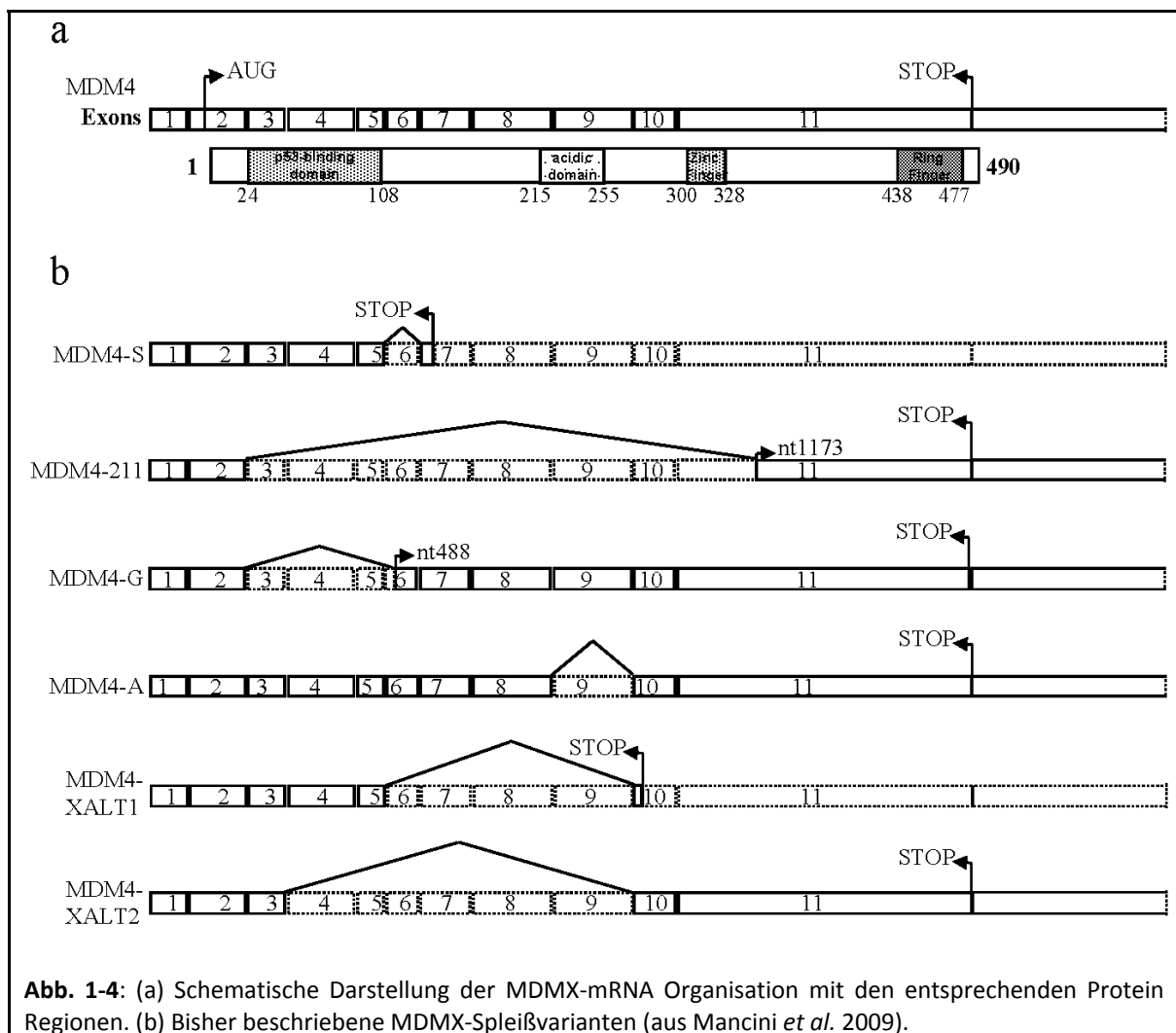
MDM2 und MDMX inhibieren die transkriptionelle Aktivität von p53. Die Transkription des MDM2-Gens wird durch p53 aktiviert (gestrichelte Linie). MDMX unterstützt MDM2 bei dem Ubiquitin-abhängigen Abbau von p53. MDM2 steuert den Abbau von p53 und auch MDMX.

Umgekehrt resultiert aus einer erniedrigten p53-Aktivität ein sinkendes MDM2-Proteinniveau. Im Gegensatz zum MDM2-Gen besitzt das MDMX-Gen keine p53-Bindestelle. Die MDMX-Expression wird daher nicht p53-abhängig verstärkt (Shvarts *et al.*, 1996).

1.3.2 MDM2- und MDMX-Spleißvarianten

Verschiedene Mechanismen können die Entstehung von alternativen mRNA-Transkripten bewirken. Wie im Fall von MDM2 können 2 unterschiedliche Promotoren (P1 und P2) Transkripte mit unterschiedlicher Länge generieren (Zauberman *et al.*, 1995). Der Großteil der MDM2- und MDMX-Transkripte entsteht jedoch durch alternatives Spleißen. Durch alternatives Spleißen kann eine große Vielfalt von Transkripten aus einer einzigen prä-mRNA entstehen. Bei mehr als 60 % aller Gene werden durch Einschluss oder Ausschluss von unterschiedlichen Exonen verschiedene mRNA-Transkripte generiert. Anfang der neunziger Jahre erschienen die ersten Publikationen zu verschiedenen mRNA-Transkripten des MDM2-Gens. Mit der Definition von Struktur und Organisation der MDM2-Gens wurden zwei dieser Produkte als alternative Spleißvarianten erkannt (de Oca Luna *et al.*, 1996). Etwa gleichzeitig wurden MDM2-Proteinisoformen in Brustkrebs- und Leukämiefällen beschrieben (Bueso-Ramos *et al.*, 1993; Bueso-Ramos *et al.*, 1995). Sigalas *et al.* charakterisierten 1996 sechs MDM2-mRNA-Varianten in Ovarialkarzinom-, Blasenkarzinom- und Leukämiezelllinien (Sigalas *et al.*, 1996). Drei dieser Transkripte entstanden durch alternatives Spleißen, und konnten auch in Glioblastomen nachgewiesen werden (Matsumoto *et al.*, 1998). Diesen drei Transkripten (MDM2-A, MDM2-B, MDM2-C) fehlen ein Teil der p53-Bindedomäne, das Kernlokalisierungssignal, das Kernexportsignal sowie ein Teil der sauren Domäne. In Rhabdomyosarkomen wurden neben den bereits bekannten Varianten, drei weitere alternative Transkripte nachgewiesen (Bartel *et al.*, 2001b). Weitere Untersuchungen des MDM2-B Transkriptes ergaben, dass es als Antwort auf genomischen Stress verstärkt exprimiert wird. Das Protein kann an das „full-length“-MDM2 Protein binden und so dessen Fähigkeit, mit p53 zu interagieren und p53 zu degradieren, inhibieren (Evans *et al.*, 2001). In den letzten Jahren wurden noch weitere MDM2-Spleißvarianten identifiziert, denen auch Teile der p53-Bindedomäne oder die C-terminale RING-Finger-Domäne fehlen (Chandler *et al.*, 2006; Tamborini *et al.*, 2001). Alternativ gespleißte MDM2-Transkripte wurden in einer

Vielzahl von Tumoren beschrieben (Bartel *et al.*, 2002; Hori *et al.*, 2000; Kraus *et al.*, 1999). Einige Arbeiten konnten zeigen, dass die Expression von MDM2-Spleißvarianten mit einer schlechten Prognose korreliert, andere Arbeiten fanden hingegen keinen Zusammenhang (Bartel *et al.*, 2001a; Lukas *et al.*, 2001; Matsumoto *et al.*, 1998). 1999 wurde eine verkürzte Form der MDMX-mRNA identifiziert, welche als MDMX-S (short) bezeichnet wurde (siehe Abbildung 1-4). Diese Spleißvariante ist durch eine Deletion von Exon 6 (68 bp) charakterisiert. Diese Deletion führt nach Codon 114 zu einer Verschiebung des Leserahmens, wodurch ein Stopcodon bei Aminosäurerest 140 entsteht (Rallapalli *et al.*, 1999). Diese Isoform enthält die komplette p53-Bindedomäne und einige alternative C-terminale Aminosäuren. Es konnte gezeigt werden, dass das MDMX-S-Protein mit einer höheren Affinität als das „full-length“-MDMX Protein an das p53-Protein bindet und effizienter in den Zellkern transportiert wird. Das MDMX-S-Protein unterdrückt die p53-vermittelte Transkription stärker als das MDMX-Protein. Ursache für diese hohe Affinität sind die durch Verschiebung des Leserahmens neu entstandenen



C-terminalen Aminosäuren. Weiterhin ist das MDMX-S-Protein stabiler als das MDMX-Protein, da es aufgrund der fehlenden RING-Fingerdomäne nicht mit dem MDM2-Protein interagieren kann, und so vor dem MDM2-vermittelten Abbau geschützt ist (Rallapalli *et al.*, 2003). Es konnte gezeigt werden, dass in Glioblastomen ein höheres Verhältnis von MDMX-S zu „full-length“-MDMX mRNA zu finden ist (Riemenschneider *et al.*, 1999). Unsere Arbeitsgruppe hat nachgewiesen, dass bei Sarkom-Patienten eine MDMX-Amplifikation oder ein Verhältnis der mRNA von MDMX-S/MDMX > 1 signifikant mit einer schlechteren Prognose korreliert ist (Bartel *et al.*, 2005). In den letzten Jahren wurden weitere MDMX-Spleißvarianten nachgewiesen (siehe Abbildung 1-4). MDMX-211 wurde in einer Schilddrüsenkarzinom-Zelllinie entdeckt. Diese Variante entsteht durch aberrantes Spleißen (Giglio *et al.*, 2005). Das entstandene Protein enthält die ersten 26 und die letzten 138 Aminosäuren des „full-length“-MDMX Proteins. MDMX-211 kann nicht an p53 binden, da die komplette p53-Bindungsdomäne fehlt. Das Protein kann jedoch über die RING-Finger-Domäne mit MDM2 heterodimerisieren. Somit wird MDM2 stabilisiert und die p53-Inaktivierung verstärkt. MDMX-211 konnte bisher nicht im Normalgewebe nachgewiesen werden, jedoch in nicht kleinzelligen Lungenkarzinomen und papillären Schilddrüsenkarzinomen (Giglio *et al.*, 2005; Prodosmo *et al.*, 2008). Die Transkriptvarianten MDMX-A und MDMX-G wurden in der Zervixkarzinom-Zelllinie C33A entdeckt (de Graaf *et al.*, 2003). Bisher konnte diesen Varianten jedoch kein endogenes Protein zugeordnet werden. Die alternativen Transkriptvarianten *XAlt1* und *XAlt2* wurden nach UV-Bestrahlung in Tumorzelllinien detektiert (Chandler *et al.*, 2006). Das Protein der *XAlt1*-Variante besteht nur aus der p53-Bindedomäne und könnte so, ähnlich wie das MDMX-S-Protein, die Funktion von p53 effektiv inhibieren. Dem Protein der *XAlt2*-Transkriptvariante fehlt hingegen die p53-Bindedomäne. Über die vorhandene RING-Finger-Domäne jedoch könnte eine Interaktion mit MDMX und/oder MDM2 erfolgen, und so deren Funktion reguliert werden. Die Entdeckung von *MDM2*- und MDMX-Spleißvarianten hat die Komplexität des p53-Tumorsuppressor-Weges zusätzlich erhöht. Zu klären bleibt aber, inwieweit diese Spleißvarianten in Proteine translatiert werden bzw. welche Funktionen sie dann in normalen Zellen und Tumorzellen besitzen.

1.3.3 MDM2 und MDMX – Veränderungen im Ovarialkarzinom

Das MDM2-Gen ist auf dem Chromosomenarm 12q13-14 lokalisiert, einer Region, in der Ovarialkarzinome häufig Zugewinne aufweisen (Hauptmann *et al.*, 2002). Durch immunhistochemische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die MDM2-Expression mit dem Tumorstadium und dem Auftreten von Chemoresistenz korreliert ist. Das Gesamtüberleben von Patientinnen mit MDM2-positiven Tumoren ist signifikant kürzer, als bei Patienten mit MDM2-negativen Tumoren (Dogan *et al.*, 2005). Das MDMX-Gen ist auf Chromosom 1 in der Region 1q32 lokalisiert, einer Region, die in Ovarialkarzinomen ebenfalls oft Veränderungen aufweist (Gallion *et al.*, 1990; Hauptmann *et al.*, 2002). Ramos *et al.* konnten in ca. 30 % der untersuchten Tumorzelllinien eine Überexpression des MDMX-Proteins nachweisen, wobei eine MDMX-Überexpression fast immer mit Wildtyp-p53 korrelierte (Ramos *et al.*, 2001). In dieser Untersuchung konnte auch gezeigt werden, dass MDMX in drei von sieben Ovarialkarzinom-Zelllinien überexprimiert wird. Wie oben bereits beschrieben, können in Tumoren auch MDM2- und MDMX-Spleißvarianten vorkommen, deren Bedeutung aber noch nicht geklärt ist. Bisher gibt es im Hinblick auf die klinische und prognostische Relevanz von MDMX-Veränderungen insbesondere bei Ovarialkarzinomen jedoch kaum Daten aus der Literatur.

1.3.4 MDM2 und MDMX als Target in der Krebstherapie

In etwa der Hälfte aller Tumoren ist die Funktion von p53 durch Mutationen gestört (Hollstein *et al.*, 1991). In den Tumoren mit Wildtyp-p53 finden sich häufig Veränderungen im Regulations- und Signalweg von p53. Eine dieser Veränderungen ist dabei die Überexpression des Onkoproteins MDM2 (Momand *et al.*, 1998). Der Einsatz von MDM2-Inhibitoren stellt dabei einen interessanten neuen Ansatzpunkt für die Krebstherapie dar. In den letzten Jahren wurde eine steigende Anzahl von „small molecules“ entwickelt, welche die Interaktion von MDM2 und p53 inhibieren sollen (Fotouhi und Graves, 2005; Klein and Vassilev, 2004; Momand *et al.*, 1998; Vassilev *et al.*, 2004). Die ersten wirksamen, selektiven MDM2-Inhibitoren war eine Gruppe von cis-Imidazol-Verbindungen, den sogenannten Nutlins (Vassilev *et al.*, 2004). Grundlage für die Entwicklung dieser Inhibitoren war die Veröffentlichung der Kristallstruktur der Transaktivierungsdomäne von p53 und der p53-Bindedomäne von MDM2. Die Amino-

säuren der p53-Bindedomäne von MDM2 bilden eine große hydrophobe Tasche. Diese Tasche interagiert mit nur drei Aminosäureresten (Phe¹⁹, Trp²³, Leu²⁶) der p53-Transaktivierungsdomäne (Kussie *et al.*, 1996). Die Gruppe der Nutlin-Inhibitoren greift in diese hochspezifische Bindung ein, indem sie die Struktur der drei kritischen Aminosäurereste von p53 nachahmen und so mit p53 um die Bindung an der hydrophoben Tasche von MDM2 konkurrieren. Von den untersuchten Nutlin-Verbindungen inhibiert Nutlin-3 die Interaktion von Wildtyp-p53 und MDM2 am besten (Vassilev *et al.*, 2004). In Maus-Xenografts der Osteosarkomzelllinie SJSA-1 konnte das Tumorstadium durch Gabe von Nutlin-Racematen (200mg/kg Körpergewicht über 20 Tage) um über 90 % reduziert werden. Diese Ergebnisse ließen die Vermutung zu, dass reaktiviertes p53 nicht nur den Zellzyklus inhibiert, sondern auch Apoptose in Tumoren auslösen kann (Tovar *et al.*, 2006; Vassilev, 2004). Im Gegensatz zu Tumorzellen löst Nutlin in Mausfibroblasten und humanen Fibroblasten keine Apoptose aus, sondern Zellzyklusarrest, wobei die Teilung der Zellen nach Entfernen des Inhibitors wieder einsetzt. Nach 3-wöchiger Nutlin-Behandlung zeigten die Mäuse kein reduziertes Körpergewicht und auch keine anderen pathologischen Auffälligkeiten (Vassilev, 2004). Aus diesen Beobachtungen ergibt sich auch ein möglicher Einsatz von Nutlin bei Tumorkranken mit mutiertem p53. Nutlin verhindert bei Fibroblasten mit Wildtyp-p53 den Eintritt in die Mitose und schützt sie somit teilweise gegen hohe Dosen von Paclitaxel. Tumorzellen mit mutiertem p53 behalten aber unter der gleichen Behandlung ihre Sensitivität gegenüber Mitoseinhibitoren. So könnte bei Patienten mit p53-mutierten Tumoren eine Behandlung mit MDM2-Antagonisten Wildtyp-p53 im normal proliferierenden Gewebe aktivieren und Zellzyklusarrest auslösen, wodurch das Ansprechen auf antimitotische Chemotherapeutika herabgesetzt wird. Diese Nutlin-Behandlung hat keinen Einfluss auf Tumorzellen mit mutiertem p53, die auf Paclitaxel unverändert gut ansprechen würden. So könnte das Normalgewebe zumindest teilweise vor den zytotoxischen Nebenwirkungen der Mitoseinhibitoren geschützt und Nebenwirkung der Behandlung reduziert werden (Carvajal *et al.*, 2005). Ob auch die Bindung von des MDMX-Proteins an das p53-Protein durch Nutlin inhibiert wird, ist noch nicht vollständig geklärt. Aufgrund der hohen Homologie in der p53-Bindedomäne von MDMX und MDM2 könnte Nutlin auch die MDMX-Bindung an das p53-Protein verhindern. Ein nach Nutlin-Behandlung erhöhtes MDM2-Niveau könnte auch zu einem verstärkten MDMX-Abbau führen.

Überraschenderweise zeigten verschiedene Arbeitsgruppen, dass Nutlin-3 in Tumorzelllinien mit MDMX-Überexpression die MDMX-p53-Bindung nicht inhibieren kann und auch kein verstärkter Proteinabbau stattfindet. Erst nach Knock-down von MDMX mittels siRNA löst Nutlin Zellzyklusarrest und Apoptose aus (Hu *et al.*, 2006; Patton *et al.*, 2006). Laurie *et al.* konnten jedoch in Retinoblastom-Zelllinien zeigen, dass Nutlin-3 die MDMX-p53 Interaktion verhindert und so Apoptose ausgelöst wird (Laurie *et al.*, 2006). Die Fähigkeit von Nutlin die MDMX-p53 Interaktion zu inhibieren, muss daher noch weiter untersucht und gegebenenfalls ein weiterer Inhibitor entwickelt werden, der auch an die p53-Bindungsdomäne des MDMX-Proteins binden kann.

1.4 Die Rolle von microRNAs in Tumoren

MicroRNAs sind kleine, 18-25 bp lange, nichtkodierende RNAs endogenen Ursprungs. Die erste identifizierte microRNA war lin-4 in *Caenorhabditis elegans* (Lee *et al.*, 1993; Ruvkun *et al.*, 1989). Versuche von verschiedenen Arbeitsgruppen, kleine ~22 nt lange RNAs zu klonieren, resultierte in der Identifikation von einigen hundert microRNAs in verschiedenen Organismen (Lagos-Quintana *et al.*, 2001; Lau *et al.*, 2001; Lee and Ambros, 2001; Ruvkun *et al.*, 1989). Derzeit sind 721 humane microRNAs bekannt (http://microrna.sanger.ac.uk/cgi-bin/sequences/mirna_summary.pl?org=hsa; RBase12.0; Stand April 2010). Es wird aber geschätzt, dass das menschliche Genom über 1000 microRNA-Gene enthält. Weiterhin wird davon ausgegangen, dass mehr als 30 % der humanen mRNAs durch eine oder mehrere microRNAs reguliert werden können (Lewis *et al.*, 2005). MicroRNAs werden mittels RNA-Polymerase II als lange primäre miRNA (pri-miRNA) Transkripte synthetisiert (siehe Abbildung 1-5) (Cai *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004). Etwa 40 % der microRNAs sind in den Intronen von proteinkodierenden Genen lokalisiert und werden nach dem Spleißen autonom prozessiert (Rodriguez *et al.*, 2004). Diese pri-miRNA-Transkripte werden von dem sogenannten Microprozessorkomplex erkannt und in pre-miRNAs geschnitten (Denli *et al.*, 2004; Gregory *et al.*, 2004). Mittels des Transporters Exportin-5 wird die pre-miRNA vom Zellkern ins Zytoplasma transportiert (Bohnsack *et al.*, 2004; Yi *et al.*, 2003). Dort wird die pre-miRNA mittels eines weiteren RNase III-Enzyms, Dicer, in imperfekte dsRNA-Duplices zerschnitten (Hutvagner und Zamore, 2002). Der Strang mit der geringeren Stabilität des 5'-Endes wird bevorzugt in dem „RNA-induced silencing complex“ (RISC) verwendet, während der komplementäre miRNA*-Strang

schnell degradiert wird (Khvorova *et al.*, 2003; Schwarz *et al.*, 2003). Bindet die entstandene reife microRNA dann in perfekter Übereinstimmung an eine mRNA, so wird diese mRNA zerschnitten und abgebaut (Liu *et al.*, 2004). Ein weiterer Weg des microRNA-induzierten mRNA-Silencing ist die translationelle Reprimierung. Dabei kommt es zu einer unvollständigen komplementären Bindung der microRNA an eine oder mehrere Sequenzen im 3'-UTR, die dazu führt, dass die Bildung des ribosomalen

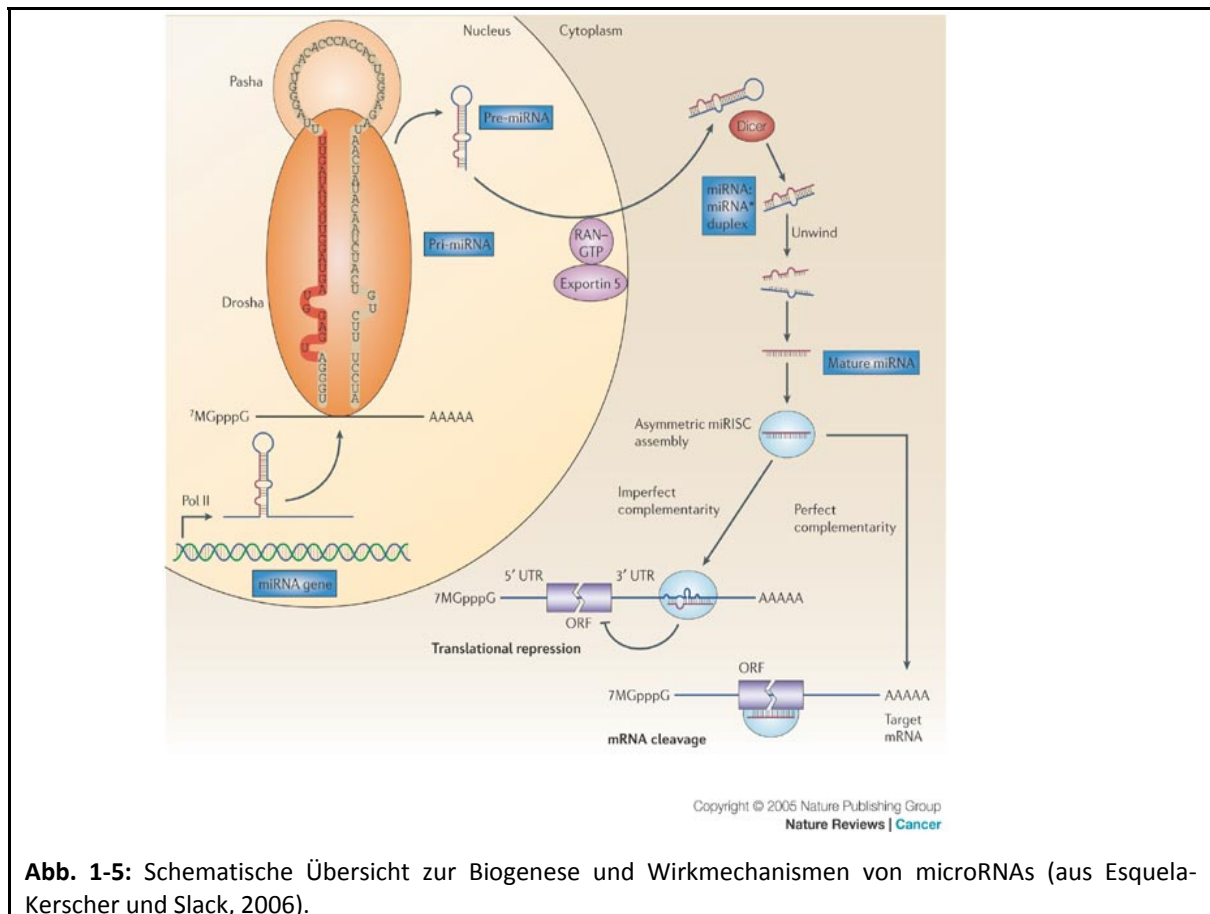


Abb. 1-5: Schematische Übersicht zur Biogenese und Wirkmechanismen von microRNAs (aus Esquelakersch und Slack, 2006).

Komplexes inhibiert wird (Bartel, 2004; Valencia-Sanchez *et al.*, 2006). Aufgrund dieser unvollständigen Bindung kann eine einzige microRNA an bis zu 200 Zielgene binden (Lim *et al.*, 2005). Die Expression von microRNAs ist in einer Vielzahl von Karzinomen verändert. Dabei regulieren die microRNAs sowohl Tumorsuppressorgene als auch Onkogene. Über 50 % der humanen microRNAs sind in sogenannten instabilen Regionen (fragile sites) im Genom lokalisiert. Diese Stellen sind dadurch charakterisiert, dass diese Bereiche eines Chromosoms besonders zugänglich sind für Bruch, Amplifikation oder Fusion mit anderen Chromosomenabschnitten (Calin *et al.*, 2004). Die microRNA mir-125b-1 zum Beispiel ist in einer instabilen Region auf Chromosom 11q24 lokalisiert, einer Region die in den Tumoren vieler Mamma-, Lungen-, Ovarial- und

Zervixkarzinompatienten verloren gegangen ist (Calin *et al.*, 2004). In kolorektalen Karzinomen ist die Expression der reifen microRNAs mir-143 und mir-145 deutlich reduziert. Die Menge an pri-miRNA ist jedoch unverändert, was vermuten lässt, dass die Prozessierung dieser microRNAs in kolorektalen Karzinomen gestört ist (Michael *et al.*, 2003). Dies sind Beispiele dafür, dass microRNAs als Tumorsuppressoren wirken können. Auf der anderen Seite gibt es auch microRNA-Loci auf stark amplifizierten chromosomalen Bereichen. So konnte im Falle des Chromosom 13q31, das besonders in folliculären Lymphomen, B-Zell-Lymphomen und verschiedenen Lungen- und Kopf/Hals-Tumoren amplifiziert vorliegt, ein solcher Locus (C13orf25) identifiziert werden (Ota *et al.*, 2004). Innerhalb des nicht-kodierenden Transkriptes befinden sich die Precursor der microRNAs miR-17, miR-18, miR-19a, miR-20, miR-19b und miR-92. Die erhöhte Expression dieser microRNAs, als miR-17-92-Cluster oder Oncomir1 bekannt, wurde in verschiedenen primären Lymphomen und einer Reihe von Tumorzelllinien nachgewiesen (He *et al.*, 2005; Tagawa and Seto, 2005). Auch in Lungenkarzinomen korreliert die Überexpression des miR-17-92-Clusters mit einer erhöhten Wachstumsrate des Tumors (Hayashita *et al.*, 2005; Tagawa and Seto, 2005). Neuste Untersuchungen lassen auch einen Zusammenhang zwischen microRNA Expression und Chemoresistenz vermuten (Blower *et al.*, 2007). Auch beim Ovarialkarzinom scheint die Expression bestimmter microRNAs mit einem chemoresistenten Phänotyp assoziiert zu sein (Boren *et al.*, 2009).

1.5 Die Rolle von Polymorphismen in Tumoren

Polymorphismen sind Sequenzveränderungen, die in mehr als einem Prozent der Bevölkerung auftreten. Bei dem „single nucleotide polymorphism“ (SNP), der häufigsten Veränderung, ist eine Base durch eine andere ersetzt. Eine große Anzahl dieser natürlichen Varianten ist in den nicht-codierenden Bereichen der Gene, den Intronen, lokalisiert. Im p53-Gen konnten 85 verschiedene Polymorphismen identifiziert werden (Olivier *et al.*, 2002) (<http://www-p53.iarc.fr/PolymorphismView.asp>; Stand April 2010). In Codon 72 des p53-Gens bewirkt eine Guanin/Cytosin Veränderung, den Austausch der Aminosäure Arginin (R72) zu Prolin (P72). Dieser Polymorphismus liegt in der prolinreichen Region von p53, die wichtig für die wachstumshemmenden und apoptotischen Funktionen des Proteins ist (Walker und Levine, 1996). Diese Sequenzvariation tritt unterschiedlich häufig in verschiedenen ethnischen Gruppen auf. In

der nördlichen Hemisphäre findet sich hauptsächlich die Aminosäure Arginin, während in Afrika häufiger die Aminosäure Prolin gefunden wird (Beckman *et al.*, 1994). Experimente zeigten, dass das p53-Protein mit Arginin an Position 72 effektiver durch das E6-Protein des humanen Papillomavirus-Typs 16 (HPV16) markiert und abgebaut werden kann. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Frauen mit homozygoten Arg72-Allelen häufiger an HPV-induzierten Zervixkarzinomen erkranken (Storey *et al.*, 1998). Dies konnte jedoch bislang nicht vollständig bewiesen werden (Klug *et al.*, 2001). Es wurde weiterhin gezeigt, dass die Codon 72 Polymorphismusvarianten, ein verändertes apoptotisches Potential besitzen. Die R72-Variante besitzt ein erhöhtes apoptotisches Potential, während die P72-Variante eine wachstumshemmende Funktion hat (Pim and Banks, 2004). Aufgrund dieser Ergebnisse gab es viele Studien, die eine Korrelation des Polymorphismus mit der Tumorentstehung untersucht haben. Die Ergebnisse waren jedoch nicht konsistent. Einige Studien zeigten, dass die R72-Variante mit einem erhöhten Risiko an einem epithelialen Karzinom zu erkranken korreliert. Dazu gehören zum Beispiel Karzinome des Magens (Shen *et al.*, 2004), des Ovars (Pegoraro *et al.*, 2002), der Haut (Dokianakis *et al.*, 2000) oder der Lunge (Wu *et al.*, 2002). Andere Studien zeigten, dass die P72-Variante mit einem erhöhten Risiko an, zum Beispiel Schilddrüsenkarzinomen (Granja *et al.*, 2004) zu erkranken, korreliert. Andere Arbeitsgruppen fanden keinen Zusammenhang zwischen dem Codon 72 Polymorphismus und dem Risiko, an einem Tumor zu erkranken. Ursache für diese kontroversen Ergebnisse, könnte sein, dass in diesen Studien oft nicht der p53-Mutationsstatus, sondern nur der Polymorphismus bestimmt wurde.

Sequenzvariationen finden sich auch in vielen weiteren Genen, wie zum Beispiel in p21 oder MDM2. Bond *et al.* identifizierten einen Polymorphismus (T>G) im Intron 1 des MDM2-Gens, an Position 309 (SNP309). Dieser Polymorphismus ist im p53-sensitiven P2-Promotor des MDM2-Gens lokalisiert und korreliert mit einer Abschwächung des p53-Tumorsuppressorweges (Bond *et al.*, 2004). Der SNP309 erhöht die Affinität des Transkriptionsfaktors SP1 zum MDM2-P2-Promotor, was eine erhöhte MDM2 Expression in den Zellen mit G/G-Genotyp zur Folge hat. Bei Weichteilsarkomen zeigte sich, dass Patienten mit G/G-Genotyp 12 Jahre früher an ihrem Tumor erkranken als Patienten mit T/T-Genotyp (Wildtyp). Die Allelverteilung in den Tumorproben entsprach der Verteilung in gesunden Blutspendern. Es scheint also keine Anreicherung des G-Allels in den Tumorproben zu geben (Bond *et al.*, 2004). Weitere Studien belegten dann auch in

anderen Karzinomen, dass das Auftreten des G-Allels des SNP309 mit einem abgeschwächten p53-Weg, einem erhöhten Tumorrisiko und einer früheren Tumorentstehung korreliert ist (Lind *et al.*, 2006; Menin *et al.*, 2006; Swinney *et al.*, 2005).

In letzter Zeit wurden auch vermehrt Polymorphismen in microRNA-Bindestellen nachgewiesen. Für die Bindung einer microRNA an den 3'-UTR einer mRNA sind die ersten 2-8 Basen des 5'-Endes der microRNA, der sogenannten seed-Region, von Bedeutung. Über diese Basen bindet die microRNA durch komplementäre Watson-Crick-Paarung an die mRNA. Polymorphismen in der seed-Region der microRNA-Bindestelle können die microRNA-mRNA Interaktion verändern und so die Expression von microRNA-Zielgenen verändern (Barnes *et al.*, 2007; Kertesz *et al.*, 2007). Durch die Polymorphismen kann die microRNA-Bindung verstärkt oder abgeschwächt werden, oder es können ganz neue microRNA-Bindestellen entstehen. He *et al.* fanden Polymorphismen in microRNA-Bindestellen des *KIT*-Gens bei Schilddrüsenkarzinompatienten (He *et al.*, 2005). Einer dieser Polymorphismen, ein G/A Austausch, verhindert die Bindung der microRNA mir-221. Dadurch wird die mRNA des Onkogens *KIT* stabilisiert und mehr Protein translatiert. Daher haben diese Patienten ein erhöhtes Risiko, an einem papillärem Schilddrüsenkarzinom zu erkranken. Da microRNAs sehr kurz und hoch konserviert sind, wird angenommen, dass die Frequenz von Polymorphismen oder Mutationen innerhalb der microRNAs gering ist. Generell spielen Polymorphismen eine wichtige Rolle bei der Funktion von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen und können zur Tumorentstehung beitragen.

1.6 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, in einer Serie von Ovarialkarzinomen Alterationen im p53-MDM2-MDMX-Pathway aufzuklären. Dabei standen die Analyse von Veränderungen auf DNA- und Expressionsebene des Tumorsuppressors p53 und der Onkogene MDM2 und MDMX im Vordergrund.

Zunächst sollten die zur Verfügung stehenden Tumorproben auf eine Amplifikation des MDM2- und des MDMX-Gens hin untersucht werden. Weiterführend sollte nachgeprüft werden, ob es einen möglichen Zusammenhang zwischen Genamplifikation und mRNA-Expression gibt.

Im nächsten Schritt sollte das Ovarialkarzinom-Kollektiv hinsichtlich des p53-Mutationsstatus charakterisiert werden. Dafür wurden Exon drei bis neun des p53-Gens sequenziert. Neben der Mutationsrate wurde auch die p53-Proteinexpression mittels Immunhistochemie bestimmt. Zusätzlich zu diesen Daten wurde auch der Status des SNP309-Polymorphismus im P2-Promotor des MDM2-Gen analysiert.

Bisher gibt es wenig Daten zu möglichen Mutationen im MDMX-Gen. Daher sollten alle elf Exone des MDMX-Gens hinsichtlich möglicher Mutationen und Polymorphismen untersucht werden. Treten solche Veränderungen auf Genebene auf, sollte deren Bedeutung für den MDMX-p53-Tumorsuppressorpathway weiter untersucht werden. Mutationen oder Polymorphismen im MDMX-Gen könnten die Transkriptions- oder Translationseffizienz beeinflussen oder die Stabilität der mRNA und des Proteins verändern, und so möglicherweise zu einer Abschwächung des p53-Weges führen. Diese Möglichkeiten sollten in dieser Arbeit mit untersucht werden

Alle erhaltenen molekularen Daten wurden mit den klinischen Parametern, wie Alter bei Diagnosestellung, Tumorstadium, Resttumor, Rezidiventstehung und dem Gesamtüberleben korreliert, um zu ermitteln, ob bestimmte Veränderungen einen Einfluss auf die Prognose von Ovarialkarzinompatientinnen haben. Dabei war von besonderem Interesse, ob bestimmte Mutationen mit einer früheren Tumorentstehung, Chemoresistenz oder einem höheren Tumorstadium einhergehen. Anhand der molekularen Daten sollten mögliche Patientengruppen identifiziert werden, die eine besonders gute oder schlechte Prognose aufweisen.

2. Material

2.1 Tumormaterial und Patientengut

In dieser Arbeit wurden Formalin-fixierte Proben von 118 invasiven Ovarialkarzinomen nach Verfügbarkeit des Materials ausgewählt. Die Fälle wurden zwischen 1997 und 2009 am Institut für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle diagnostiziert. Die Studie wurde durch das lokale Ethikkomitee genehmigt. Alle histologischen Schnitte wurden durch zwei Pathologen (Elise Gradhand und Steffen Hauptmann) reevaluiert. Die Tumorproben und das Patientenkollektiv sind in Tabelle 2-1 und 2-2 ausführlich beschrieben. Zu Beginn der Arbeit wurde mit dem Kollektiv von 107 Patienten (siehe Tabelle 2-1) gearbeitet.

Tabelle 2-1: Zusammenfassung der klinisch-pathologischen Daten der Ovarialkarzinompatientinnen diagnostiziert bis 2005

Charakteristika	Patienten (n=107)	
	Anzahl	Prozent
Tumor-Zelltyp		
serös	62	57.9
endometrioid	14	13.1
gemischt	11	10.3
klarzellig	9	8.4
TCC	1	0.9
UC	8	7.5
MC	2	1.9
Tumor Stadium (n=107)		
FIGO Stadium I	30	28.0
FIGO Stadium II	9	8.4
FIGO Stadium III	63	58.8
FIGO Stadium IV	5	4.7
Alter der Patienten, Jahre		
Mittelwert		63.5
Median		64.0
Standardabweichung		11.5
Art der Therapie (n=107)		
Cisplatin+Paclitaxel	62	57.9
Platin-basierte Chemotherapie w/o Paclitaxel	21	29.7
andere	2	1.9
keine (FIGO Ia)	5	4.7
abgelehnt / tot	13	12.1
Daten fehlen	4	3.7
Resttumor (n=95)		
kein	39	41.0
< 1 cm	22	23.1
> 1 cm	34	35.8

Abkürzungen: MC – muzinöses Karzinom des Ovars; TCC – Transitionalzellkarzinom des Ovars; UC – undifferenziertes Karzinom des Ovars

Später wurde das Kollektiv um neu diagnostizierte Fälle erweitert und alle folgenden Untersuchungen an diesem Kollektiv durchgeführt (siehe Tabelle 2-2). Die histologische

Klassifikation erfolgte nach den Richtlinien der WHO, das Grading nach Silverberg (Silverberg, 1999) (siehe Tabelle 8-1).

Tabelle 2-2: Zusammenfassung der klinisch-pathologischen Daten der Ovarialkarzinompatientinnen diagnostiziert bis 2009

Charakteristika	Patienten (n=118)	
	Anzahl	Prozent
Tumor-Zelltyp		
serös	67	56.8
endometrioid	17	14.4
gemischt	13	11.0
klarzellig	10	8.5
TCC	1	0.8
UC	8	6.8
MC	2	1.7
Tumor Stadium (n=118)		
FIGO Stadium I	35	29.7
FIGO Stadium II	10	8.5
FIGO Stadium III	66	55.9
FIGO Stadium IV	7	5.9
Alter der Patienten, Jahre		
Mittelwert		64.3
Median		64.3
Standardabweichung		10.7
Art der Therapie (n=116)		
Cisplatin+Paclitaxel	67	57.8
Platin-basierte Chemotherapie w/o Paclitaxel	21	18.1
andere	2	1.7
keine (FIGO Ia)	9	7.8
abgelehnt / tot	13	11.2
Daten fehlen	4	3.4
Resttumor (n=105)		
kein	46	43.8
< 1 cm	24	22.9
> 1 cm	35	33.3

Abkürzungen: MC – muzinöses Karzinom des Ovars; TCC – Transitionalzellkarzinom des Ovars; UC – undifferenziertes Karzinom des Ovars

Für statistische Untersuchungen wurde vergleichendes Material (DNA) von gesunden Kontrollpersonen benötigt. Dieses wurde freundlicher Weise durch das HLA-Labor der Immunologie, der Humangenetik sowie der Rechtsmedizin der Martin-Luther-Universität zur Verfügung gestellt. Das Alter der Kontrollpersonen lag zwischen 21 und 85 Jahren, mit einem Mittelwert von 41,9 Jahren. Die Kontrollpersonen haben Ihr Einverständnis zur wissenschaftlichen Nutzung des Materials gegeben.

Für die Anfertigung dieser Arbeit wurden neun Ovarialkarzinom-Zelllinien und eine von gesundem Ovarialepithel abstammende Zelllinie (HOSE) untersucht (Tabelle 2-3). Ein Teil der Zelllinien wurde über die ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) bezogen. Die entsprechenden ATCC-Nummern sind in Tabelle 2-3 dargestellt. Die Zelllinien EFO-21 und EFO-27 wurden über die „Deutsche Sammlung von

Mikroorganismen und Zellkulturen“ (Braunschweig) und die Zelllinien A2780 und OAW-42 über die „Europäische Sammlung an Zellkulturen“ (Salisbury, UK) erworben.

Tabelle 2-3: In dieser Arbeit verwendete Ovarialkarzinomzelllinien.

Name	Ursprung	ATCC-Nummer	Referenzen
HOSE	Ovarialepithel		(Tsao <i>et al.</i> , 1995)
OAW-42	Cystadenokarzinom		(Wilson, 1984)
SKOV-3	Adenokarzinom	HTB-77	(Fogh <i>et al.</i> , 1977)
ES-2	Klarzelliges Ovarialkarzinom	CRL-1978	(Lau <i>et al.</i> , 1991)
OVCAR-3	Adenokarzinom	HTB-161	(Hamilton <i>et al.</i> , 1983)
EFO-21	Cystadenokarzinom		(Simon J, 1983)
EFO-27	Adenokarzinom		(Simon J, 1983)
A2780	Ovarialkarzinom		(Behrens <i>et al.</i> , 1987)
PA-1	Teratokarzinom	CRL-1572	(Zeuthen <i>et al.</i> , 1980)
Caov-3	Adenokarzinom	HTB-75	(Karlán <i>et al.</i> , 1994)

2.2 Primer und Oligonukleotide

Die verwendeten Primer wurden mit Hilfe des Programms CloneManager erstellt und von TIB MOLBIOL (Berlin) synthetisiert.

Tabelle 2-4: In dieser Arbeit verwendete Primer.

Name	Sequenz 5' → 3'	Orientierung	Referenzen
GAPDH-3	5'-AGGAGCGAGATCCCTCCAAA-3'	sense	
GAPDH-5	5'-AGGAGCGAGATCCCTCCAAA-3'	antisense	
HPRT 185fw	5'-AGGGTGTATTATCCTCATGG-3'	sense	
HPRT 667rev	5'-GTCAAGGGCATATCCTACAA-3'	antisense	
HPRT 309fw	5'-TTGCTGACCTGCTGGATTAC-3'	sense	
HPRT 507rev	5'-CTTGCGACCTTGACCATCTT-3'	antisense	
p53 769fw	5'-CTGGAAGACTCCAGTGGTAA-3'	sense	
p53 873rev	5'-CTTGCGGAGATTCTTCTCT-3'	antisense	
p53 Ex3fw	5'-TAGCAGAGACCTGTGGGAAGC-3'	sense	Reles <i>et al.</i> , 2001
p53 Ex3rev	5'-AGAGCAGTCAGAGGACCAGGT-3'	antisense	Reles <i>et al.</i> , 2001
p53 Ex4fw	5'-CGTTCTGGTAAGGACAAGGGT-3'	sense	Reles <i>et al.</i> , 2001
p53 Ex4rev	5'-AAGAAATGCAGGGGATACGG-3'	antisense	Reles <i>et al.</i> , 2001
p53 Ex5fw	5'-CTGTTCACTTGCCCTGAC-3'	sense	Reles <i>et al.</i> , 2001
p53 Ex5rev	5'-AACCAGCCCTGTCGTCTCTC-3'	antisense	Reles <i>et al.</i> , 2001
p53 Ex6fw	5'-GCTGGAGAGACGACAGGGCT-3'	sense	Reles <i>et al.</i> , 2001
p53 Ex6rev	5'-CAACCACCCTTAACCCCTCC-3'	antisense	Reles <i>et al.</i> , 2001
p53 Ex7fw	5'-CTTGCCACAGGTCTCCCAA-3'	sense	Reles <i>et al.</i> , 2001
p53 Ex7rev	5'-AGGGGTCAGCGCAAGCAGA-3'	antisense	Reles <i>et al.</i> , 2001

Name	Sequenz 5' → 3'	Orientierung	Referenzen
p53 Ex8fw	5'-TTCCTTACTGCCTCTTGCTT-3'	sense	Reles <i>et al.</i> , 2001
p53 Ex8rev	5'-AGGCATAACTGCACCCTTGG-3'	antisense	Reles <i>et al.</i> , 2001
p53 Ex9fw	5'-AGCAAGCAGGACAAGAAGCG-3'	sense	Reles <i>et al.</i> , 2001
p53 Ex9rev	5'-GCAAATGCCCAATTGCAGG-3'	antisense	Reles <i>et al.</i> , 2001
X 303rev	5'-GAGATCCTGCAACACTGTC-3'	antisense	
Xquant 374fw	5'-ACGTCAGAGCTTCTCCGTGAA-3'	sense	
FL-X AS6	5'-CTGTGCGAGAGCGAGTCTG-3'	sense	
XS AS	5'-GCACTTTGCTGTAGTAGCAGTG-3'	sense	
MDMX-3	5'-GCAGTTTCTTCACTACCA-3'	sense	
MDMX-8	5'-AGCCTAGATGTTTCATCTTG-3'	antisense	
MDMX-11	5'-ACCAACAGACTGCAGTTT-3'	sense	
MDMX-12	5'-TGCCTAAGAACATTCTTGACA-3'	antisense	
MDMX-13	5'-ATGACATCATTTTCCACCTC-3'	sense	
MDMX-14	5'ATGTTCTGACTACCATTATGCTAT-3'	antisense	
XEx1fw	5'-CCTCGTGTGAGGCCGTGTGG-3'	sense	
XEx1rev	5'-GGCCGCTGCTCCTCACTCT-3'	antisense	
XEx2fw	5'-GTTGCCTTTGTGTAATGCTAA-3'	sense	
XEx2rev	5'-ACAGTCATGAGACAGCTAAACT-3'	antisense	
XEx3fw	5'-TATCAGGTACGACCAAAACT-3'	sense	
XEx3rev	5'-ATGGCTTACCTCTTAAACAG-3'	antisense	
XEx4fw	5'-AGCGGTTTCCTGTTGTAGG-3'	sense	
XEx4rev	5'-GGCTAGGTATAAGCACCCAAA-3'	antisense	
XEx5fw	5'-TTAACGGCAAACCACTGAT-3'	sense	
XEX5rev	5'-CCTTGAACCTCAAAGCTGTGATA-3'	antisense	
XEx6fw	5'-GGGTTGTTTCTGAGGTCCTT-3'	sense	
XEx6rev	5'-GGGAGTCCAAGATCCATAGGT-3'	antisense	
XEx7fw	5'-TAACTGGTGAGCCAGAATGGAA-3'	sense	
XEx7rev	5'-ATCCCTCTCCTTACTTCACATAC-3'	antisense	
XEx8fw	5'-AGCTCTGCCACTAAGACA-3'	sense	
Xex8rev	5'-GCCACTTCCCTTCAAATGTG-3'	antisense	
XEx9fw	5'-GATGTAGTGTGACGACATTGAG-3'	sense	
XEx9rev	5'-TGAGCACACAAACAGAATCAAC-3'	antisense	
XEx10fw	5'-GTGTTTGGTCTTGCAATTAAGC-3'	sense	
XEx10rev	5'-TGAAGTCTGGGATTACATCA-3'	antisense	
XEx11-1fw	5'-ACTGGTGTGGAATAGCTTAGTG-3'	sense	
XEx11-1rev	5'-ACGCATCTTTAGGTCTAACGAC-3'	antisense	
XEx11-2fw	5'-CCTGATTGTCGAAGAACCATT-3'	sense	
XEx11-3fw	5'-GGAGGATTGCCAGAATCTCT-3'	sense	
XEx11-3rev	5'-GAATAATGTTCCCGTCTCGT-3'	antisense	
Xp53REfw	5'GTATATGTCCATCTCGGTTT-3'	sense	
Xp53RErev	5'GGGATTTACCAAGGTAAGTC-3'	antisense	
XSNP34091fw	5'AGCATAATGGTAGTACGAACATA-3'	sense	
X31222fw	5'-AGTGATGATACCGATGTAG-3'	sense	
X31339rev	5'-GCACTCTTCAACACAAGTGAAC-3'	antisense	
X31053fw	5'-GTGCTAGAGATGGGAGAAGA-3'	sense	
X31188rev	5'-TCCCACTTCAATCACCTGTG-3'	antisense	
X31684fw	5'-GCTTAATTTCCACACAGATTAG-3'	sense	
X32015rev	5'-TTGGCAATGAATACCATAATG-3'	antisense	

Name	Sequenz 5' → 3'	Orientierung	Referenzen
MD_33584fw	5'-AATAAGCCCTGCCAGTATG-3'	sense	
MD_33800 rev	5'-TTCCACTACCAAAGTAGGTCAA-3'	antisense	
SNP 309fw	5'-CGGGAGTTCAGGGTAAAGGT-3'	sense	Bond <i>et al.</i> , 2004
SNP309rev	5'-AGCAAGTCGGTGCTTACCTG-3'	antisense	Bond <i>et al.</i> , 2004

Für die Messung des Gehalts an MDMX-mRNA mit A- und C-Allel in A/C-Zellen wurden in der Arbeitsgruppe von Jean-Christophe Marine folgende Primer verwendet:

5'-HEX-iso-dC-CATGATCCTGGTAAGTGAAGTGA-3' für das A-Allel

5'-FAM-iso-dC-GGATCGATGTAAGTGAACGGA-3' für das C-Allel

5'-AGTACGAACATAAAAATGCATTTAT als reverse primer für beide Reaktionen.

Die verwendeten Oligonukleotide wurden durch die Firma Qiagen, Hilden synthetisiert.

Tabelle 2-5: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide.

Name	Sequenz 5' → 3'	Katalognummer	Referenzen
Hs_MDM4_1	AGCCCTCTATGATATGCTA	SI00037142	Qiagen
Hs_MDM4_2	AAAGAGGTCATGCACTATTTA	SI00037142	Qiagen
Luciferase	AACGTACGCGGAATACTTCGA	1488998_10	Qiagen

Die für die Untersuchungen verwendeten „target-site“ Blocker binden spezifisch an eine überlappende Sequenz der mir-191-Bindestelle und dem 3'-UTR des MDMX-Gens mit folgender Sequenz: 5'-GTGGTAAGTGAACGGAAT-3'. Dieser Blocker bindet nicht signifikant an einen anderen humanen 3'-UTR, ausser an den von MDMX. Als Kontrolle wurde ein mismatch-Blocker eingesetzt: 5'-GTGGTCAGTTCAGCGATT-3' (Unterschiede unterstrichen), welcher keine signifikanten Bindungen mit dem 3'-UTR von MDMX oder einem anderen humanen 3'-UTR eingeht. Diese Blocker wurden als vollständig phosphorothioilierte DNA/LNA-Mixe synthetisiert, mit einem LNA-Anteil von 33,3 %.

2.3 Taqman Assays

Taqman MicroRNA Assays

Hsa-mir191 20x realtime Mix (TM000490)	Applied Biosystem, USA
Hsa-mir191 5x RT primer (RT000490)	Applied Biosystem, USA
U18-snoRNA 20x realtime Mix (TM001204)	Applied Biosystem, USA
U18-snoRNA 5x RT primer (RT001204)	Applied Biosystem, USA

Taqman SNP Genotyping Assays

XSNP31112 (571489)	Applied Biosystems, USA
XSNP31826 (511224)	Applied Biosystems, USA
XSNP34091 (516623)	Applied Biosystems, USA

2.4 Antikörper

Tabelle 2-6: In dieser Arbeit verwendete Antikörper.

Antigen	Klon	Verdünnung	Ursprungstier	Firma
MDMX	BL-1258	1:1.000	Kaninchen	Bethyl Laboratories
MDM2	N-20	1:1.000	Kaninchen	Santa Cruz
β-Actin		1:1000	Maus	Sigma
Vinculin		1:1000	Maus	Sigma
p53	DO-7	1:1000	Maus	Dako
p53 (IHC)	DO-7	1:100	Maus	Dako
ERα (IHC)	SP-1	1:100	Maus	Labvision
MDMX (IHC)	(GST-MDMXΔ109-198)	1:100	Kaninchen	Han <i>et al.</i> , 2007
Anti-Maus		1:10.000	Kaninchen	Dako
Anti-Kaninchen		1:10.000	Ziege	Dako

2.5 Enzyme

DNase, RNase-frei (1500 Kunitz-Units)	Qiagen, Hilden
Hot FIREPol® (5 U/μL)	Solis Biodyne, Estland
SuperScript II RNase H Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
T4-Ligase (4 U/μL)	Invitrogen, Karlsruhe

2.6 Kits

BigDye Terminator v1.1 / v3.1 Sequencing Kit	Applied Biosystem, USA
Dual-Glo-Luciferase-Assay	Promega, Heidelberg
ECL-Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare, Freiburg
ECL Plus Western Blotting Detection System	GE Healthcare, Freiburg
miRNeasy FFPE Kit	Qiagen, Hilden
Plexor qPCR Kit	Promega, Heidelberg
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAshredder-Säulen	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QuantiTect SYBR® Green PCR Kit	Qiagen, Hilden
Maxima SYBR Green qPCR Master Mix	Fermentas, St.Leon-Rot
Plasmid Miniprep Kit	Qiagen, Hilden

RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystem, USA
TaqMan Universal Master Mix, No AmpErase UNG	Applied Biosystem, USA
TOPO-TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Transfektionskit (Effectene)	Qiagen, Hilden
Venor <i>GeM</i> Mycoplasma Detection Kit	Minerva, Berlin

2.7 Vektoren

Für die Luciferase-Assays wurde das zu untersuchende Fragment in den psicheck2 Luciferase-Reportervektor der Firma Promega (Heidelberg) kloniert.

2.8 Chemikalien und Reagenzien

Agar	Invitrogen, Karlsruhe
Agarose	Serva, Heidelberg
Ampicillin	Serva, Heidelberg
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Caspase-Glo® 3/7 Assay	Promega, Heidelberg
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Cisplatin	Baxter, Unterschleißheim
DEPC-H ₂ O	Invitrogen, Karlsruhe
Desoxyribonukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 100 mM)	Promega, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
DNA-Standard (100 bp-Leiter)	Invitrogen, Karlsruhe
Dulbecco`s modifiziertes Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen, Karlsruhe
Dulbecco`s PBS 1x	PAA, Pasching
Essigsäure	Merk, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Ethanol (96%)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	Roth, Karlsruhe
Fötales Kälberserum	Sigma, Steinheim
Glucose	Serva, Heidelberg
Interferin	Polyplus Transfection, Illkirch

Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
LDS Sample-Buffer (4x)	Invitrogen, Karlsruhe
Magermilchpulver Sukovin	EDEKA, Hamburg
β -Mercaptoethanol (14,3 M)	VWR, Darmstadt
MES-Puffer (20x)	Invitrogen, Karlsruhe
Methanol (100% p.a.)	VWR, Darmstadt
Natriumacetat	Serva, Heidelberg
Natriumchlorid	Serva, Heidelberg
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumphosphat	Serva, Heidelberg
Natriumpyruvat	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Proteinase-Inhibitor-„Cocktail“	Sigma, Steinheim
Random Primer	Invitrogen, Karlsruhe
Sample Reducing Agent (10x)	Invitrogen, Karlsruhe
See Blue® Plus 2 Prestained Standard (1x)	Invitrogen, Karlsruhe
Sulforhodamin B	Sigma, Steinheim
Taxol (Paclitaxel)	Baxter, Unterschleißheim
Transferpuffer (20x)	Invitrogen, Karlsruhe
Trichloressigsäure	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Tris	Roth, Karlsruhe
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
25% Trypsin-EDTA 1x	Invitrogen, Karlsruhe
Tween-20	Serva, Heidelberg
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosid (X-Gal)	Sigma, Deisenhofen
WST-1 Reagenz	Roche, Penzberg
Xylencyanol	Serva, Heidelberg
Zitronensäure	Serva, Heidelberg

Zur Herstellung aller Puffer wurde bidestilliertes Wasser verwendet.

2.9 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Biocenter 2001 (Brutschrank)	Biometra, Göttingen
BioDocAnalyse (Gelauswertung)	Biometra, Göttingen
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
CL-X Posure Film	Bioscience, New York, USA
Einweg-Plastikartikel für Zellkultur (Petrischalen, Gewebekulturflaschen, Pipetten, Pipettenspitzen, Zentrifugationsröhrchen)	Greiner, Frickenhausen
Elektrophorese-Gerät	BioPlex, Freiburg
Magnetrührer	IKA-Labortechnik, Staufen
Mettler AM 100 (Analysewaage)	Mettler, Giessen
Mikropipetten	Eppendorf, Hamburg
Millipore Immobilon-P (0,45 µm Porengröße)	Roth, Karlsruhe
Mini Trans-Blot® Cell	Biorad, München
NuPage 4-12% Bis-Tris-Gele	Invitrogen, Karlsruhe
Plattenreader Genios	Tecan, Crailsheim
Peltier Thermal-Cycler	Bio Rad, München
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Rotor-Gene RG-3000	Qiagen, Hilden
Röntgenfilmentwickler Hyperprocessor	Amersham, Freiburg
Trio-Thermoblock TB1	Biometra, Göttingen
Vakuumzentrifuge (Concentrator 5301)	Eppendorf, Hamburg
Zellzahlzählgerät Casy	Schäfer System, Reutlingen
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg

2.10 Puffer und Lösungen

Zellkulturmedium:	DMEM	500 mL
	FKS	50 mL
Zellkulturmedium Zelllinie HOSE:	Medium 199 (Sigma) und MCDB 105 (Sigma) im Verhältnis 1:1 mischen 15 % FKS zusetzen	
<i>Giordano-Lysepuffer:</i>	Tris (1 M, pH 7,4)	5 mL
	NaCl (5 M)	5 mL
	EDTA (0,5 M)	1 mL
	TritonX-100 10%	1 mL
	→ Aqua bidest. auf 100 mL auffüllen	

<i>TBS:</i>	Tris-HCl	10 mM pH 8,0
	NaCl	150 mM
<i>TBS-T:</i>	0,02 % Tween 20 in 1x TBS	
<i>10x PBS (für Western Blot):</i>	NaCl	80,0 g
	KCl	2,0 g
	Na ₂ HPO ₄	11,6 g
	KH ₂ PO ₄	2,0 g
	→ Aqua bidest. auf 1 L auffüllen und pH auf 7,4 einstellen	
<i>MES-Laufpuffer:</i>	50 mL MES SDS Running Buffer (20x; Invitrogen)	
	950 mL Aqua bidest.	
<i>Transferpuffer:</i>	50 mL Transferpuffer (20x; Invitrogen)	
	100 mL Methanol	
	850 mL Aqua bidest.	
	bei 4°C lagern	
<i>LB-Medium:</i>	20 g in 1 L Aqua bidest. lösen	
	→ autoklavieren	
<i>Nähragar für Bakterienkulturen:</i>	32 g in 1 L Aqua bidest. lösen	
	→ autoklavieren	
	Zugabe von Ampicillin (50 µg/mL)	
	Zusatz von X-Gal (40 µg/mL)	
<i>Auftragspuffer: (Gelelektrophorese)</i>	Formamid	10,0 mL
	Xylencyanol	10,0 mg
	Bromphenolblau	10,0 mg
	EDTA (0,5 M, pH 8)	0,2 mL
<i>5x TBE-Puffer:</i>	Tris-HCl	54,0 g
	Borsäure	27,5 g
	EDTA (0,5 M, pH 8)	20,0 mL
	→ Aqua bidest. auf 1 L auffüllen	
<i>SRB-Lösung:</i>	0,4 % Sulforhodamin-B	0,46 g
	1 %ige Essigsäure	100 mL
<i>Ponceau-Lösung:</i>	Ponceau-S	0,2 %
	Trichloressigsäure	3,0 %
	Sulfosalicylsäure	3,0 %

3. Methoden

3.1 Zellkultur

Die Anzucht aller Ovarialkarzinom-Zelllinien erfolgte in Dulbecco's modifiziertem Eagle Medium ohne Antibiotikum bei 37 °C, 5 % (v/v) CO₂ und maximaler Luftfeuchtigkeit in 25 mL Zellkulturflaschen. Die Zelllinie HOSE wurde in einem 1:1 Gemisch von Medium 199 und MCDB 105 angezogen. Das Wachstum aller Zelllinien erfolgte als adhärenente Monolayer-Kultur. Für Transfektionsversuche wurden die Zellen in Flasketten, 6- oder 96-Lochplatten kultiviert. Vor dem Einstreuen wurde die Zelldichte mit Hilfe des Casy Zellzählgerätes ermittelt.

Die Passagierung konfluenter Zellen erfolgte im Verhältnis 1:3. Dafür wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 3 mL PBS (Kap. 2.8) gewaschen. Nach Inkubation mit 1 mL Trypsin (Kap. 2.8) für 5 min bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 4 mL DMEM abgestoppt, und die Zellen 5 min bei 1000 U/min abzentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in 9 mL Zellkulturmedium resuspendiert und 3 mL in eine neue Zellkulturflasche überführt.

Zur Kryokonservierung wurden die nach Zentrifugation erhaltenen Zellpellets in 1,8 mL Gefriermedium aufgenommen (DMEM mit 20 % DMSO) und in ein 2 mL Gefrierrohrchen überführt. Die Lagerung erfolgte für 24 h bei -20 °C, 24 h bei -80 °C und anschließend bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff.

Zum Auftauen der Zellen wurde der Inhalt eines Gefrierrohrchens rasch bei 37 °C aufgetaut und in ein Greinerröhrchen mit 4 mL DMEM überführt. Das nach Zentrifugation erhaltene Zellpellet wurde in Medium aufgenommen und erneut zentrifugiert, um das für die Zellen toxische DMSO herauszuverdünnen. Das Pellet wurde in 3 mL DMEM aufgenommen und in eine Zellkulturflasche überführt. Jede Woche wurden alle, sich in Kultur befindlichen, Zellkulturen unter Verwendung des Venor GeM Mycoplasma Detection Kits auf Mykoplasmen getestet. Infizierte Zellkulturen wurden sofort entsorgt.

3.2 Präparation von Nukleinsäuren

3.2.1 DNA-Isolation aus Zellkulturen

Die DNA-Isolation aus Zellkulturen erfolgte durch ein modifiziertes Protokoll nach Wright und Manos (Wright DK und Manos MM, 1990).

1. Zellen mit PBS waschen, abtrypsinieren, abstoppen und Inhalt von drei Zellkulturflaschen vereinigen
2. nach Zentrifugation erhaltenes Zellpellet nochmal mit PBS waschen, zentrifugieren
3. Pellet in 360 μ L Verdaupuffer nach Wright/Manos resuspendieren
4. 40 μ L Proteinase K (2 mg/mL) zusetzen, Verdau über Nacht bei 37 °C
5. in einem phenolbeständigen Zentrifugenröhrchen 1 mL Aqua bidest., 4 mL Phenol und den Reaktionsansatz gut mischen und 10 min bei 10.000 U/min zentrifugieren
6. Oberphase vorsichtig abnehmen, in ein neues Zentrifugenröhrchen überführen, den Phenolschritt eventuell wiederholen
7. zur Oberphase 2 mL Phenol und 2 mL Chloroform-Isoamylalkohol (49:1) geben, gut mischen und 10 min bei 10.000 U/min zentrifugieren
8. Oberphase vorsichtig abnehmen, den Schritt eventuell wiederholen
9. zur Oberphase 4 mL Chloroform-Isoamylalkohol geben, gut mischen und 10 min bei 10.000 U/min zentrifugieren
10. Oberphase vorsichtig abnehmen, den Schritt eventuell wiederholen
11. zur Oberphase 50 μ L 6 M NaCl und ein Volumen Isopropanol geben, auf 1,5 mL Reaktionsgefäße aufteilen und über Nacht bei -20 °C fällen
12. 15 min bei 15.000 U/min bei 4 °C zentrifugieren, Überstand abgießen
13. Pellet mit 1 mL 70 % Ethanol waschen, Pellet schwimmt
14. 10 min bei 7.500 U/min bei 4 °C zentrifugieren, Waschschrift wiederholen
15. Pellet ca. 5 min in Vakuumzentrifuge trocknen
16. Pellet in 50 μ L Aqua bidest. lösen

<i>Verdaupuffer (Wright/Manos):</i>	Tris pH 8,5	50 mM
	EDTA	1 mM
	Tween-20	0,5 %

3.2.2. DNA-Isolation aus Blut

1. 10 mL EDTA-Blut in ein 50 mL Röhrchen überführen
2. 40 mL 4°C kalten Triton-Lyse-Puffer zugeben, schwenken
3. 15 min ins Eisbad (4°C), ab und zu schwenken
4. 10 min bei 2300 U/min und 4 °C ohne Bremse zentrifugieren
5. Überstand vorsichtig abgießen, (Pellet ist: locker, rot, 4-5 mm hoch)
6. 2-3 mal mit 25 mL 0,95 % NaCl waschen, zwischendurch zentrifugieren
Nach diesen Waschschritten ist es möglich, das Blut-NaCl-Gemisch bei -20°C einzufrieren.
7. Zugabe von : 3 mL Kern-Lysepuffer
 25 µL Proteinase K Puffer-A
 115 µL 20 % SDS,

kräftig schütteln, 1 Stunde zu 50 °C, oder 1 Tag bei Raumtemperatur bis 37 ° stehen lassen.

Nach Abschluss der Lyse muss die Lösung klar sein.
8. Zentrifuge auf 4 °C vorkühlen.
9. 1 mL 6 M NaCl zugeben und 15 Sekunden kräftig schütteln
10. 15 min bei 4500U/min und 4 °C zentrifugieren, Überstand in ein neues Röhrchen, nochmals zentrifugieren, Überstand in ein neues Röhrchen (nur die klare Lösung, keine Reste vom Pellet mitnehmen).
11. 2 Volumen 96 %iges eiskaltes Ethanol zugeben.
Das Röhrchen langsam drehen/schwenken bis eine große weiße Flocke entsteht.
12. 1 mL eiskalten 70 %igen Ethanol in Eppi vorlegen, in eine blaue Pipettenspitze etwas 70 %igen Ethanol aufsaugen, dann die Flocke ansaugen und in das Eppi mit dem Ethanol überführen.
13. 5 min bei 12.000 U/min und 4 °C zentrifugieren.
14. ca. 15 min vakuumtrocknen
15. Pellet in 100-1000 µL Aqua bidest., oder TE-Puffer gut lösen lassen

<i>Triton-Lysepuffer</i> (4°C gekühlt)	500 mL
0,32 M Saccharose	54,75 g
5 mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,505 g
10 mM Tris	0,605 g
pH auf 7,5 einstellen, Lösung autoklavieren	
Zugabe von 5 mL Triton-X100.	

Physiologische NaCl-Lösung (0,95 % NaCl)

<i>Kern-Lysepuffer</i>		100 mL
10 mM	Tris	121 mg
400 mM	NaCl	2,338 g

in ca. 80 mL Aqua bidest. lösen, dann 2 mL 0,5 M EDTA pH 8,0 dazugeben, pH auf 8,2 einstellen und die Lösung auf 100 mL mit Aqua bidest. auffüllen.

<i>Proteinase-K Puffer-A</i>		5 mL
0,1 M	NaCl	290 mg
0,05 M	Tris-HCl	30 mg
0,005 M	EDTA	50 µL EDTA pH 8 (oder 7,5 mg)

pH 7,5 einstellen, auf 5 mL mit Aqua bidest. auffüllen.

1 mL des Puffers mit 20 mg Proteinase-K versetzen.

Einfrieren der Lösung bei - 20 °C ist möglich.

SDS 20 % (Dodecylsulfate Na-Salt)

<i>1 M Tris-HCl Stammlösung pH 7,6</i>	100 mL
12,1 g Tris lösen, pH 7,6 mit hochprozentiger HCl einstellen auf 100 mL auffüllen, Lösung autoklavieren.	

<i>0,5 M EDTA Stammlösung</i>	100 mL
6 g NaOH-Plättchen in etwas Aqua bidest. lösen	
29,3 g EDTA dazugeben, pH 8,0 einstellen, auf 100 mL auffüllen, Lösung autoklavieren.	

<i>TE-DNA-Lösungspuffer</i>	100 mL
10 mM Tris-HCl Stammlsg. pH 7,6	1 mL
0,1 mM EDTA-Stammlsg. pH 8,0	20 µL
auf 100 mL mit autoklavierten Aqua bidest. auffüllen.	

3.2.3 Isolation von Plasmid-DNA

Einzelkolonien einer Agarplatte wurde unter Zuhilfenahme autoklavierter Zahnstocher gepickt und über Nacht in 10 mL LB-Medium mit Antibiotikazusatz (Ampicillin 50 µg/mL) im Schüttler (200 U/min) inkubiert. Die erhaltene Kultur wurde 10 min bei 4.000 U/min abzentrifugiert. Aus dem erhaltenen Zellpellet erfolgte die Plasmidisolierung unter Verwendung des Miniprep Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben. Zur Elution der Plasmid-DNA wurden 50 µL Elutionspuffer verwendet.

3.2.4 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte photometrisch. Dazu wurden die Proben geeignet verdünnt (üblicherweise 1:50) und die Extinktion bei 260 und 280 nm gemessen. Der Konzentrationsbestimmung wurde folgender Richtwert zu Grunde gelegt: 1 OD_{260nm} entspricht 50 µg DNA/mL.

Der Quotient aus OD_{260nm}/OD_{280nm} erlaubt eine Aussage über die Qualität der DNA-Präparation bezüglich eventueller Phenol- und/oder Proteinverunreinigungen. Bei hoher Reinheit liegt der Quotient zwischen 1,8 und 2.

3.2.5 RNA-Isolation aus Zellkultur

Die Isolation von Gesamt-RNA erfolgte unter Verwendung des RNeasy RNA-Isolationskits (Qiagen), nach Angaben des Herstellers. Das nach Abtrypsinieren und Zentrifugation erhaltene Zellpellet wurde in 350 oder 600 μ L β -Mercaptoethanol-haltigen Lysepuffer (RLT, Qiagen) aufgenommen. Anschließend wurden die Proben unter Verwendung von Qias shredder-Säulen homogenisiert (Qiagen). Die Isolation der RNA erfolgte durch Transfer des Homogenisats auf RNeasy-Säulen und Zentrifugation für 1 min bei 10.000 U/min. Nach verschiedenen Waschschrritten erfolgte die Elution der RNA mittels 30-50 μ L RNase-freiem Wasser. Kurzzeitig wurde die RNA bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, langfristig jedoch bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.2.6 RNA-Isolation aus Gefriermaterial / microRNA-Isolation aus Zellkultur

Die Isolation von Gesamt-RNA aus Gefriermaterial und von microRNAs aus Zellkulturen erfolgte mittels Trizol-Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe) gemäß des Protokolls des Herstellers. Dazu wurden ca. zehn 10 μ m dicke Schnitte am Kryotom angefertigt und in 1 mL Trizol-Reagenz aufgenommen. Zusätzlich wurde von jedem Präparat ein HE-Schnitt angefertigt um von einem Pathologen den Tumorgehalt des Materials überprüfen zu lassen. Nach 3-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 200 μ L Chloroform zugefügt und gemischt. Der Ansatz wurde für 10 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit 12000 U/min zentrifugiert und anschließend die wässrige Phase in ein neues Tube überführt. Dann wurden 500 μ L Isopropanol zugesetzt und ausgiebig gevortext. Die Inkubation des Ansatzes erfolgte über Nacht bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Am nächsten Tag wurde der Ansatz 10 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit 12 000 U/min zentrifugiert. Der Überstand konnte verworfen und das RNA-Pellet mit 1 mL eiskaltem 96%igem Ethanol gewaschen werden. Nach erneuter Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet noch einmal mit 70%igem Ethanol gewaschen und nach Zentrifugation an der Luft getrocknet. Das RNA-Pellet wurde dann in 40 μ L RNase-freiem Wasser resuspendiert und die Lösung nach der Messung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.2.7 Gesamt-RNA und microRNA-Isolation aus Paraffinmaterial

Für die RNA-Isolation aus Paraffinmaterial wurden 2-8 fünf μm dicke Schnitte am Mikrotom angefertigt. Der erste Schnitt wurde verworfen. Das Material wurde in 1 mL Xylol aufgenommen und die Gesamt-RNA nach Angaben des Herstellers mit dem miRNeasy FFPE Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Die Elution der RNA erfolgte mit 20 μL RNase-freiem Wasser.

3.2.8 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte photometrisch. Dazu wurden die Proben geeignet verdünnt (üblicherweise 1:25) und die Extinktion bei 260 und 280 nm gemessen. Der Konzentrationsbestimmung wurde folgender Richtwert zu Grunde gelegt: 1 $\text{OD}_{260\text{nm}}$ entspricht 40 μg RNA/mL.

Die Reinheit der Präparation wurde anhand des Quotienten aus $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$ beurteilt. Bei hoher Reinheit sollte dieser zwischen 1,8 und 2 liegen.

3.3 Reverse Transkription

3.3.1 cDNA-Synthese zur mRNA-Expressionsanalyse

Die cDNA-Synthese der mRNA erfolgte mittels des „SuperScript Reverse Transkriptase“ Kits (Invitrogen, Karlsruhe). Es wurde je 2 μg RNA zur Synthese eingesetzt. Der pre-Annealing-Mix setzt sich wie folgt zusammen:

x μL RNA (2 μg)
1 μL random Primer (150 ng/ μL)
ad 15 μL mit Aqua bidest.

Der Mix wurde bei 70°C für 10 min inkubiert. Anschließend wurde zugefügt:

2 μL 10x Puffer
1 μL DTT
1 μL dNTPs (100 mM)
1 μL SuperScript Reverse Transkriptase
5 μL Enzym-Ansatz

Für die Synthese wurde das folgende Programm gewählt:

1. 20 °C 10 min
2. 42 °C 80 min
3. 85 °C 5 min

Nach der Synthese wurde die cDNA bei -20 °C gelagert.

3.3.2. cDNA-Synthese zur microRNA-Expressionsanalyse

Zur Synthese von cDNA aus microRNAs wurden stem-loop-Primer verwendet, die nur eine spezifische microRNA amplifizierten. Dafür wurde eine 2 ng/ μ L-Verdünnung der RNA hergestellt und insgesamt 10 ng für die Reaktion eingesetzt. Der Ansatz bestand aus Komponenten des TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems Darmstadt):

0,17 μ L dNTPs (100 mM)
1,10 μ L MLV-Reverse Transkriptase
1,65 μ L 10x Puffer
0,21 μ L RNase-Inhibitor
4,57 μ L Nuclease-freies H₂O
7,00 μ L Gesamt-Ansatz

Dem Ansatz wurden 3 μ L des spezifischen Primers und 5 μ L der RNA-Verdünnung (2 ng/ μ L) zugefügt.

Für die cDNA-Synthese wurde das folgende Programm gewählt:

1. 16 °C 30 min
2. 42 °C 30 min
3. 85 °C 5 min
4. 4 °C

Die synthetisierte miR-cDNA wurde bei -20 °C gelagert und mittels quantitativer real-time-PCR vermessen.

3.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Alle PCR-Reaktionen wurden mit den Komponenten der Hotfire-Pol der Firma Solis Biodyne (Estland) durchgeführt. Ein PCR-Ansatz bestand aus folgenden Komponenten:

17,25 μ L H₂O
2,5 μ L 10x Puffer B
2,5 μ L MgCl₂ (25 mM)
2,0 μ L dNTPs (100 mM)
je 0,25 μ L Primer (20 μ M)
0,25 μ L HotStart-Taq-Polymerase
25,0 μ L Reaktionsansatz

Dem Reaktionsansatz wurden je nach PCR 1 μ L cDNA oder 20-200 ng genomische DNA hinzugefügt. Die PCR-Reaktion erfolgte im Peltier Thermal-Cycler PT200 nach folgendem

Programm:	1. 95 °C 15 min
	2. 95 °C 20 s
	3. 58 °C 20 s
	4. 72 °C 30 s
	5. Schritt 2-4 35-40x wiederholen
	5. 72 °C 10 min
	6. 4 °C

Je nach Template variierte die Anzahl der Syntheszyklen zwischen 35 und 40. Die ideale Annealing-Temperatur wurde mittels Gradienten-PCR ausgetestet und lag zwischen 55 °C und 60 °C. Die Syntheszeit wurde in Abhängigkeit von der zu erwartenden Produktgröße variiert.

3.5 quantitative real-time PCR

Für die quantitative real-time-PCR wurden je nach Fragestellung zwei verschiedene Anwendungen gewählt. Die Quantifizierung der microRNA-191 sowie der snoU18-Expression wurde mittels TaqMan-Primer durchgeführt (Applied Biosystems, Darmstadt). Hierbei wurde folgender Reaktionsansatz mit den Komponenten des TaqMan Universal Master Mixes, No AmpErase UNG verwendet:

7,7 µL H₂O
10,0 µL Taqman 2x Mix
1,0 µL TaqMan-Primer
18,7 µL Reaktionsansatz

Mit 1,3 µL 1:15 verdünnter cDNA aus der RT-Reaktion versetzen (3.3.2). Der Ansatz wurde mittels folgenden Programms im Real-time-PCR-Gerät Rotorgene 3000 (Qiagen, Hilden) vermessen:

1. 95 °C 15 min
2. 95 °C 30 s
3. 60 °C 60 s
4. Schritt 2-4 40x wiederholen

Zur Analyse der mRNA-Expression von MDMX, MDMX-S und des Referenzgens HPRT wurde folgender real-time-PCR-Ansatz mit den Komponenten des Maxima-Kits (Fermentas, St. Leon-Rot) erstellt:

7,5 µL Quantitect
5,5 µL H₂O
1,0 µL Primer (vorwärts und rückwärts)
1,0 µL cDNA
15 µL Reaktionsansatz

Der Ansatz wurde mittels folgenden Programms im Real-time-PCR-Gerät Rotorgene 3000 (Qiagen, Hilden) vermessen:

1. 95 °C 15 min
2. 95 °C 20 s
3. 60 °C 30 s
4. 72 °C 30 s
5. Schritt 2-4 40x wiederholen
6. Schmelzkurve

Die Auswertung erfolgte unter Verwendung der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode nach Livak und Schmittgen (Livak und Schmittgen, 2001). Es handelt sich dabei um eine relative Quantifizierung mittels des Vergleichs der CT-Werte (threshold cycle; Anzahl der Zyklen, bei der die Produktmenge einen definierten Schwellenwert erreicht) des zu untersuchenden Gens mit den CT-Werten eines Referenzgens. Dabei wird eine 100 %ige PCR-Effizienz vorausgesetzt. Die $\Delta\Delta\text{CT}$ -Werte errechneten sich mittels folgender Formel:

$$\Delta\Delta\text{CT} = 2^{-(\text{CT}(\text{Gen}) - \text{CT}(\text{Referenz})) - (\text{CT}(\text{Kalibrator}) - \text{CT}(\text{Referenz}))}$$

3.6 Genotypisierung mittels real-time PCR

Die Taqman „Genotyping-Assays“ wurden für den jeweiligen zu untersuchenden SNP („single nucleotide polymorphism“) bei der Firma Applied Biosystems bestellt. Der Taqman-Assay enthält für das Wildtyp-Allel eine FAM-markierte Sonde sowie für das mutierte Allel eine VIC-markierte Sonde. Je nachdem welches Allel in der Probe vorhanden ist, erhält man bei homozygoten Proben nur ein Signal bzw. bei heterozygoten Proben das Signal beider Farbstoffe. Für die PCR wurde folgender Reaktionsansatz aus den Komponenten des Hotfire-Pol-Kits (Solis Biodyne, Estland) verwendet:

- 12,6 μL H₂O
- 2,0 μL 10x Puffer B
- 2,0 μL MgCl₂ (25 mM)
- 1,6 μL dNTPs (100 mM)
- 0,5 μL TaqMan-Primer
- 0,3 μL Hotfire-Pol
- 1,0 μL DNA (20 ng/ μL)
- 20,0 μL Reaktionsansatz

Der Ansatz wurde mittels folgenden Programms im Real-time-PCR-Gerät Rotorgene 3000

- (Qiagen, Hilden) vermessen:
1. 95 °C 15 min
 2. 95 °C 15 s
 3. 60 °C 20 s
 4. 72 °C 20 s
 5. Schritt 2-4 40x wiederholen

Jeder Lauf enthielt zusätzlich 3 bekannte Proben der möglichen Allelverteilungen, welche vorher durch Sequenzierung ermittelt wurden. Die Auswertung erfolgte mit der Allelic Discrimination-Software des Rotorgene 3000.

3.7 Sequenzierreaktion

Die Sequenzierung von DNA erfolgte unter Nutzung des BigDye™ Terminator Sequencing Kits 1.1 oder 3.1 der Firma ABI Prism (Applied Biosystems, USA). Ein 20 µL Sequenzieransatz enthielt 2-4 µL BigDye™ Sequencing Mix, 4 µL (3,2 pmol/µL) eines spezifischen Primers, 1-5 µL gereinigtes PCR-Produkt oder 300 ng Plasmid-DNA. Das fehlende Volumen wurde mit 5x Sequenzierpuffer (ABI Prism) aufgefüllt. Die Sequenzierreaktion lief in 0,5 mL Reaktionsgefäßen im Trioblock™-Thermocycler mit Heizdeckel nach folgendem Programm ab:

1. 96 °C 1 min
2. 96 °C 10 sek
3. 50 °C 5 sek
4. 60 °C 4 min
5. Schritt 2-4 25x wiederholen
6. 4 °C

Anschließend erfolgte die Reinigung des Sequenzierproduktes, dabei sollten die Reaktionsgefäße möglichst vor direkter Lichteinstrahlung geschützt werden. Jedem Ansatz wurden 2 µL 125 mM EDTA, 2 µL 3 M Natriumacetat und 50 µL 96 %iger Ethanol zugegeben, gevortext und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die gefällte DNA wurde anschließend für 30 min bei 4 °C und 6000 U/min abzentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes und Waschen des Pellets mit 70 µL 70 %igem Ethanol wurde 10 min bei 4 °C und 6000 U/min zentrifugiert. Nach vorsichtigem Abpipettieren des Ethanols wurde das Pellet ca. 10 min bei 80 °C im Thermocycler getrocknet.

Die Analyse der Proben erfolgte am Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durch Frau Dr. Darmer und Herrn Dr. Christov unter Nutzung eines ABI Prism DNA-Sequencers.

3.8 DNA-Untersuchungen

3.8.1 Agarose-Gelelektrophorese

Zum Nachweis der erfolgreichen Amplifikation der DNA nach einer PCR-Reaktion wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. In Abhängigkeit von der zu erwartenden Fragmentlänge wurden 1-2 %ige Agarosegele (jeweils in 100 mL 0,5x TBE-Puffer versetzt mit 5 µL Ethidiumbromid [10 mg/mL]) angefertigt. Die Elektrophorese erfolgte in Gelkammern der Firma Bioplex mit 0,5x TBE-Laufpuffer. Es wurden jeweils 5 µL PCR-Produkt mit 1,5 µL DNA-Auftragspuffer (siehe Kap. 2.9) gemischt und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei ca. 90 Volt. Nach dem Gellauf wurden die Banden mittels UV-Licht sichtbar gemacht und mit dem Geldokumentationssystem BioDocAnalyse (Biometra) ausgewertet. Zur Größenbestimmung der PCR-Produkte dienten DNA-Längenstandards.

3.8.2 Aufreinigung von DNA aus Agarose-Gelen

Für die Aufreinigung von DNA wurden zunächst ca. 10-20 µL des PCR-Produktes im Agarose-Gel aufgetrennt (3.8.1). Auf dem UV-Tisch wurden die Banden von Interesse mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Es wurde darauf geachtet, dass die Gele nur eine möglichst geringe Zeit dem UV-Licht ausgesetzt sind, um keine DNA-Veränderungen zu induzieren. Anschließend erfolgte die Reinigung unter Verwendung des QiaQuick-Gelextraktionskits (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers, mit der Ausnahme, dass zum Lösen der Agarose QX1-Puffer, statt QG-Puffer aus dem Qiagen-Gelextraktionskit verwendet wurde.

3.8.3 TBE-Gelelektrophorese (SSCP-Analyse)

Zur Untersuchung von Mutationen innerhalb des p53-Gens wurden die erhaltenen PCR-Produkte nach Denaturierung einer hochauflösenden TBE-Gelelektrophorese unterzogen. Die Banden wurden nach dem Gellauf mittels Silberfärbung sichtbar gemacht.

3.8.3.1 Probenvorbereitung und Gellauf

Zwischen 10 und 20 µL PCR-Produkt wurden über Nacht mit 100 µL Isopropanol bei -20 °C gefällt. Die Beurteilung der Menge des zu fällenden PCR-Produktes erfolgte anhand der Intensität der Banden im Agarose-Gel. Die Proben wurden nun 15 min bei 4 °C und 12.000 U/min zentrifugiert und anschließend wurde das Isopropanol abgossen und die Proben

ca. 10 min bei 80 °C getrocknet. Das erhaltene Pellet wurde mit 8 µL Auftragspuffer versetzt und erneut 10 min bei 80 °C erhitzt. Nach weiteren 10 min bei -20 °C konnten die Proben auf ein 8 %iges TBE-Gel (Invitrogen) aufgetragen werden. Zusätzlich wurden 3 µL DNA-Längenstandard mit 2 µL Auftragspuffer gemischt und auf das Gel aufgetragen. Als Laufpuffer diente 1x TBE-Puffer. Der Gellauf erfolgte für ca. 1 h bei 175 V im Kühlschrank, bis die untere Farbstoffbande (Bromphenolblau) aus dem Gel gelaufen war.

Auftragspuffer:	Formamid	10 mL
	Xylencyanol	10 mg
	Bromphenolblau	10 mg
	EDTA (0,5 M pH 8,0)	200 µL

3.8.3.2 Silberfärbung

Nach Beendigung des Gellaufes wurde das Gel unter Verwendung eines Gelmessers aus der Gellaufkassette entfernt und die Silberfärbung in kleinen Färbeschalen durchgeführt.

1. Gel kurz mit Aqua bidest. spülen
2. 5 min mit 10 %igem Ethanol spülen, 2x mit Aqua bidest. spülen
3. 3 min mit 1 %iger Salpetersäure spülen, 2x mit Aqua bidest. spülen
4. 20 min mit frischer 0,1 %iger Silbernitratlösung abgedeckt inkubieren, 2x mit Aqua bidest. spülen
5. zum Entwickeln mit Natriumcarbonat-Formalin-Lösung spülen, Lösung mehrmals wechseln (59,4 g Natriumcarbonat, 2 mL 37 %iges Formalin auf 2 L Aqua bidest.)
6. zum Abstoppen 1 min mit 6 %iger Essigsäure spülen
7. 2 min Aqua bidest

Anschließend wurde das Gel auf Filterpapier übertragen und für ca. 1 h bei 70 °C unter Vakuum getrocknet.

3.9 Klonierung von DNA-Fragmenten

3.9.1 Ligation

Die direkte Klonierung von PCR-Produkten zur Identifizierung von Spleißvarianten erfolgte unter Verwendung des TOPO-TA-Cloning Kits (Invitrogen). Der für die Klonierung genutzte

pCR[®]2.1-TOPO-Vektor enthält überhängende T-Enden, die eine effiziente Ligation mit dem PCR-Produkt erlauben. Für jeden Klonierungsansatz wurden 4 µL gereinigtes PCR-Produkt (3.8.2), mit 1 µL Salzlösung und 1 µL pCR[®]2.1-TOPO-Vektor vorsichtig vermischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Luciferase-Vektoren psiCheck2 (Promega) und die zugehörigen DNA-Fragmente wurden nach folgendem Protokoll verdaut:

8,5 µL H₂O
4,0 µL Vektor oder cDNA
1,5 µL Puffer R (10x)
1,0 µL Xho I
15,0 µL Ansatz

Programm: 37 °C für 30 min

Nach dem Verdau wurden die Fragment nach dem in Abschnitt 3.8.2. beschriebenen Protokoll aufgereinigt. Im Anschluss daran wurde sofort die Ligationsreaktion angesetzt.

Die Ligation erfolgt in folgendem Ansatz:

7,0 µL H₂O
4,0 µL Vektor-Lösung (verdaut)
2,0 µL DNA-Fragment
2,0 µL Ligase-Puffer (10x)
3,0 µL T4-Ligase
2,0 µL PEG
20 µL Reaktionsansatz

Der Ansatz wurde über Nacht bei 16 °C inkubiert. Vor Gebrauch wurde bei 85 °C die Ligase inaktiviert.

3.9.2 Transformation von *E. coli*-Zellen

Für jede Transformation wurde ein 100 µL Aliquot chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen (TOP10, Invitrogen) auf Eis aufgetaut. Die Bakterien wurden mit 2 µL des Ligationsansatzes vorsichtig vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Zur DNA-Aufnahme wurden die Zellen einem 30 s andauerndem Hitzeschock von 42 °C ausgesetzt und anschließend sofort auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 250 µL S.O.C-Medium (Kitkomponente der TOP10-Zellen) wurde der Ansatz für 1 h bei 37 °C unter leichtem horizontalem Schütteln (200 U/min) inkubiert. 25 und 100 µL des Transformationsansatzes wurden auf vorgewärmten Selektionsagarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Die Selektion positiver Transformanden erfolgte durch Zugabe von 50 µg/mL Ampicillin in den Selektionsagar und zusätzlich wurde, je nach verwendetem Plasmid, eine Blau/Weiß-Selektion unter Verwendung von X-Gal (40 µg/mL) durchgeführt.

3.9.3 Analyse positiver Transformanden

Zur Analyse positiver Transformanden wurden weiße oder leicht blaue Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und in einen bereits vorbereiteten PCR-Ansatz überführt. Nach Amplifikation der Plasmid-DNA und anschließender Agarose-Gelelektrophorese (3.4.) wurden Kolonien, die das gewünschte Insert enthielten, zur Anzucht von Übernachtskulturen genutzt. Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte wie in 3.2.3 beschrieben. Die erhaltenen Plasmide konnten nun durch PCR oder Sequenzierung analysiert werden.

3.10 Western-Blot Analysen

3.10.1 Proteinisolation durch Lyse der Zellen nach Giordano

Zur Herstellung frischer Giordano-Lysate wurden die Zellen in 6-Lochplatten oder 10 cm Petrischalen 2x mit eiskaltem PBS gewaschen. Es erfolgte die sofortige Zugabe von 30 bis 200 µL Giordano-Lysepuffers (siehe 2.10; versetzt mit Protease-Inhibitor Cocktail 1:100). Die Zellen lysierten ca. 15 min auf Eis. Anschließend wurden die Zellen unter Zuhilfenahme eines Zellschabers von den Platten gelöst und die Lysate in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen lysierten nun weitere 15 min auf Eis. Anschließend wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation für 15 min bei 15.000 U/min und 4 °C entfernt. Für die Langzeitlagerung der Proteinlysate wurde dem Giordano-Puffer 10 % Glycerol zugesetzt.

3.10.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der erhaltenen Lysate erfolgte nach der Bradford-Methode. Zunächst wurden 800 µL Aqua bidest. mit 200 µL Protein-Assay-Reagenz der Firma Biorad vermischt. Diesem Ansatz wurden nun 5 µL der Proteinlösung zugesetzt. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Messung der Absorption bei 595 nm. Die Proteinkonzentration wurde aus einer Eichkurve ermittelt.

3.10.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte in 4-12 %igen Bis-Tris-Gelen (Invitrogen). Als Laufpuffer wurde 1x MES-Puffer verwendet (hergestellt aus 20x Stammlösung, Invitrogen), wobei der hinteren Gelkammer der XCell II Minicell (Invitrogen) zusätzlich 500 µL Nupage® Antioxidanz (Invitrogen) zugesetzt wurde. 20 bis 40 µg der Proteinlysate wurden mit 5 µL 4x LDS-Probenpuffer (Invitrogen) und 2 µL Proben-reduzierendem Agenz (10x, Invitrogen) versetzt und mit Aqua bidest. auf ein Volumen von 20 µL aufgefüllt. Die Proben wurden für 10 min bei 95 °C denaturiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte ca. 1 h bei 200 V im Kühlschrank. Zur Größenbestimmung wurde ein Protein-Molekulargewichtsstandard (SeeBlue Plus2®, Invitrogen) mitgeführt.

3.10.4 Übertragung der Proteine auf eine PVDF-Membran

Nach dem Gellauf wurden die aufgetrennten Proteine durch die Tank-Blot Methode unter Nutzung einer Mini Trans-Blot® Cell (Biorad) auf eine PVDF-Membran (0,45 µm Porengröße, Millipore) übertragen. Zunächst wurden die Geltaschen vorsichtig abgetrennt. Die Membran wurde für 10 s in Methanol aktiviert und in 1x Transferpuffer vorinkubiert. Auf die schwarze Seite der Tank-Blot-Kassette wurde ein in Transferpuffer getränkter Schwamm, ein Stück Filterpapier, das Bis-Tris-Gel, die Nitrocellulose-Membran, gefolgt von Filterpapier und Schwamm luftblasenfrei geschichtet. Der Transfer erfolgte bei 300 mA für 3 h im Kühlschrank. Die Proteinbanden konnten durch reversible Ponceau-Färbung sichtbar gemacht werden.

3.10.5 Immundetektion

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde der Blot 1 h bei Raumtemperatur in 10 % Milchpulver in TBS-T oder PBS-T unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Membran kurz in TBS-T oder PBS-T gewaschen und schließlich der Primärantikörper in entsprechender Verdünnung (siehe Tabelle 2-4) in 10 % Milchpulver in TBS-T/PBS-T aufgebracht. Nach der Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln wurde der Blot 1x 5 min mit TBS/PBS, 2x 5 min mit TBS-T/PBS-T und wieder 1x 5 min mit TBS/PBS gewaschen. Der entsprechende mit Meerrettich-Peroxidase konjugierte Sekundärantikörper wurde ebenfalls in 10 % Milchpulver in TBS-T/PBS-T nach Herstellerangaben (Tabelle 2-4) verdünnt und der Blot

60 min unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Das Waschen der Membran erfolgte wie nach der Inkubation des Primärantikörpers. Für den Nachweis der Antikörperbindung wurde das ECL Western Blotting Detection System der Firma Amersham Pharmacia verwendet. Dafür wurden die Lösung A und B zu je gleichen Teilen (2 mL) miteinander vermischt und die Membran für 60 s damit benetzt und nun zwischen zwei Stückchen Druckerfolie gelegt. Die Detektion der Chemolumineszenz erfolgte in der Dunkelkammer durch Auflegen von CL-X Posure Film (Bioscience) Röntgenfilmen für 30 s bis 20 min. Die Entwicklung der Filme erfolgte im Hyperprocessor Röntgenfilmentwickler (Amersham). Die Auswertung der Intensität der Banden erfolgte densitometrisch, unter Nutzung der Software des BioDocAnalyze Imagemasters (Biometra).

3.11 Transfektionsversuche

3.11.1 Transfektion von Oligonukleotiden /Antagomirs

Für eine anschließende RNA- und Proteinisolierung wurden die Zellen 24 h vor der Transfektion in 6-cm-Schalen mit einer Dichte von 300.000 Zellen eingestreut. Die Transfektion erfolgt mit dem Transfektionsreagenz Interferin (Polyplus Transfection, New York, NY, USA). Die Endkonzentration der siRNA im Medium betrug 1 nM, der Antagomirs zwischen 2 und 50 nM. Zunächst wurden die siRNAs/Antagomirs mit dem Medium verdünnt und kurz gevortext. Für die Herstellung der Verdünnungen und die Ausbildung des Komplexes wurde serumfreies Medium verwendet. Nach Zugabe der entsprechenden Menge Interferin und vorsichtigem Mischen, wurde der Ansatz für mindestens 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Medium der Zellen durch frisches Medium mit Serum in der entsprechenden Menge ersetzt. Nach Ende der Inkubationszeit erfolgte die tropfenweise Zugabe des Komplexes auf die Zellen unter leichtem Schwenken der Kulturschale.

Für die Transfektion einer 6 cm-Zellkulturschale ($c_{\text{end}}=1$ nM) mit 4 mL Medium wurde folgender Ansatz gemischt:

22,0 μl Oligonukleotid-Verdünnung (1:100 einer 20 μM Stammlösung)
378,0 μl serumfreies Medium
30,0 μl Transfektionsreagenz
430,0 μl Gesamtansatz

3.11.2 Transfektion von Expressionsvektoren / Luciferasevektoren

Zur Transfektion von Vektoren wurde der Transfektionskit Effectene (Qiagen, Hilden) gewählt. Es wurde je 1 µg des Vektors transfiziert. Für die Transfektion eines Wells einer 96-well-Platte wurde folgender Ansatz gemischt:

2,0 µl DNA-Enhancer

2,5 µl Effectene-Transfektionsreagenz

ad 25,0 µl mit EC-Puffer

Der Ansatz wurde gevortext und 15 min inkubiert. Währenddessen wurde das Medium der Zellen erneuert und nach Inkubation des Transfektionsgemisches wurde dieses auf die Zellen gegeben. Die Inkubation der Zellen mit dem Transfektionsansatz dauerte in der Regel 24 h.

3.12 Luciferase-Assay

Mittels des Luciferase-Assay sollte die Regulation einer mRNA durch eine bestimmte microRNA nachgewiesen werden. Dazu wurde vorher ein die putative Bindestelle der microRNA enthaltendes Fragment aus dem 3'-UTR der zu untersuchenden mRNA in einen Luciferase-Vektor kloniert (siehe 3.9). In diesem Fall wurde ein 224 bp großes Fragment aus dem 3'-UTR des MDMX-Gens mit Mittelpunkt um den SNP34091 mittels PCR amplifiziert. Dabei wurde als template genomische DNA der Zelllinien EFO-21 (C/C) und OAW-42 (A/A) genutzt. Die erhaltenen Fragmente wurden in den pscheck2-Vektor (Promega, Heidelberg) kloniert.

Im ersten Schritt wurden die Zellen (A2780) in weiße 96-well-Platten (Greiner, Nürtingen) ausgestreut und 24 h angezüchtet. Die Zellen wurden dann wie in Abschnitt 3.11.2 beschrieben mit den Luciferase-Vektoren oder dem leeren pscheck2 Vektor transfiziert. Die Zellen wurden 24 h kultiviert und anschließend auf ihre Luciferase-Aktivität vermessen.

Dazu wurde der Dual-Glo-Kit (Promega, Heidelberg) verwendet. Zuerst wurde eine Substrat-Lösung zur Vermessung der Firefly-Luciferase-Aktivität (Kontrollgen) hergestellt und je 50 µl je well auf die Zellen gegeben. Die Vermessung erfolgte bei Raumtemperatur im Plattenreader Genios (Tecan, Gröding, Österreich) nach einer Prä-Inkubations-Phase von 15 Minuten. Nach Beendigung der Messung wurde die Firefly-Luciferase durch Zugabe der zweiten Substrat-Lösung inhibiert, mit der die Renilla-Luciferase-Aktivität (Reportergen) gemessen werden konnte. Dazu wurde nach einer Prä-Inkubationsphase

von 15 min die Platte noch einmal im Plattenreader Genios (Tecan) vermessen. Die beiden Werte wurden dann in Beziehung gesetzt, um den relativen Wert der Luciferase-Aktivität zu bestimmen.

3.13 Affinitätsreinigung nach Transfektion von Biotin-markierter mir-191

Die Affinitätsreinigung wurde aufgrund der größeren Erfahrung in der Arbeitsgruppe von Anders Lund in Kopenhagen durchgeführt (Christoffersen *et al.*, 2010; Orom und Lund, 2007). Die Zellen wurden zunächst in 10 cm Schalen eingestreut. Nach 24 h wurden die Zellen mit 2 nM Biotin-markierter mir-191, Biotin-markierter mir-10A oder unmarkierter mir-191 transfiziert. Nach weiteren 24 h wurden pro Ansatz 25 μ L Streptavidin-Agarose-Beads (GE, Healthcare) zweimal mit Lysepuffer gewaschen. Zuvor wurden die Beads für 3 h bei 4 °C mit BSA blockiert, um unspezifische Bindungen zwischen RNA und Proteinen zu verhindern. Die Zellen wurden mit kaltem PBS gewaschen, mit 1 mL Lysepuffer versetzt, auf Eis abgeschabt, und das Lysat für weitere 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Lysat für 15 min bei 4 °C und 12.000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. 50 μ L dieses Zelllysats wurden als input-Kontrolle abgenommen, der Rest mit den gewaschenen Streptavidin-Agarose-Beads für eine Stunde bei 4 °C rotiert. Anschließend wurden die Beads viermal mit eiskaltem Lysepuffer gewaschen. Zu den Beads und zur input-Kontrolle wurden dann 200 μ L Trizol-Reagenz hinzugegeben und für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 40 μ L Chloroform, wurde für 30 s gevortext und der Ansatz für 15 min bei 12.000 g bei 4 °C abzentrifugiert, und der Überstand danach in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Präzipitation der RNA erfolgte für mindestens 1 h nach Zugabe von 1 μ L GlycoBlue (Ambion), 6 μ L 5 M NaCl und 360 μ L eiskalten 95 %igen Ethanol. Der Ansatz wurde wie gehabt abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet mit 500 μ L 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und das Pellet luftgetrocknet. Die RNA wurde in 10-20 μ L RNase-freiem Wasser gelöst.

Lysepuffer: 20 mM Tris, pH 7,5
200 mM NaCl
2,5 mM MgCl₂

Dem Puffer werden kurz vor Gebrauch 1 mM DTT und RNase-Inhibitoren zugegeben.

3.14 Immunhistochemie

Immunhistochemische Untersuchungen wurden entweder an Formalin- oder Acetonfixierten Kryoschnitten durchgeführt. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 2.6 beschrieben. Das nachfolgend dargestellte Protokoll kann für Paraffin- und Gefrierschnitte gleichermaßen verwendet werden (bei Gefrierschnitten entfällt die Entparaffinierung).

1. Anfertigung von 4 µm-dicken Schnitten
2. Schnitte auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger (Superfrost) aufziehen
3. Objektträger 15 min bei 60 °C inkubieren
4. Entparaffinierung im Xylolbad (2 x 5 min)
5. Schnitte in absteigender Alkoholreihe rehydrieren (2 x 3 min 99 % Ethanol, 2 x 1 min 95 % Ethanol, 2 x 1 min 70 % Ethanol)
6. Objektträger für 5 min in PBS pH 7,4 spülen
7. 30 min in 2 %iger H₂O₂-Lösung inkubieren (Abweichungen sind möglich und müssen für jedes Gewebe individuell ermittelt werden)
9. 5 min Inkubation in 6 %iger Trägerproteinlösung zur Blockierung unspezifischer Bindungen
10. vorsichtig die Trägerproteinlösung vom Präparat abtupfen
11. Auftragen des Primär-Antikörpers in entsprechender Verdünnung
12. Inkubation in feuchter Kammer 1 h bei RT oder ÜN bei 4 °C
13. zweimal für 5 min mit PBS pH 7,4 spülen
14. 10 min mit biotinyliertem Sekundär-AK bei RT inkubieren (Anti-Maus- oder Anti-Kaninchen-Ig)
15. zweimal für 5 min mit PBS pH 7,4 spülen
16. 10 min mit Peroxidase-konjugierter Streptavidin-Lösung bei RT inkubieren
17. zweimal für 5 min mit PBS pH 7,4 spülen
18. 3 – 5 min mit Chromogen-Lsg. (DAKO) inkubieren, zweimal für 5 min mit PBS pH 7,4 spülen
19. mit Hämatoxilin gegenfärben und bläuen
20. Eindecken der Schnitte mit Gelatine (Merck)

Die gefärbten Präparate wurden von jeweils zwei Personen unabhängig voneinander ausgewertet. Im Falle von unterschiedlichen Ergebnissen in der Begutachtung wurde die

Färbung für die fraglichen Proben an neuen Schnitten des gleichen Präparats wiederholt. Eine Probe wurde dann als positiv bewertet, wenn mindestens 10 % der Tumorzellen eine signifikante Färbung aufwiesen.

3.15 Suchalgorithmen für microRNA-Proteintargets

Mittels im Internet verfügbarer Suchalgorithmen wurden putative mRNA-Targets ausgesuchter microRNAs identifiziert. Es wurden die Datenbanken TargetScan 4.2, PicTar, miRBase und miRanda verwendet.

http-Adressen der Datenbanken (Stand März 2010):

TargetScan 4.2 <http://www.targetscan.org>

PicTar <http://pictar.mdc-berlin.de>

miRanda <http://www.microRNA.org>

miRBase <http://microrna.sanger.ac.uk/targets/v5/>

3.16 Statistische Analysen

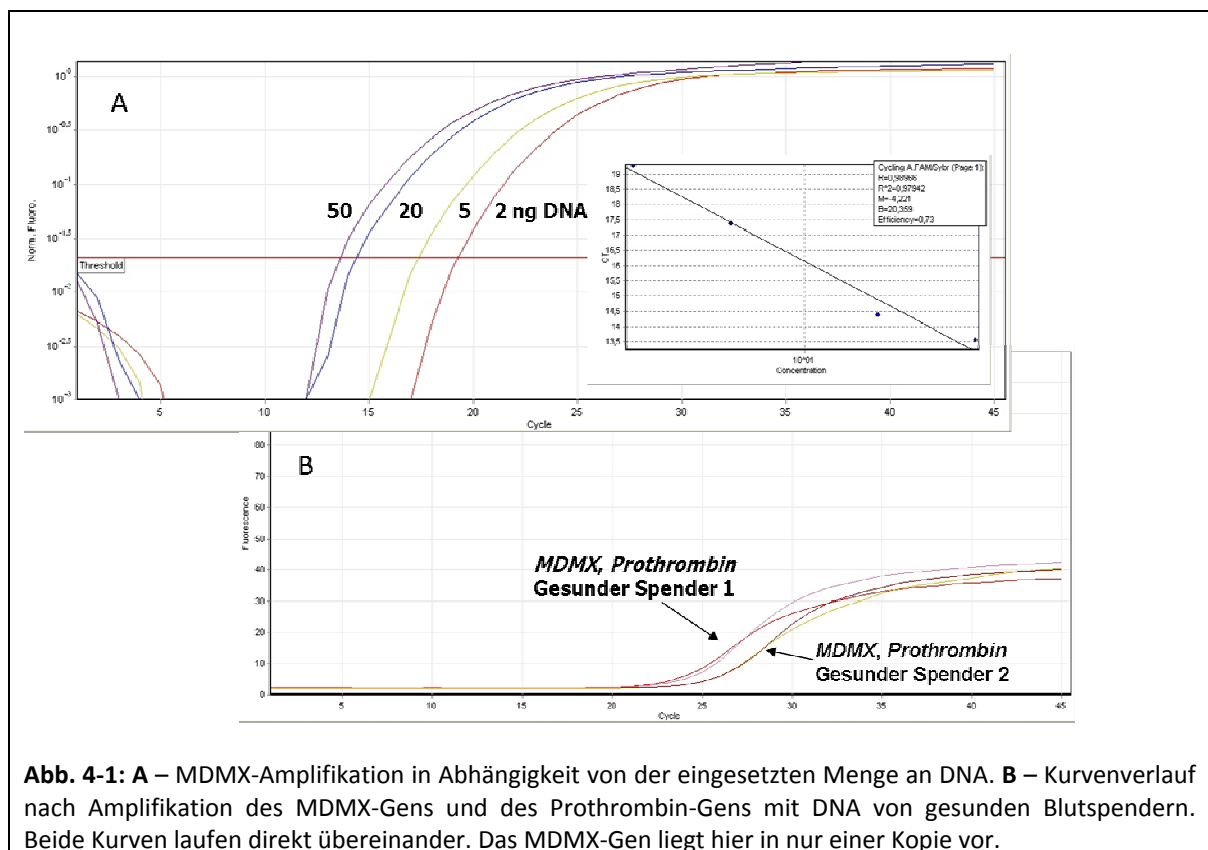
Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der Software SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Als signifikant wurden dabei alle Werte eingestuft, die innerhalb des Wahrscheinlichkeitsintervalls von 0,05 lagen. Die statistischen Analysen umfassten Überlebenszeitanalysen (Kaplan-Meier-Analyse, multivariate Cox-Regressionsanalyse), t-Tests, χ^2 -Tests (Kreuztabellen) und bivariate Korrelationen. Die Überlebenszeitanalyse ist eine statistische Analyse, bei der die Zeit bis zum Eintreten eines bestimmten Ereignisses zwischen zwei oder mehr Gruppen verglichen wird. Mithilfe dieser Analyse können die Effekte von prognostischen Faktoren, medizinischer Behandlung oder schädlichen Einflüssen auf das Erreichen eines spezifischen Endpunktes (Tod des Patienten, Heilung, Neuerkrankung oder Eintreten von Komplikationen) geschätzt werden. Beispiele für solche Analysen sind die Kaplan-Meier-Analyse oder die Cox-Regression. Bei der Kaplan-Meier-Analyse kann die Wahrscheinlichkeit, dass ein Ereignis bis zu einem bestimmten Zeitpunkt eintritt, auch dann berechnet werden, wenn nicht alle Patienten identische Beobachtungszeiträume haben. Es wird dabei das kumulative Überleben der Patientengruppen mit der Überlebenszeit verglichen. Die Kaplan-Meier-Kurve ist weiterhin geeignet zum Ablesen spezifischer Überlebensraten (z.B. 1- oder 5-Jahres-Überlebensrate) oder genereller Überlebenszeiten. Die Cox-Regression basiert auf dem Konzept der Hazardrate, mit der die Wahrscheinlichkeit eines „Austrittsereignisses“ (z.B. Tod einer Person) zu einem festen Zeitpunkt geschätzt wird. Der Vorteil gegenüber

der Kaplan-Meier-Analyse liegt darin, dass weitere prognostische Faktoren in das Modell integriert werden können. Da bei Tumorerkrankungen klinische Parameter wie das Tumorstadium oder der Resektionsgrad eine wichtige Rolle für die Prognose spielen, kann daher der Einfluss dieser Parameter in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse einbezogen werden, so dass die Prognoserelevanz des zu untersuchenden Faktors ohne Einfluss der klinischen Faktoren ausgedrückt werden kann.

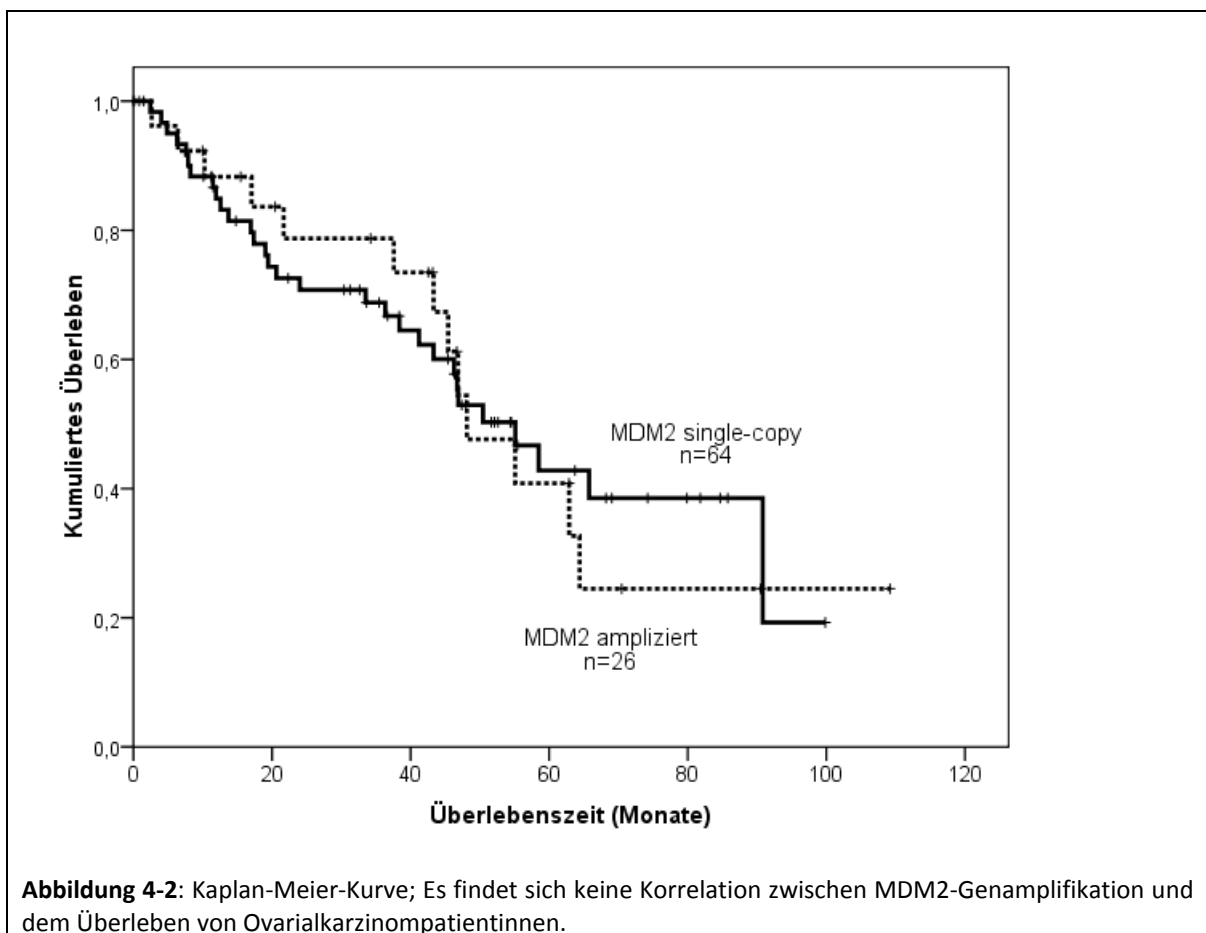
4. Ergebnisse

4.1 Untersuchungen zur MDM2- und MDMX-Genamplifikation in Ovarialkarzinomen

In Glioblastomen konnte bereits vor einigen Jahren gezeigt werden, dass in einem geringen Prozentsatz eine Amplifikation des MDMX-Gens vorliegt (Riemenschneider *et al.*, 1999). Zur Rolle von MDM2-Genamplifikationen gibt es in der Literatur widersprüchliche Daten. Zum einem weist der Chromosomenarm 12q13-14, auf dem auch das MDM2-Gen lokalisiert ist, in Ovarialkarzinomen häufig Zugewinne auf (Hauptmann *et al.*, 2002). Eine andere Arbeitsgruppe fand jedoch nur eine geringe Amplifikationsrate bei Tumoren in Stadium III (Courjal *et al.*, 1996). In dem am Institut für Pathologie vorhandenen Ovarialkarzinomkollektiv wurde auch die MDM2- und MDMX-Genamplifikationsrate mittels real-time PCR untersucht. Dabei wurden die Signale von MDM2 bzw. MDMX ins Verhältnis zu den Signalen des Referenzgens Prothrombin gesetzt. Das Prothrombin-Gen liegt in Tumoren in der Regel mit nur einer Kopie vor. Zunächst wurde der Assay mit DNA von gesunden Blutspendern etabliert. Wie in Abbildung 4-1B zu sehen, liegen die Amplifikationskurven von MDMX und Prothrombin direkt übereinander, was dafür spricht, dass das MDMX-Gen nicht amplifiziert vorliegt. In Abbildung 4-1A wird

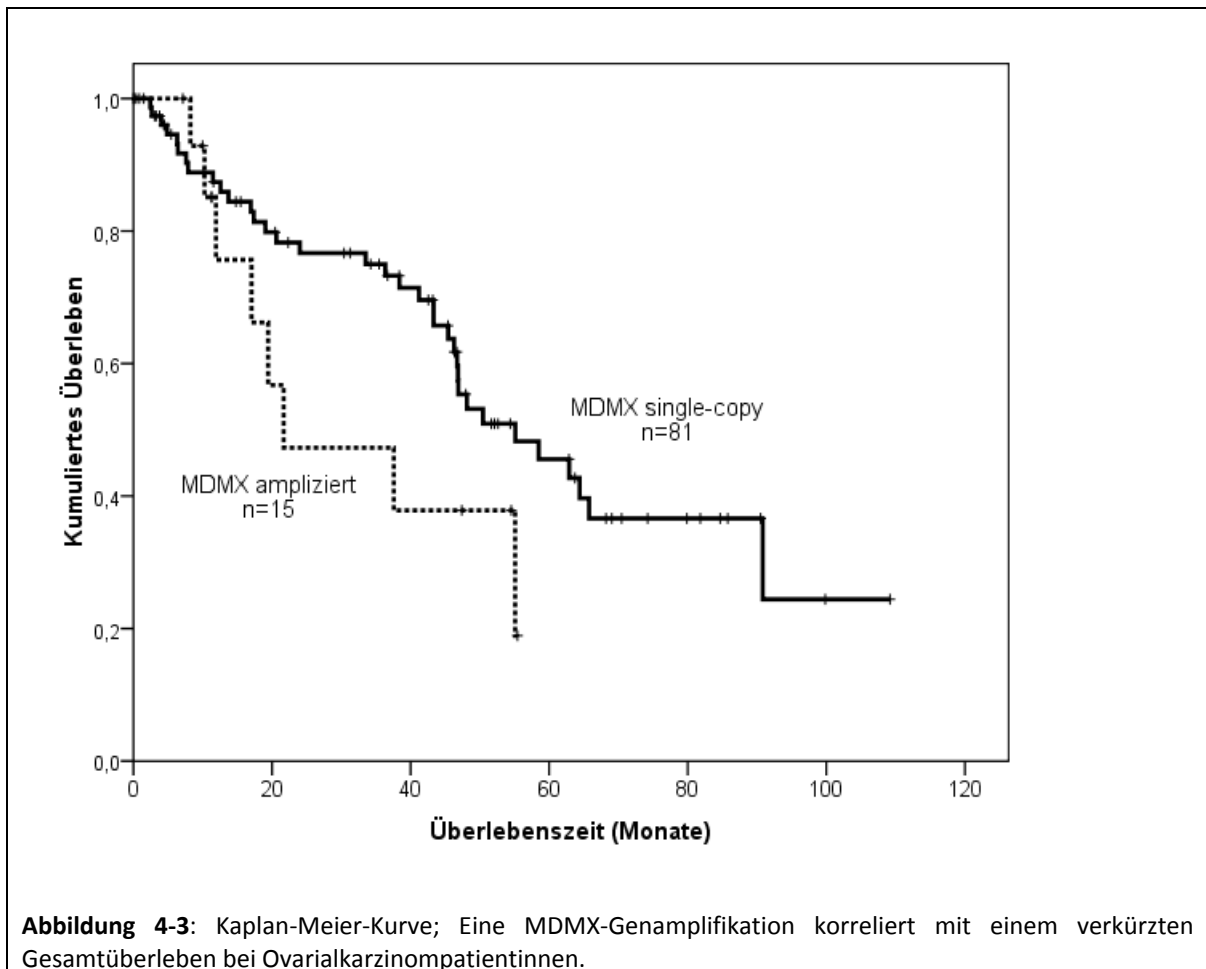


deutlich, dass die Kurven von der Menge an eingesetzter DNA abhängig sind. Da für die Untersuchung am Patientenmaterial kein Normalgewebe zur Verfügung stand, diente die vom gesunden Oberflächenepithel des Ovars abstammende Zelllinie HOSE als Referenz. Für die Auswertung wurde das Verhältnis von amplifizierter MDM2- bzw. MDMX-DNA zu Prothrombin bestimmt und mit dem Verhältnis der Zelllinie HOSE verglichen. War der Wert des Tumors im Vergleich zur Zelllinie mindestens 3-fach höher, wurde der Tumor als amplifiziert eingestuft. Von den 90 untersuchten Tumoren wiesen 26 eine MDM2-Amplifikation (28,8 %) auf. Wie in Abbildung 4-2 deutlich wird, zeigte sich in der Kaplan-Meier-Kurve jedoch kein Unterschied im Überleben zwischen den zwei Patientengruppen



($p=0,937$). Die durchschnittliche Überlebenszeit für Patientinnen mit MDM2-Amplifikation betrug 56,2 Monate. Für Patienten ohne MDM2-Amplifikation lag die durchschnittliche Überlebenszeit bei 57,4 Monaten ($p=0,937$). Nach Unterteilung des Kollektivs in low-grade und high-grade Karzinome zeigte sich auch innerhalb dieser beiden Gruppen kein Unterschied im Überleben von Patientinnen mit und ohne MDM2-Amplifikation (MDM2 ampl. $p=0,844$; MDM2 nicht ampl. $p=0,97$).

Bei der Untersuchung der MDMX-Amplifikation fand sich dagegen ein deutlicher Unterschied beim Überleben zwischen Patientinnen mit und ohne Amplifikation im Tumor (siehe Abbildung 4-3). 15 der 98 untersuchten Ovarialkarzinome wiesen eine MDMX-Genamplifikation auf (15,3 %). Dabei hatten die Patientinnen mit MDMX-Genamplifikation eine mittlere Überlebenszeit von 32 Monaten, während Frauen ohne



Genamplifikation eine mittlere Überlebenszeit von 61 Monaten aufwiesen. Die Daten sind jedoch nicht statistisch signifikant ($p=0,121$). In der multivariaten Cox-Regression (adjustiert nach Resttumor) zeigte sich für Patientinnen mit MDMX-Genamplifikation ein 2,2-fach erhöhtes Risiko am Tumor zu versterben ($p=0,101$). Bei Unterteilung des Kollektivs wiesen 15 % der low-grade Karzinome (4/23) und 15 % der high-grade Karzinome (11/60) eine Amplifikation des MDMX-Gens auf. Dabei war bei den low-grade-Karzinomen kein Unterschied im Überleben zwischen Patientinnen mit und ohne MDMX-Amplifikation auszumachen ($p=0,572$; Daten nicht gezeigt). In der Gruppe der high-grade Karzinome hingegen zeigten die Patientinnen mit MDMX-Genamplifikation ein deutlich

verkürztes Gesamtüberleben ($p=0,001$; siehe Abb. 4-4). In der multivariaten Cox-Regressionsanalyse (adjustiert nach Resttumor) haben die Patientinnen mit MDMX-Amplifikation ein 3,2-fach erhöhtes Risiko am Tumor zu versterben ($p=0,039$). Im nächsten Schritt wurde RNA aus den Formalin-fixierten in Paraffin-eingebetteten Geweben isoliert. Nach reverser Transkription der RNA wurden die Mengen von „full-length“-MDMX mRNA und der Spleißvariante MDMX-S (charakterisiert durch den Verlust von Exon 6) mittels realtime PCR quantifiziert. Dabei konnte keine Korrelation zwischen MDMX-Amplifikation und full-length-MDMX mRNA gefunden werden ($p=0,738$; Daten nicht gezeigt). In dem Kollektiv der Ovarialkarzinome wurde auch keine Korrelation zwischen dem Verhältnisse von full-length-MDMX mRNA und MDMX-S mRNA zum Überleben gefunden ($p=0,643$). Dieses Ergebnis muss jedoch kritisch betrachtet werden, da die Qualität der RNA aus dem Formalin-fixierten Gewebe schlecht war, und kein Gefriermaterial zur Verfügung stand.

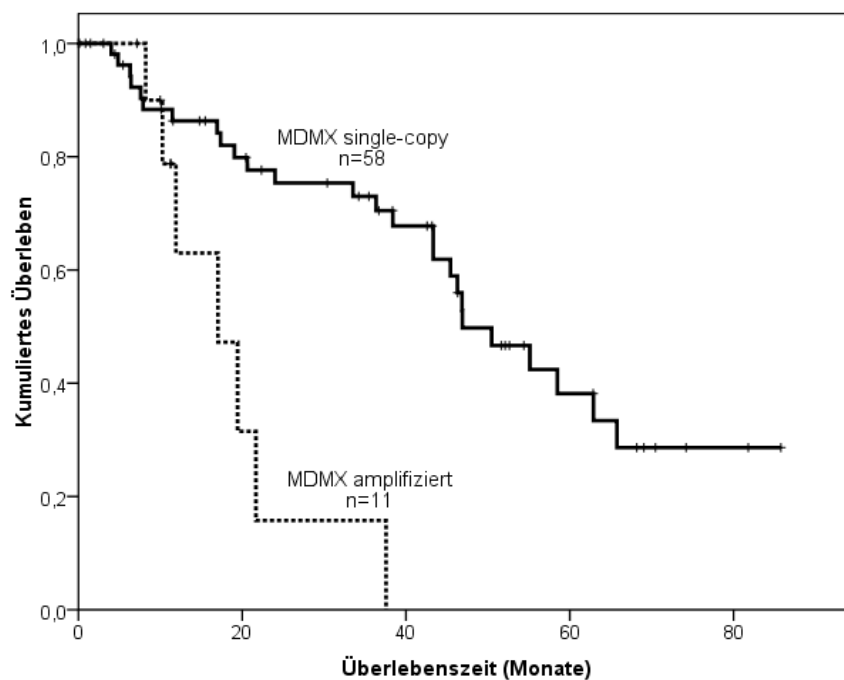


Abbildung 4-4: Kaplan-Meier-Kurve zur MDMX-Genamplifikation in high-grade Ovarialkarzinomen. Eine MDMX-Amplifikation korreliert signifikant mit einem verkürzten Überleben in high-grade Ovarialkarzinomen.

4.2 Untersuchung zur Bedeutung von p53-Veränderungen und des SNP309 für die Prognose von Ovarialkarzinompatientinnen

Ziel dieser Untersuchungen war es, den Status des SNP309 im MDM2-Gen, p53-Sequenzveränderungen und die p53-Proteinexpression für Ovarialkarzinome zu untersuchen. Wie bereits bekannt ist, führt das G-Allel des SNP309 im P2-Promotor des MDM2-Gens zu einer Abschwächung des p53-Tumorsuppressorpathways (Bond *et al.*, 2004). Im Vorfeld dieser Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der SNP309 in einer Bindestelle für den Östrogenrezeptor- α (ER α) liegt (Bond *et al.*, 2006; Kinyamu und Archer, 2003). Somit ist die Transkription der MDM2-mRNA vom P2-Promotor durch den ER α induzierbar, wodurch der SNP309 einen Einfluss auf die Tumorentstehung hat. Mit dieser Untersuchung sollte nun gezeigt werden, ob Polymorphismen oder Mutationen im p53-Signalweg auch als Marker für die Prognose von Ovarialkarzinompatientinnen genutzt werden können. Dafür wurden der Status des SNP309, p53-Sequenzveränderungen und die p53-Proteinexpression an einer Gruppe von 107 Ovarialkarzinompatientinnen untersucht.

4.2.1 p53-Mutations- und Proteinexpressionsstatus

Das zur Verfügung stehende Material wurde zunächst mittels SSCP-Analysen auf Veränderungen untersucht. Dafür wurden Exon 2 bis 9 des p53-Gens mittels PCR amplifiziert. Für die folgende SSCP-Analyse wurde die Intensität der PCR-Produkte im Agarose-Gel beurteilt werden. Die entsprechende Menge an PCR-Produkt wurde gefällt und in der denaturierenden DNA-Gelelektrophorese aufgetrennt. Anhand des Laufverhaltens der denaturierten DNA-Doppelstränge der Tumorproben verglichen mit DNA von gesunden Blutspendern wurden Rückschlüsse auf mögliche Veränderungen des genetischen Materials gezogen. Alle Fälle mit verändertem Bandenmuster wurden mittels Sequenzierung weiter analysiert. In den untersuchten Proben konnten insgesamt 111 Sequenzveränderungen in exonischen sowie intronischen Bereichen des p53-Gens nachgewiesen werden, wovon 44 Mutationen im Bereich von Exon 4-8 lagen, einschließlich zweier Mutationen im Intron (siehe Abbildung 4-5 und Tabelle 4-1). Bei 22 der Sequenzveränderungen handelte es sich um eine 16-bp-Duplikation in Intron 3 (rs17878362) und weitere 45 Veränderungen wurden in Codon 72 von Exon 4 (rs1042522; C>G; Pro72Arg) detektiert. Beide Alterationen sind bereits bekannte Polymorphismen des

p53-Gens. Von den Mutationen, die die p53-Proteinsequenz beeinflussen, lagen 93 % (39/42) in Exon 5-8. Dabei handelte es sich in 63 % (27/42) der Fälle um Missense-Mutationen; 9,3 % (4/42) waren Nonsense-Mutationen, bei denen der Basenpaaraustausch zu einem vorzeitigen Stop-Codon führt. Bei weiteren 19 % (8/42) der

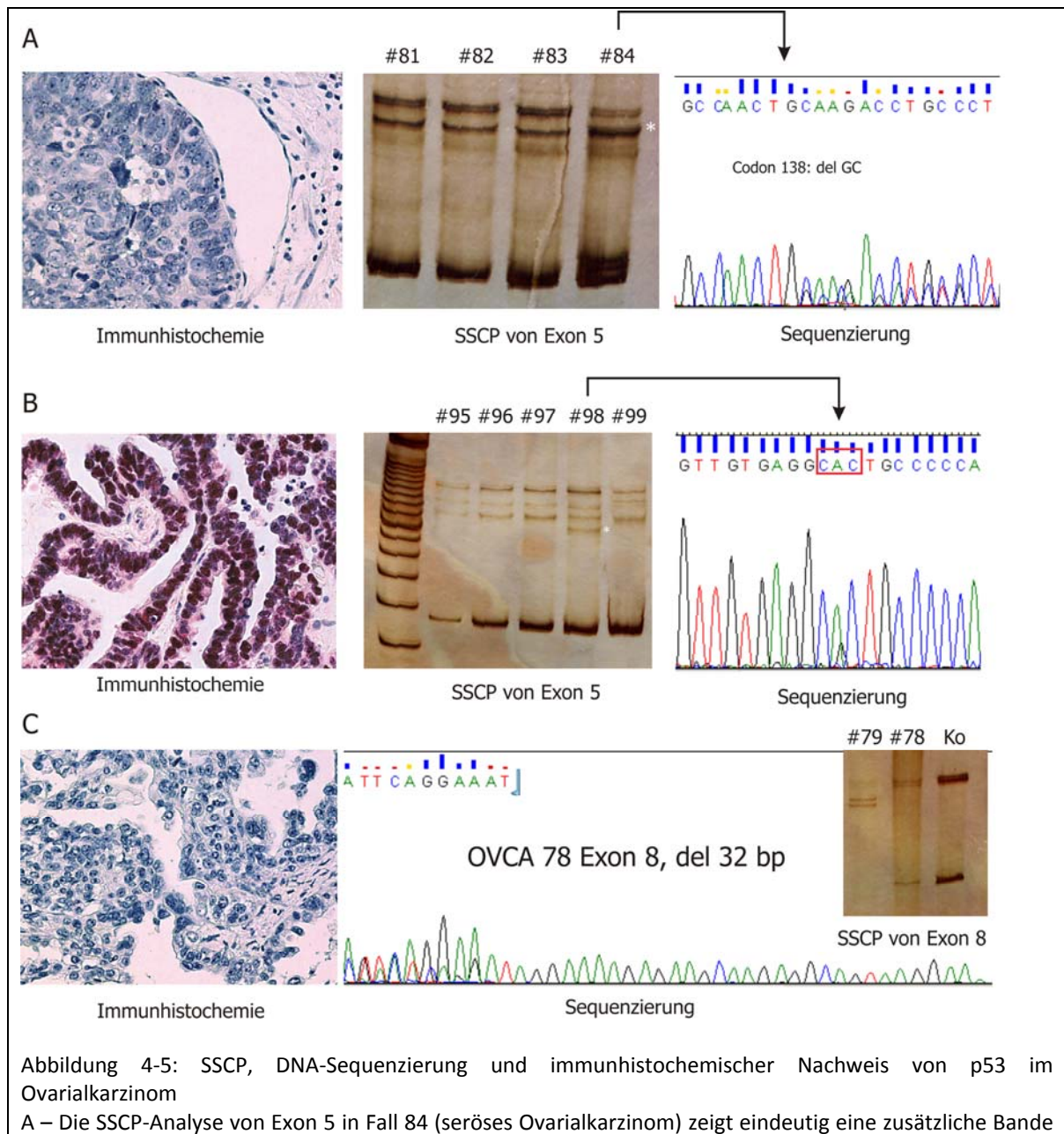


Tabelle 4-1: p53-Mutationen im Kollektiv der untersuchten Ovarialkarzinome

Fall	Histologie	Exon	Codon	Konservierte Region	Mutations-typ	Austausch*	wt	mt	wt-AA	mt-AA
#9	gemischt	4	91	NC	nonsense	G>A	TGG	TAG	Trp	STOP
#37	ser	4	91	NC	nonsense	G>A	TGG	TAG	Trp	STOP
#64	ser	4	98	NC	Missense	C>T	CCT	CCT	Pro	Leu
#84	ser	5	138	Co	Deletion	-GC (*)				
#115	gemischt	5	141	Co	Missense	G>A	TGC	TAC	Cys	Tyr
#116	ser	5	141	Co	Missense	G>A	TGC	TAC	Cys	Tyr
#8	endo	5	149	NC	Insertion	+T	TCC	TTC	Ser	Phe
#109	ser	5	150	NC	Missense	C>T	ACA	ATA	Thr	Ile
#99	ser	5	152	NC	Deletion	C	CCG		STOP	
#68	ser	5	153	NC	Insertion	+T				
#34	UC	5	175	Co	Missense	G>A	CGC	CAC	Arg	His
#39	ser	5	175	Co	Missense	G>A	CGC	CAC	Arg	His
#98	ser	5	175	Co	Missense	G>A	CGC	CAC	Arg	His
#67	ser	5	178	Co	Missense	C>T	CAC	TAC	His	Tyr
#111	ser	5	179	Co	Missense	A>G	CAT	CGT	His	Arg
#31	un	Int5								
#3	ser	6	195	NC	Missense	T>C	ATC	ACC	Ile	Thr
#24	TCC	6	195	NC	Missense	T>C	ATC	ACC	Ile	Thr
#20	EC	6	200	NC	Deletion	T				
#61	ser	6	201	NC	nonsense	T>A	TTG	TAG	Leu	STOP
#91	ser	6	206	NC	Deletion	TT (*)				
#60	un	6	216	NC	Missense	G>A	GTG	ATG	Val	Met
#32	ser	6	220	NC	Missense	A>G	TAT	TGT	Tyr	Cys
#15	ser	7	225	NC	Missense	G>T	GTT	TTT	Val	Phe
#106	endo	7	229	NC	Insertion	+T (*)	GAC	TGA	Asp	STOP
#79	ser	7	239	Co	Missense	A>G	AAC	AGC	Asn	Ser
#45	ser	7	245	Co	Missense	G>A	GGC	AGC	Gly	Ser
#47	UC	7	245	Co	Missense	G>T	GGC	TGC	Gly	Cys
#59	ser	7	245	Co	Missense	G>A	GGC	GAC	Gly	Asp
#4	ser	7	248	Co	Missense	G>A	CGG	CAG	Arg	Glu
#69	ser	7	248	Co	Missense	G>A	CGG	CAG	Arg	Gln
#40	klar	7	257	Co	Missense	T>A	CTG	CAG	Leu	Gln
#33	klar	7	259	NC	Missense	G>T	GAC	TAC	Asp	Tyr
#118	ser	Int7	Splice							
#81	ser	8	267	NC	Deletion	-G				
#76	gemischt	8	272	Co	Missense	G>A	GTG	ATG	Val	Met
#42	gemischt	8	273	Co	Missense	G>A	CGT	CAT	Arg	His
#41	ser	8	274	Co	Missense	G>T	GTT	TTT	Val	Phe
#27	ser	8	275	Co	Missense	G>T	TGT	TTT	Cys	Phe
#80	gemischt	8	280	Co	Missense	G>C	AGA	ACA	Arg	Thr
#78	klar	8	285	Co	Deletion	-32 (*)				
#7	gemischt	8	291	NC	Deletion	-G				
#43	ser	8	294	NC	nonsense	G>T	GAG	TAG	Glu	STOP
#86	ser	8	306	NC	Deletion	-C	CGA			

Abkürzungen: endo – endometrioides Karzinom des Ovars; MC – muzinöses Karzinom des Ovars; ser – seröses Karzinom des Ovars; TCC – Transitionalzellkarzinom des Ovars; UC – undifferenziertes Karzinom des Ovars; NC – nicht konservierte Region des p53-Gens; Co – hochkonservierte Region des p53-Gens.
* Mutationen, welche bis Oktober 2006 nicht durch Petitjean *et al.* beschrieben wurden.

Fälle handelte es sich um Deletionen und 7 % (3/42) wiesen eine Insertion von einem oder zwei Basenpaaren auf. Am häufigsten von Veränderungen betroffen waren mit jeweils 3 Fällen Codon 175 und Codon 245. Hierbei handelt es sich um bereits bekannte

Hotspot-Mutationsstellen. 12 der 42 exonischen Mutationen wurden in dieser Studie das erste Mal in Ovarialkarzinomen beschrieben, wobei vier dieser Mutationen nach unserem Wissen erstmalig im p53-Gen nachgewiesen wurden (Petitjean *et al.*, 2007).

Zusätzlich sollte in dieser Studie auch der p53-Expressionsstatus mittels Immunhistochemie (IHC) bestimmt werden, da Mutationen allein nicht die Expression des Proteins vorhersagen können. Weiterhin war für uns auch von Interesse, ob Patientinnen mit dem Wildtyp p53-Gen Unterschiede in der Expression des Proteins zeigen. Die Untersuchungen der p53-Proteinexpression mittels Immunhistochemie ergaben, dass 51,4 % (55/107) der Fälle eine p53-Überexpression aufwiesen. 20 Fälle (18,7 %) zeigten eine sehr schwache Färbung von 10 % der Tumorzellen oder weniger und in 32 (30,2 %) Fällen war die p53-Immunhistochemie negativ. Normales ovarielles Oberflächenepithel diente als Kontrolle und zeigte keine p53-Expression.

4.2.2 Beziehung von p53-Gen- und Proteinexpressionsstatus

Im nächsten Schritt sollte analysiert werden, ob es eine Verbindung zwischen p53-Mutationsstatus und p53-Expression gibt. In der Literatur wird beschrieben, dass mutiertes p53 häufig mit einer Überexpression des Proteins einhergeht. In dieser Studie korrelierte eine p53-Überexpression nicht mit dem p53-Mutationsstatus ($p=0,59$; χ^2 -Test). 54 % (24/44) der Fälle mit mutiertem p53 zeigten zwar auch eine Überexpression des p53-Proteins, der Prozentsatz der Fälle mit Wildtyp-Gen und überexprimiertem p53 lag jedoch bei 49 % (31/63).

Für eine bessere Auswertbarkeit unterteilten wir die Fälle in 4 Gruppen. Proben mit Wildtyp p53-Gen und nicht detektierbarem Protein wurden als „p53 normal“ klassifiziert, da hier vermutlich funktionsfähiges p53-Protein vorliegt (32/107, 29,9 %). Die weiteren Gruppen enthielten Fälle mit p53-Veränderungen, (i) Fälle die Wildtyp-p53 überexprimieren (31/107, 29 %), (ii) Fälle mit p53-Mutation und Proteinüberexpression (24/107, 22,4 %) und (iii) Fälle mit p53-Mutation, jedoch nicht detektierbarem p53-Protein (20/107, 18,75 %).

P53-Mutationen und eine p53-Proteinüberexpression konnte häufiger in fortgeschrittenen Stadien des Ovarialkarzinoms nachgewiesen werden, wobei nur die Überexpression signifikant mit dem Tumorstadium korrelierte (Tabelle 4-2).

Tabelle 4-2: Zusammenhang zwischen FIGO-Stadium und p53-Status in Ovarialkarzinomen

FIGO-Stadium	p53-Mutationen		p53 Immunhistochemie	
	Wildtyp	mutiert	negativ	positiv
I	22	8 (26%)	22	8 (27%)
II	7	2 (22 %)	5	4 (44 %)
III	32	31 (49.2%)	23	40 (63%)
IV	2	3 (60%)	2	3 (66 %)
p	p=0.096		p=0.01	
Zusammenfassung	63	44 (41.1%)	52	55 (51.4 %)

4.2.3 Korrelation von p53-Status und Ansprechen auf Chemotherapie

Ovarialkarzinompatientinnen entwickeln oft kurz nach der Primäroperation Rezidive, die oft Platin-resistent sind. Daher sollte analysiert werden, ob der p53-Status einen Einfluss auf das Ansprechen von Chemotherapeutika bzw. die Entstehung von Rezidiven hat. Wenn Rezidive früher als 6 Monate nach Beginn der Chemotherapie auftreten, wird der Tumor als resistent bezeichnet. Wir konnten zeigen, dass Patientinnen mit p53-Veränderungen signifikant resistenter (78 %) gegenüber Chemotherapeutika waren, als Patientinnen mit „normalem“ p53 (52 %, $p=0,027$). Dies gilt sowohl für die Proteinexpression beim Vergleich von Tumoren mit p53-Überexpression (83 %, $p=0,02$) und Tumoren ohne p53-Expression (58 %), als auch für den p53-Mutationsstatus. Dabei sind Patientinnen mit p53-Mutationen ebenfalls resistenter gegenüber einer Chemotherapie (79 %) im Vergleich zu Patientinnen mit Wildtyp p53-Gen (64 %). Diese Korrelation ist jedoch nicht signifikant ($p=0,148$). Patientinnen mit verändertem p53 (Mutation und/oder Überexpression) entwickelten schneller ein Rezidiv als Patientinnen mit normalem p53 (28 vs. 51 Monate, $p=0,075$). Damit wird deutlich, dass Veränderungen des p53-Proteins, ob durch Mutation oder veränderter Expression, nachteilig für Ovarialkarzinompatientinnen sind.

4.2.4 SNP309-Status im MDM2-P2-Promotor

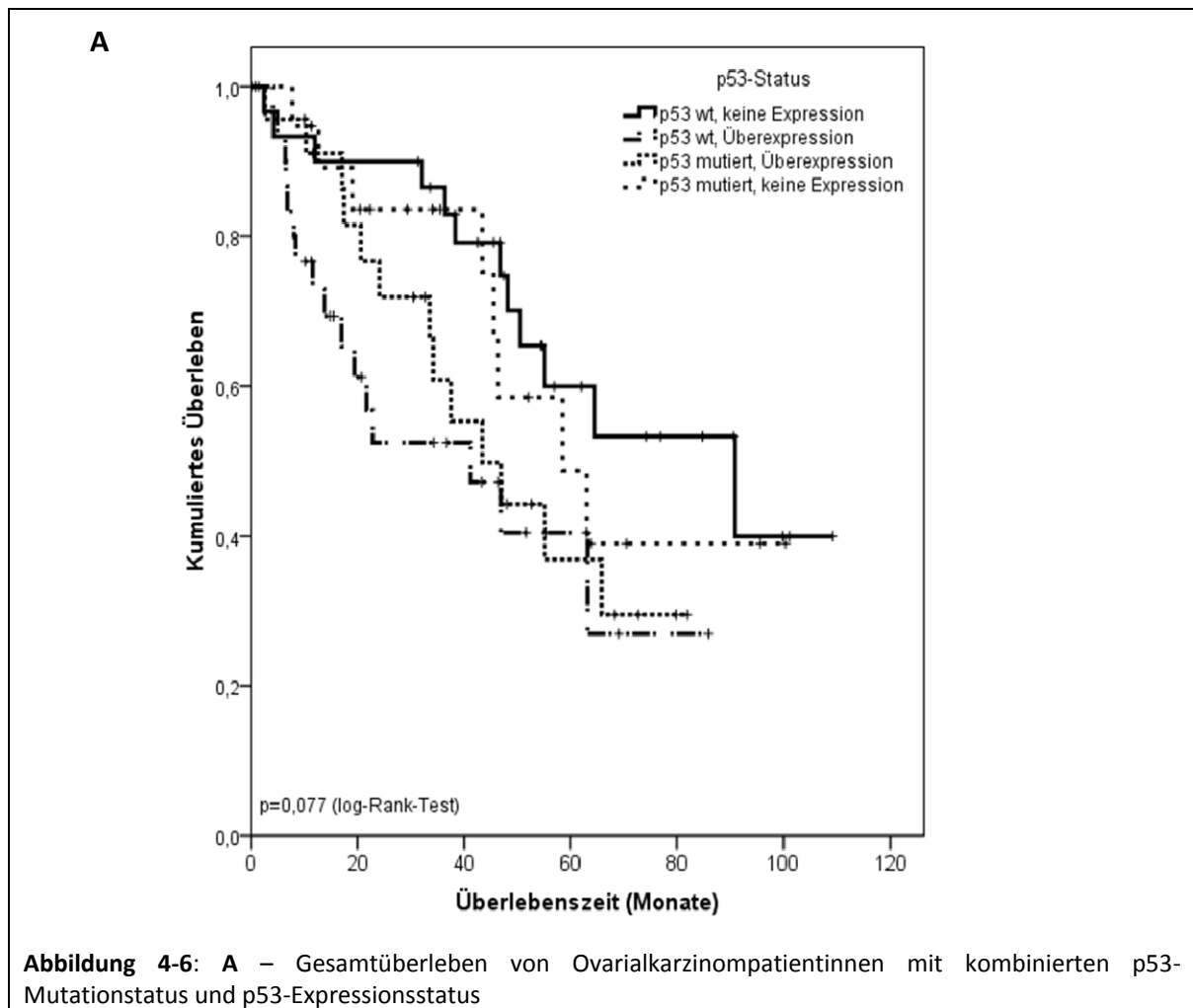
Ein wichtiger Gegenspieler von p53 im Tumorsuppressor-Pathway ist das Onkogen MDM2. Im Bereich des P2-Promotors des MDM2-Gens konnte ein Polymorphismus (SNP309) identifiziert werden, welcher bei Vorliegen des G-Allels mit einer Abschwächung des p53-Tumorsuppressor-Weges einhergeht (Bond *et al.*, 2004). Daher sollte die Rolle dieser Sequenzvariation bei der Tumorentstehung und Prognose von Ovarialkarzinomen

untersucht werden. Der SNP309-Status konnte in 103 der 107 Ovarialkarzinompatientinnen bestimmt werden. Wir konnten eine verhältnismäßig hohe Frequenz des heterozygoten Zustandes T/G (52,4 %) und eine geringere Prozentzahl an homozygoten G/G (7,8 %) Veränderungen im Vergleich zu gesunden Blutspendern (T/G: 40 %, G/G: 12 %) nachweisen. Wie bereits bekannt war, spielt das G-Allel hauptsächlich bei Patientinnen mit funktionierendem Östrogen-Signalweg eine Rolle (Bond *et al.*, 2006). Deshalb untersuchten wir, ob auch bei Ovarialkarzinompatientinnen eine Korrelation des SNP309-Status mit dem Alter der Frau bei Diagnosestellung und der Expression des Östrogen-Rezeptors- α (ER) nachgewiesen werden kann. 43 % (46/107) der untersuchten Tumoren waren ER α -negativ, 17 % (18/107) zeigten eine geringe und 40 % (43/107) eine hohe ER-Expression. Bei Patientinnen mit FIGO-Stadium III und Tumoren mit nachweisbarer ER-Expression mit ist der Nachweis des G-Allels des SNP309 mit einem fast 6 Jahre früheren Auftreten des Tumors verbunden (T/T: 70,6 Jahre; T/G+G/G: 64,4 Jahre), wobei der Unterschied statistisch aber nicht signifikant ist ($p=0,101$). Für Patientinnen mit stark erhöhter ER-Expression beträgt der Unterschied sogar 8,5 Jahre ($p=0,048$; T/T: 72,0 Jahre, T/G+G/G: 63,6 Jahre). Bei Patientinnen mit ER-negativen Tumoren fand sich kein Unterschied hinsichtlich des Alters bei Diagnosestellung ($p=0,44$). Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass das G-Allel des SNP309 einen intakten Östrogen-Signalweg benötigt, um die Tumorentstehung zu beschleunigen.

4.2.5 Einfluss des p53- und SNP309-Status auf das Gesamtüberleben

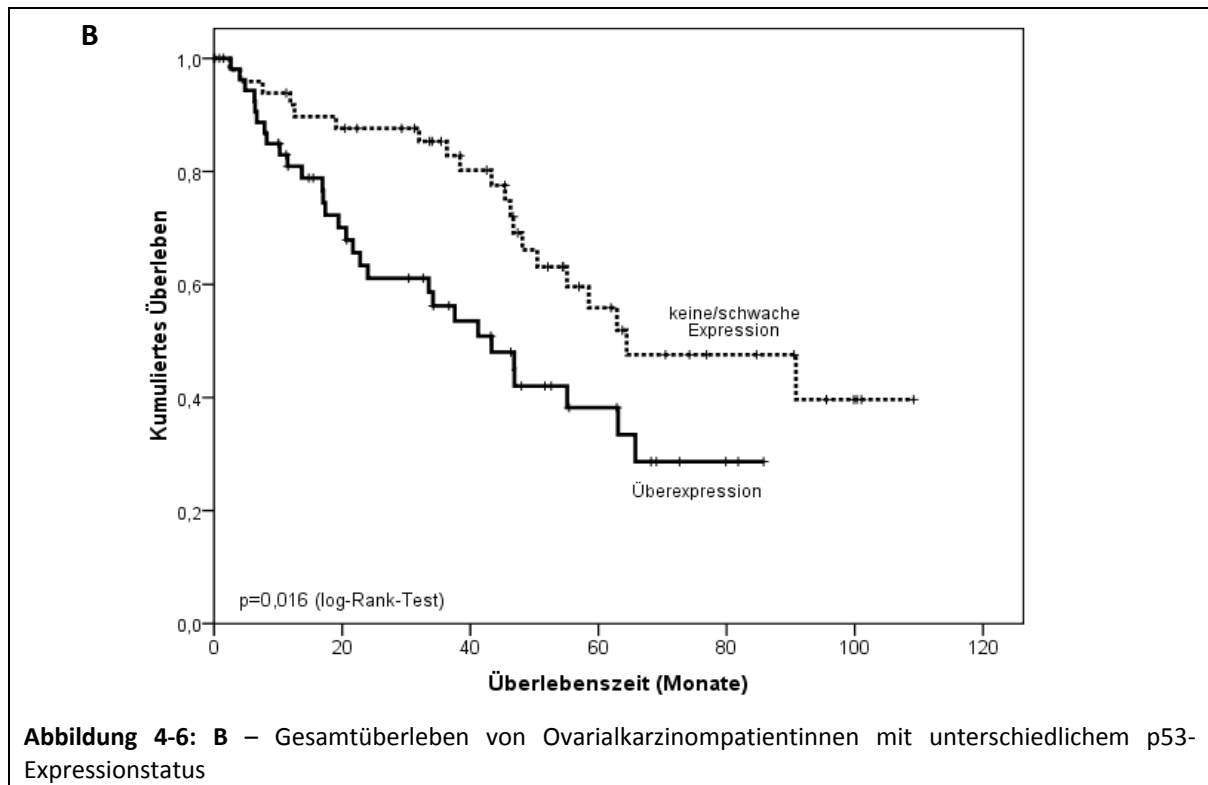
In nächsten Schritt sollte analysiert werden, wie der Status des SNP309 und p53-Veränderungen, durch Mutation oder veränderte Expression verursacht, das Gesamtüberleben von Ovarialkarzinompatientinnen beeinflussen. Bei Kombination des p53-Mutations- und Proteinexpressionsstatus zeigten die Patientinnen mit einer Überexpression des Wildtyp-Proteins das kürzeste Gesamtüberleben (42,8 Monate) im Vergleich zu Patientinnen mit Überexpression und mutiertem p53-Gen (48,2 Monate) und Patientinnen ohne nachweisbare p53-Expression (p53-Wildtyp-Gen: 72,4 Monate, p53 mutiert: 64,4 Monate). Allerdings ist der Unterschied zwischen allen Gruppen nicht signifikant ($p=0,077$; log-Rank-Test, siehe Abbildung 4-6 A). Die unterschiedlichen Überlebenszeiten der Patientinnen waren jedoch statistisch signifikant, wenn nur die Gruppe mit Wildtyp p53-Gen und keiner p53-Expression mit der mit Wildtyp-Gen und

p53-Überexpression verglichen wird ($p=0,019$; log-Rank-Test, keine Expression: 72,4 Monate, Überexpression: 42,8 Monate). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Patientinnen mit „normalem“ p53 (Wildtyp-Gen und kein nachweisbares Protein) im Vergleich zu Patientinnen, deren Tumoren eine Überexpression von Wildtyp oder mutiertem p53 zeigten, die längste Überlebenszeit hatten.

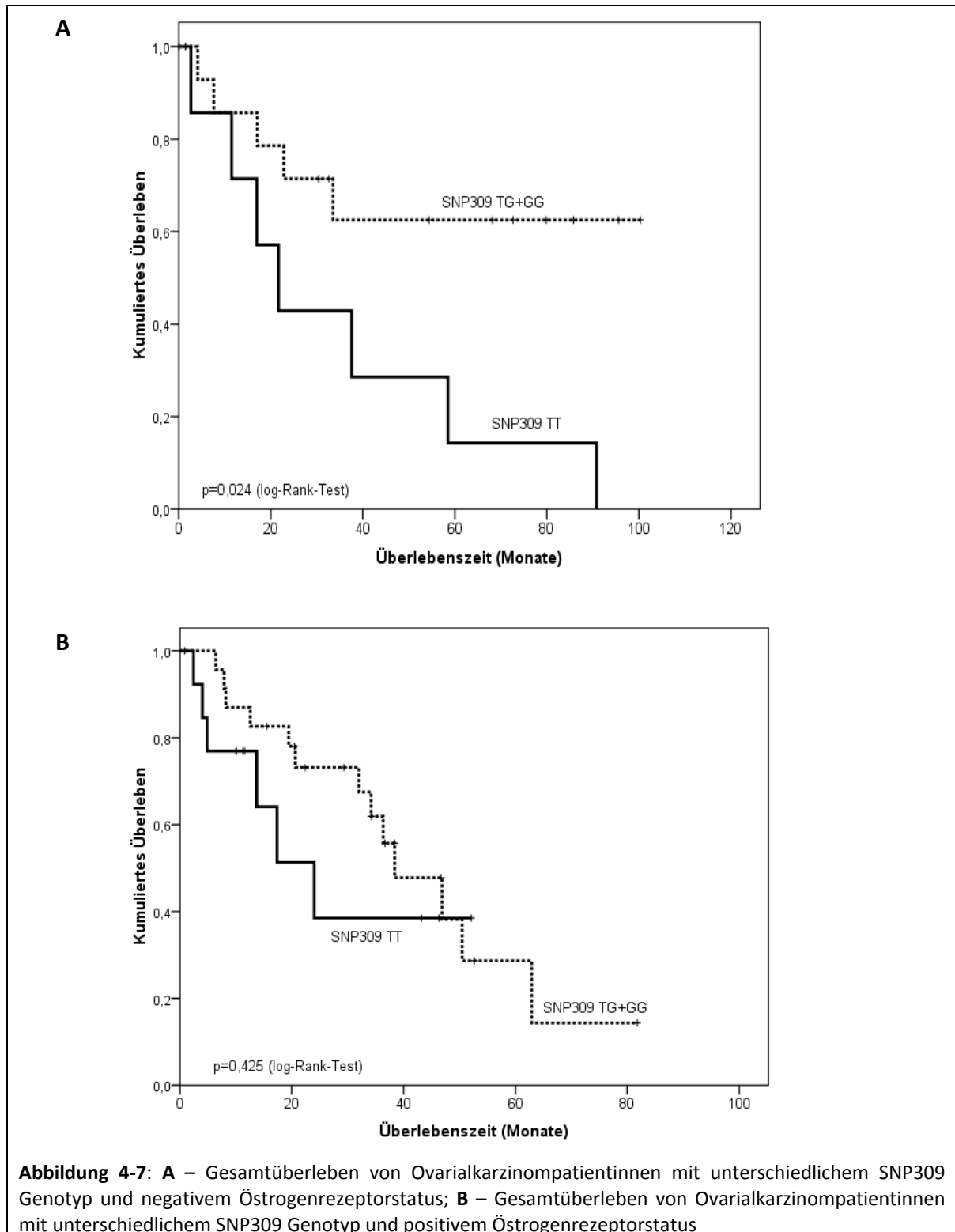


Patientinnen mit p53-Überexpression hatten im Vergleich zu Patientinnen mit fehlender oder schwacher Expression eine signifikant verkürzte Gesamtüberlebenszeit (45,8 vs. 71,7 Monate; $p=0,016$; log-Rank-Test; siehe Abbildung 4-6 B). Im Gegensatz dazu spielte der p53-Mutationsstatus allein keine Rolle beim Gesamtüberleben von Ovarialkarzinompatientinnen (wt: 62,4 Monate; mut: 58,4 Monate; $p=0,86$; log-Rank-Test). Eine auffällige Beobachtung war jedoch, dass Patientinnen mit Tumoren im FIGO III-Stadium und Wildtyp p53-Gen ein verkürztes Gesamtüberleben gegenüber Patientinnen mit mutiertem

p53-Gen hatten. Dieser Unterschied erreicht nahezu statistische Signifikanz (41 vs. 59 Monate; $p=0,058$).



Auch das Auftreten des G-Allels des SNP309 hat einen Einfluss auf das Gesamtüberleben. Die durchschnittliche Überlebenszeit für Frauen mit T/T-Status betrug 59 Monate, für Patientinnen mit G-Allel jedoch 62 Monate ($p=0,994$). Im FIGO III-Stadium ist das G-Allel im Vergleich zu Frauen mit dem T/T-Genotyp mit einem signifikant verlängertem Gesamtüberleben verbunden (57,5 Monate) (35,3 Monate; $p=0,045$; log-Rank-Test). Bei weiterer Unterteilung der FIGO III-Patientinnen entsprechend dem ER-Status (siehe Abbildung 4-7 A und B) konnten wir zeigen, dass Patientinnen mit ER-negativen Tumoren und mit T/G- bzw. G/G-Status im Vergleich zu Frauen mit T/T-Genotyp eine signifikant verlängerte Überlebenszeit hatten (69 vs. 34 Monate; $p=0,024$; log-Rank-Test). Im Gegensatz dazu beeinflusst das G-Allel das Gesamtüberleben von FIGO III-Patientinnen mit ER-positiven Tumoren nicht (geringe Expression: $p=0,424$; starke Expression: $p=0,828$). Aus diesen Ergebnissen kann man ableiten, dass ein geschwächter p53-Signalweg, sei es durch mutiertes p53 oder durch das G-Allel des SNP309, mit einer besseren Prognose für Ovarialkarzinompatientinnen verbunden ist.



In der univariaten Cox-Regressionsanalyse (siehe Tabelle 4-3) konnten wir zeigen, dass die Überexpression von Wildtyp-p53 ($p=0,016$) und ein immunhistochemischer Proteinnachweis ($p=0,018$) prognostische Faktoren sind, während die Existenz von p53-Mutationen allein das Risiko, am Tumor zu versterben, nicht erhöht ($p=0,864$). Andere prognostische Faktoren waren eine undifferenzierte Histologie ($p=0,032$), das Auftreten

von Aszites ($p=0,01$), die Resttumorgröße ($p<0,001$), das FIGO-Stadium ($p<0,001$) sowie das Fortschreiten der Erkrankung (relatives Risiko 22,3; $p=0,002$). In der multivariaten Cox-Regression (siehe Tabelle 4-3) waren jedoch nur das FIGO-Stadium ($p=0,008$), das Auftreten von Rezidiven ($p=0,024$) und die Resttumorgröße ($p=0,008$) unabhängige prognostische Marker für das Gesamtüberleben. Interessanterweise korrelierte das Pro/Pro-Allel des Arg72Pro SNP in der multivariaten Cox-Regression (adjustiert nach FIGO Stadium und Resttumor) mit einem 6,4-fach erhöhten Risiko, am Tumor zu versterben.

Tabelle 4-3: Durch multivariate Cox-Regression ermittelte Signifikanz der molekularen und klinischen Faktoren

Variablen	univariate Analyse			multivariate Analyse ^a		
	nicht-adjustiert RR	95% Konfidenz-intervall	p	adjustiert RR	95% Konfidenz-intervall	p
p53-Immunhistochemie						
negativ	1.00			1.00		
positiv	2.021	1.13 – 3.616	0.018	1.331	0.703 – 2.522	0.38
p53-Mutationen						
Wildtyp	1.00			1.00		
mutiert	1.051	0.596 – 1.851	0.864	0.648	0.333 – 1.26	0.201
p53 IHC+Mutationen						
normal	1.00			1.00		
Wildtyp, Überexpression	2.548	1.188 – 5.465	0.019	1.598	0.662 – 3.856	0.297
mutiert, keine Expression	1.922	0.87 – 4.246		0.884	0.336 – 2.325	
mutiert, Überexpression	1.284	0.524 – 3.145		0.82	0.299 – 2.246	
p53						
normal	1.00			1.00		
verändert	1.901	0.985 – 3.667	0.045	1.107	0.498 – 2.461	0.804
Arg72Pro SNP						
Arg/Arg	1.00			1.00		
Arg/Pro	0.747	0.386 – 1.446		1.693	0.769 – 3.728	
Pro/Pro	1.371	0.588 – 3.200	0.412	6.452	1.072 – 6.452	0.035
Histologie						
serös	1.00			1.00		
nicht-serös	1.938	1.011 – 3.717		1.449	0.672 – 3.124	
undifferenziert	3.679	1.284 – 10.54	0.032	1.590	0.419 – 6.033	0.496
Aszites						
nein	1.00			1.00		
ja	3.015	1.27 – 7.161	0.01	1.681	0.695 – 1.681	0.249
Rezidiv						
nein	1.00			1.00		
ja	22.34	3.072 – 162.54	0.002	11.769	1.374 – 100.77	0.024
Resttumor						
nein	1.00			1.00		
ja	6.556	2.976 – 14.444	<0.001	5.255	1.648 – 29.588	0.008
FIGO						
I	1.00			1.00		
II	1.462	0.449 – 4.764		1.403	0.378 – 5.210	
III	3.175	1.505 – 6.697		1.542	0.523 – 4.541	
IV	9.922	2.932 – 33.577	<0.001	6.983	1.648 – 29.588	0.008

^a adjustiert nach FIGO-Stadium und Resttumor

4.3 MDMX-Mutationsanalyse

MDMX (MDM4) ist neben MDM2 ein weiterer wichtiger negativer Regulator von p53. MDMX könnte somit auch eine Rolle bei der Tumorentstehung spielen, da es die Funktionen des Tumorsuppressors p53 inhibiert. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass MDMX in vielen Tumoren mit Wildtyp-p53 überexprimiert wird (Bartel *et al.*, 2005; Danovi *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2007; Laurie *et al.*, 2006; Riemenschneider *et al.*, 1999; Toledo und Wahl, 2006). Neuere Daten lassen vermuten, dass sogar kleinste Veränderungen des MDMX-Proteinniveaus in Mäusen zu messbaren Störungen der p53 Tumorsuppressorfunktion führen (Terzian *et al.*, 2007). Anhand dieser Beobachtungen kann angenommen werden, dass verschiedene genetische MDMX-Varianten existieren und dass diese möglicherweise die Tumorentstehung beeinflussen können.

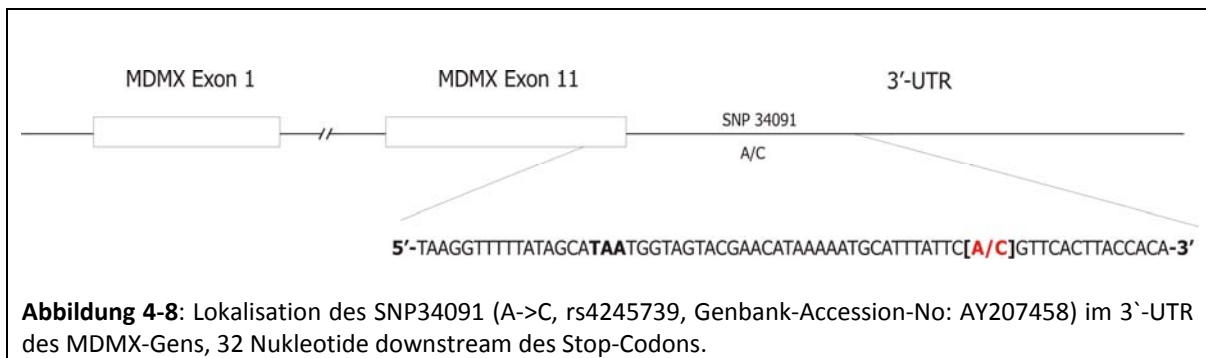
Um die Existenz möglicher somatischer Mutationen und/oder allelischer Varianten nachzuweisen, wurden alle 11 Exone des MDMX-Gens mit den flankierenden Regionen in 14 Tumorzelllinien sequenziert (MCF-7, HeLa, 8 Ovarialkarzinomzelllinien und 4 Sarkomzelllinien). Dabei konnten vier Sequenzvariationen detektiert werden. Bei all diesen Veränderungen handelt es sich um Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs), die bereits in der *NCBI SNP database* aufgeführt sind (siehe Tabelle 4-4). Die einzige Veränderung im codierenden Bereich des MDMX-Gens wurde in der Ovarialkarzinomzell-

Tabelle 4-4: Status von SNPs des MDMX-Gens in 8 Ovarialkarzinom-, 4 Sarkomzelllinien, MCF-7 und HeLa

Zelllinie	SNP			
	rs2290855 Intron 9	rs2290854 Intron 10	rs61754765 Exon11	rs4245739 3'-UTR
ES-2	T/T	G/G	C/C	A/A
Skov-3	T/T	G/G	C/C	A/A
OAW-42	T/T	G/G	C/C	A/A
OvCar	T/T	G/G	C/C	A/A
A2780	T/C	G/A	C/G	A/C
PA-1	T/C	G/A	C/C	A/C
Efo-27	C/C	A/A	C/C	C/C
Efo-21	C/C	A/A	C/C	C/C
13/95	C/C	A/A	C/C	C/C
6/93	T/T	G/G	C/C	A/A
7/99	T/T	G/G	C/C	A/A
8/93	T/T	G/G	C/C	A/A
MCF-7	T/C	G/A	C/C	A/C
HeLa	C/C	A/A	C/C	A/A

linie A2780 gefunden. Hier führt ein Nukleotidaustausch im Codon 388, lokalisiert im Exon 11, (CCC->GCC) zu einer Aminosäuresubstitution (Prolin->Alanin). Codon 388 liegt in der C-terminalen Region von MDMX, jedoch außerhalb von bekannten funktionellen Domänen.

Die anderen drei Polymorphismen sind im nicht codierenden Bereich des MDMX-Gens lokalisiert. Zwei dieser Sequenzvariationen liegen in Intronen, und die dritte ist im 3`-UTR an Position 34091 zu finden. Der SNP34091 liegt 32 Nukleotide „downstream“ vom Stop-Codon im 3`-UTR (siehe Abbildung 4-8). Von den 14 untersuchten Tumorzelllinien waren drei homozygot für den SNP34091 (C/C), drei heterozygot (A/C) und acht homozygot für das Wildtyp-Allel (A/A).

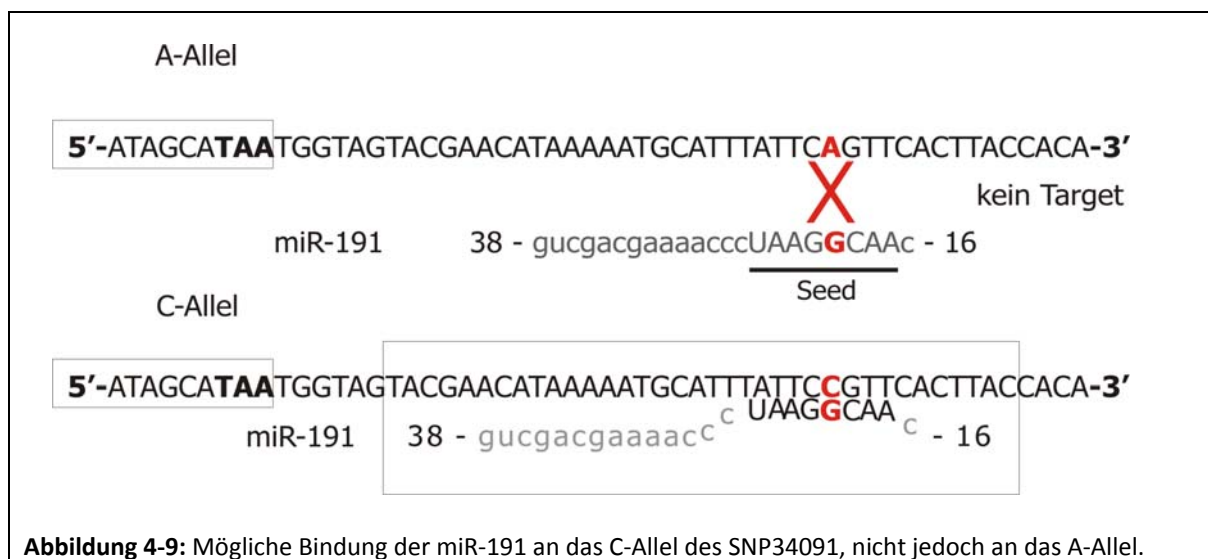


Da Exon 11 des MDMX-Gens die für die Funktion wichtige RING-Finger Domäne enthält, wurde dieser Bereich in 113 Ovarialkarzinompatientenproben sequenziert. Bei dieser Untersuchung konnten nur zwei missense-Mutationen und eine stille Mutation gefunden werden. Die missense-Mutation in Codon 421 (AGA -> GGA, Arg -> Gly) konnte in 3 Patientenproben nachgewiesen werden. Sowohl die stille Mutation in Codon 439 (TTA->TTG, Leu->Leu) als auch die missense-Mutation in Codon 458 (GTC->ATC, Val->Ile) traten im gleichen Patienten auf. Weiterhin wurde Exon 11 des MDMX-Gens auch in 79 Weichteilsarkompatientenproben sequenziert. Dabei lag in zwei Fällen eine missense-Mutation in Codon 374 (AAA->CAA, Lys->Gln) vor. Auf der Grundlage dieser Analysen kann vermutet werden, dass somatische Mutationen im MDMX-Gen in Ovarialkarzinomen und Weichteilsarkomen selten sind. Aber sowohl in dem Kollektiv der Ovarialkarzinome, als auch im Kollektiv der Weichteilsarkome konnte eine hohe Frequenz der Polymorphismen in Intron 9 (rs2290855) und 10 (rs2290854), sowie des Polymorphismus im 3`-UTR (rs4245739) gefunden werden. Im nächsten Schritt sollte nun

untersucht werden, ob die Sequenzvariation im 3'-UTR an Position 34091 eine mögliche biologische Funktion hat.

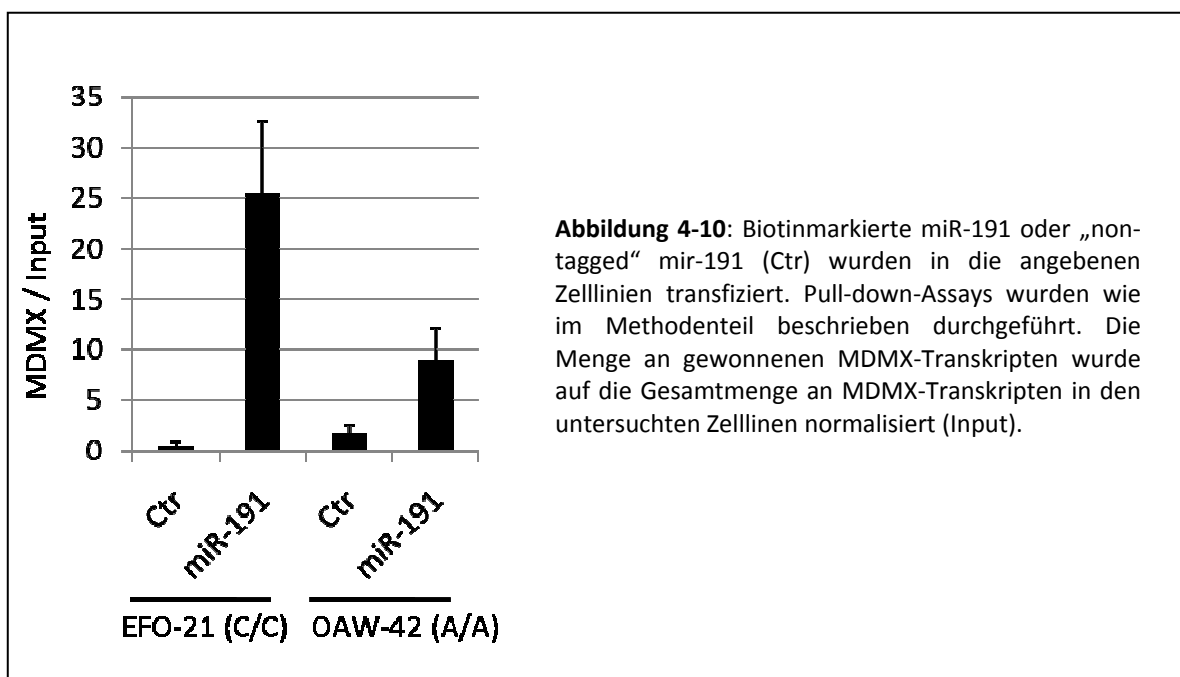
4.3.1 Hsa-microRNA-191 bindet bevorzugt an das MDMX-C-Transkript des SNP34091

Einzelnukleotidpolymorphismen, die im 3'-UTR vorliegen, können Bindung von microRNAs verändern und so die mRNA-Stabilität und/oder die Translationseffizienz beeinflussen (Chen *et al.*, 2008). Um mögliche microRNA-Bindestellen um den SNP34091 zu finden, wurden Algorithmen zur Vorhersage solcher Bindungsstellen genutzt. Dabei wurde durch TargetScan (Lewis *et al.*, 2003), miRanda (John *et al.*, 2004) und MicroInspector (Rusinov *et al.*, 2005) vorausgesagt, dass die hsa-miR-191 an die MDMX-mRNA binden kann (siehe Abbildung 4-9). Interessanterweise liegt der SNP34091 genau in der für die microRNA-Bindung kritischen „seed-Region“. Diese Region liegt an Nukleotid 2-8 vor dem 5'-Ende der microRNA. Da miRs die Tendenz haben vollständige Basenpaarungen mit der Ziel-mRNA in der seed-Region auszubilden, kann vermutet werden, dass die miR-191 ausschließlich oder stark bevorzugt an mRNA-Transkripte mit C-Allel bindet, nicht jedoch an Transkripte mit dem A-Allel.



Um diese Hypothese experimentell zu belegen, wurde in Kooperation mit den Arbeitsgruppen von Jean-Christophe Marine in Gent und Anders Lund in Kopenhagen eine direkte Affinitätsreinigung durchgeführt (Orom und Lund, 2007). Zellen mit A/A- oder C/C-Genotyp wurden mit Biotin-markierter miR-191 transfiziert. Die Zelllysate wurden mit Streptavidin-Sepharose-Beads inkubiert um die miR-RISC-mRNA-Komplexe zu binden. Die

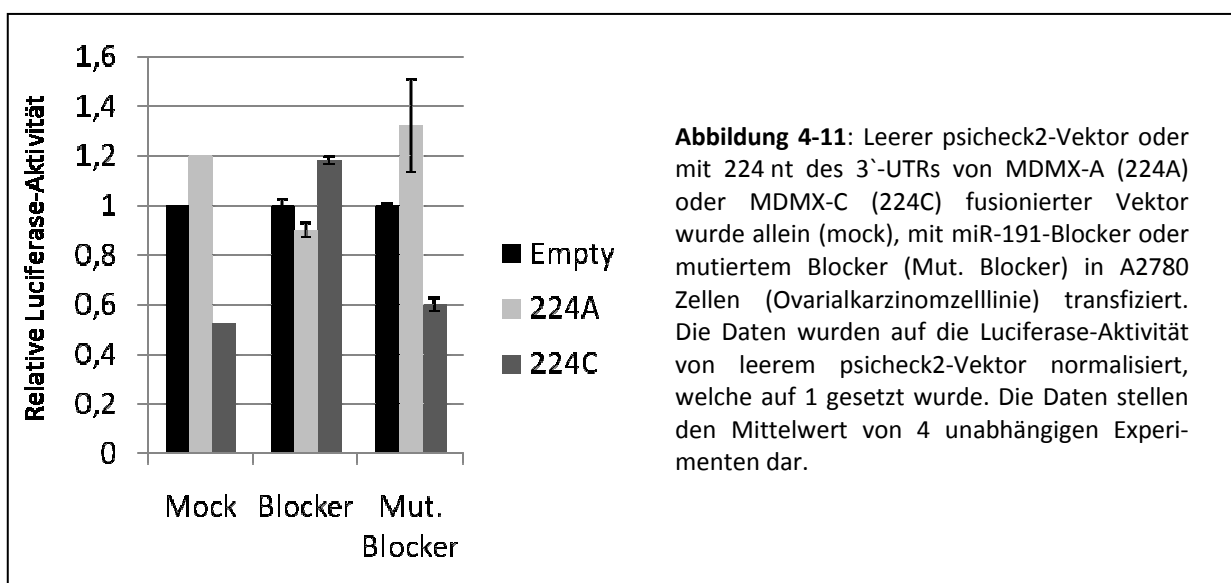
RNA wurde mittels Trizol-Reagenz isoliert und mit der gereinigten RNA wurden nach cDNA-Synthese quantitative real-time-PCRs durchgeführt. Diese zeigten eine spezifische Anreicherung des MDMX-Transkriptes in C/C-Zellen im Vergleich zu Zellen mit A/A-Genotyp. Die Daten wurden zusätzlich auf die endogenen Mengen an Gesamt-MDMX-Transkript normalisiert (siehe Abbildung 4-10). Nach der Transfektion der Zellen mit „non-tagged“ miR-191-Duplicates oder Biotin-markierter Kontroll-microRNA wurden nur geringe Mengen an MDMX-Transkript gewonnen. Diese Daten zeigen, dass miR-191 mit einer bedeutend höheren Affinität mit dem C-Allel als mit dem A-Allel des SNP34091 interagiert.



4.3.2 Unterschiedliche Regulation der MDMX-Allelvarianten durch miR-191

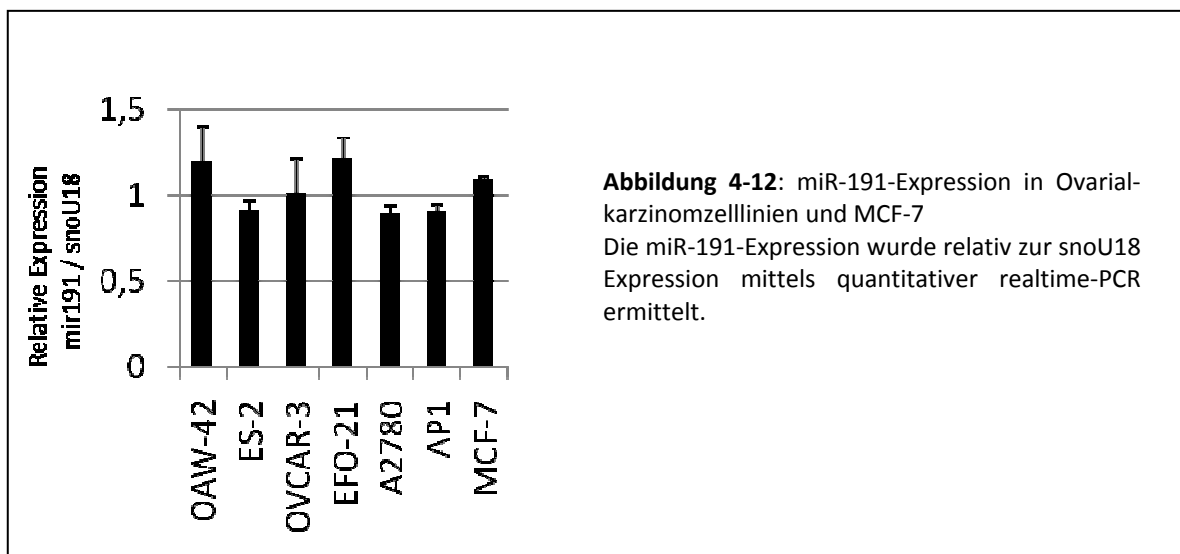
MicroRNAs, die an mRNAs binden, bewirken entweder eine Repression der Translation und/oder einen verstärkten Abbau der mRNAs (Bartel, 2004; Krutzfeldt *et al.*, 2005; Lim *et al.*, 2005). Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die A->C Veränderung einen Einfluss auf die Translationseffizienz und/oder die Stabilität der MDMX-mRNA hat. Um dies zu prüfen, wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Jean-Christophe Marine in Gent ein 224 bp großes Fragment mit Mittelpunkt um den SNP34091 von A/A- und C/C-Zellen in einen Luciferase-Reporter-Vektor (psi-check2) kloniert. Diese Reporterkonstrukte (224A und 224C) wurden in Zelllinien (293T, HCT116, A2780) mit hohem endogenem Level an miR-191 transfiziert. In all diesen Zelllinien wurde eine

signifikant hohe Reduktion des psicheck-MDMX-C Signals auf ~40-60 % des Signals von psicheck-MDMX-A beobachtet (siehe Abbildung 4-11). Dabei ist wichtig zu erwähnen, dass sich die Signale von psicheck-MDMX-A und unmodifiziertem psicheck-Vektor kaum unterscheiden. Diese Daten zeigen, dass die C-Variante des SNP34091 die Translationseffizienz der MDMX-mRNA durch die Entstehung einer neuen microRNA-Bindestelle senkt. Um diese Hypothese weiter zu stützen, wurden Zellen mit „target-site“-Blockern transfiziert. „Target-site“-Blocker sind 18-20 nt lange Oligonukleotide, welche designt wurden, um spezifisch an microRNA-Bindestellen im 3`-UTR zu binden. Diese Blocker wurden als vollständig phosphorothioilierte DNA/LNAMere synthetisiert, um die Affinität und Selektivität für das Target zu erhöhen und eine RNase-H Erkennung und Spaltung zu verhindern. Der verwendete Blocker (18 nt) bindet selektiv und überlappend an die miR-191 Bindestelle im 3`-UTR der MDMX-mRNA. Dieser Blocker bindet nicht signifikant an einen anderen humanen 3`-UTR, außer an den von MDMX. Zusätzlich wurde ein Kontroll-Blocker (mut. Blocker) synthetisiert, welcher keine signifikanten Bindungen mit dem 3`-UTR von MDMX oder einem anderen humanen 3`-UTR eingeht. Auch bei diesem Experiment bestätigte sich die bisherige Hypothese, dass die C-Variante des SNP34091 die Translationseffizienz der MDMX-mRNA durch die Entstehung einer microRNA-Bindestelle senkt. Die Transfektion des miR-191-„target-site“-Blockers, aber nicht des mutierten Blockers, hoben die Reduktion des psicheck-MDMX-C Luciferasesignals dosisabhängig auf (siehe Abbildung 4-11).



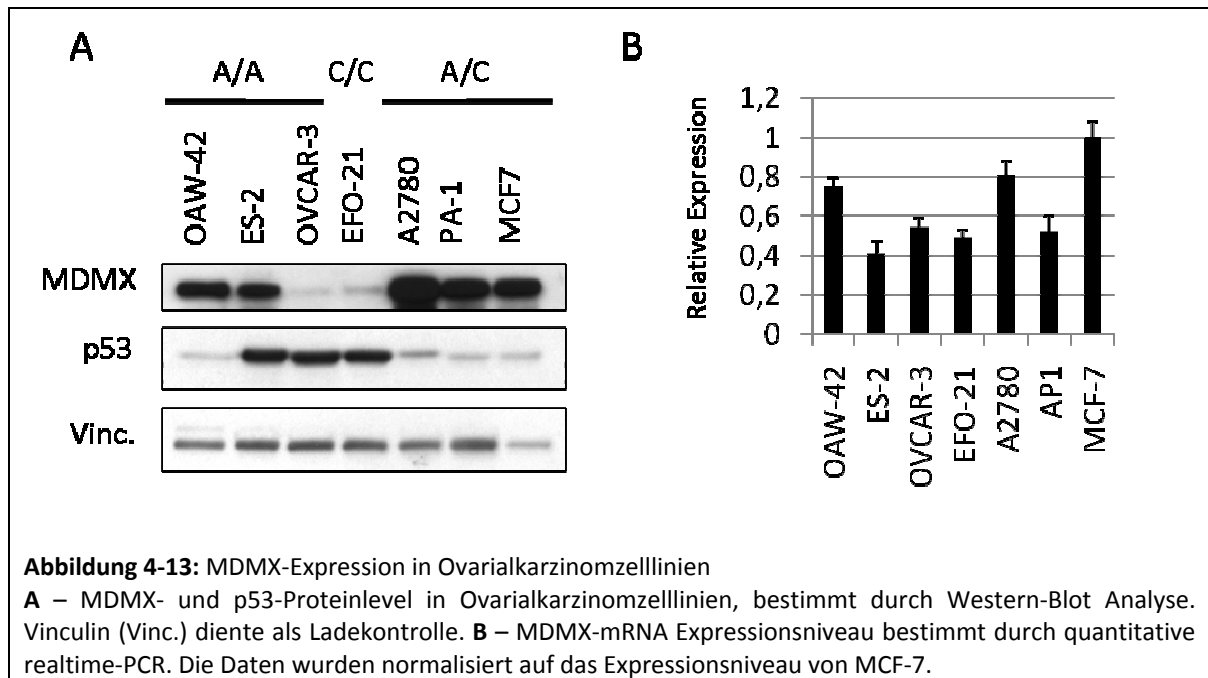
4.3.3 Expressionsniveau von MDMX-A und MDMX-C-mRNA und miR-191 in Ovarialkarzinomzelllinien und Primärtumoren

Im Vorfeld dieser Untersuchungen wurde gezeigt, dass die miR-191 in einer Vielzahl von Tumoren und Normalgeweben hoch exprimiert wird (Peltier und Latham, 2008). Es wurde sogar vorgeschlagen, dass die miR-191 aufgrund ihres Expressionsmusters eine bessere Referenz-microRNA wäre als die bisher genutzten Referenz-RNAs 5S-rRNA und U6-snRNA. Wir konnten bestätigen, dass miR-191 stabil und auf hohem Niveau in einer Reihe von Ovarialkarzinomzelllinien exprimiert wird (siehe Abbildung 4-12). Die miR-191 Expressionslevel wurden auch in 61 Ovarialkarzinomproben untersucht. Dabei lag das mittlere Expressionsniveau der miR-191 bei 1,41 im Verhältnis zur snoU18-Expression. Es konnte kein Unterschied in der miR-191 Expression in Tumoren mit A/A- und A/C- + C/C- Genotyp nachgewiesen werden (A/A: 1,38; A/C+C/C: 1,47 $p=0,79$, Student's t-Test). Weiterhin unterscheidet sich die miR-191-Expression nicht in low-grade und high-grade Karzinomen ($p=0,411$; Student's t-Test). Es war auch keine Korrelation zwischen miR-191 Expression und ER-Expressionsstatus nachweisbar.

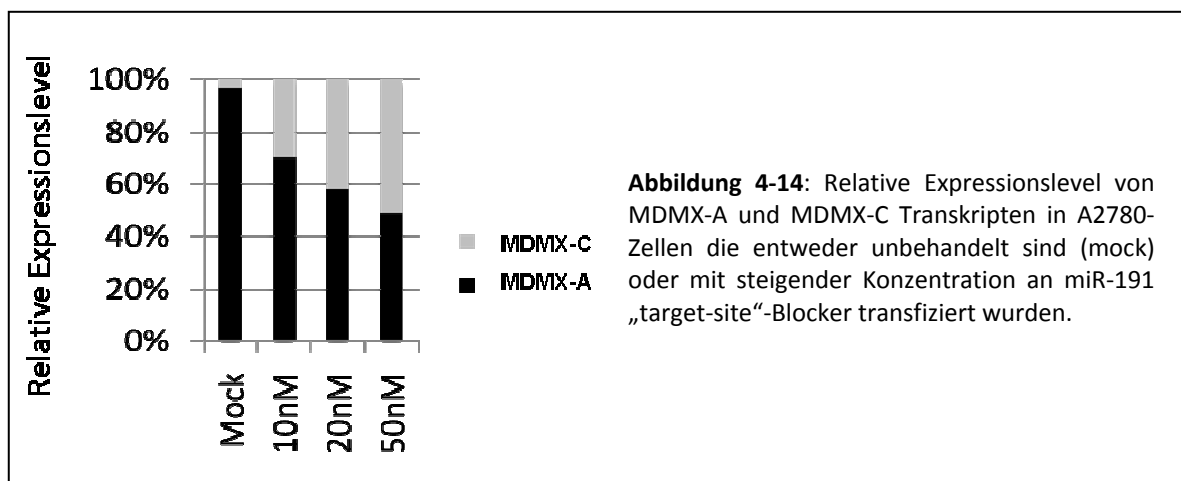


Wenn das C-Allel des SNP34091 eine miR-191 vermittelte Herunterregulation der MDMX-Expression bewirken kann, dann sollten C/C-Zellen und Tumoren eine reduzierte MDMX-Proteinexpression zeigen. Tatsächlich konnte das MDMX-Protein in fast allen untersuchten A/A-Zellen (z.B. OAW-42) deutlich nachgewiesen werden, während in C/C-Zellen (z.B. EFO-21) die MDMX-Expression sehr niedrig ist (siehe Abbildung 4-13 A). Im

Gegensatz dazu ist das *MDMX*-mRNA-Niveau in allen untersuchten Ovarialkarzinomzelllinien vergleichbar (siehe Abbildung 4-13 B).



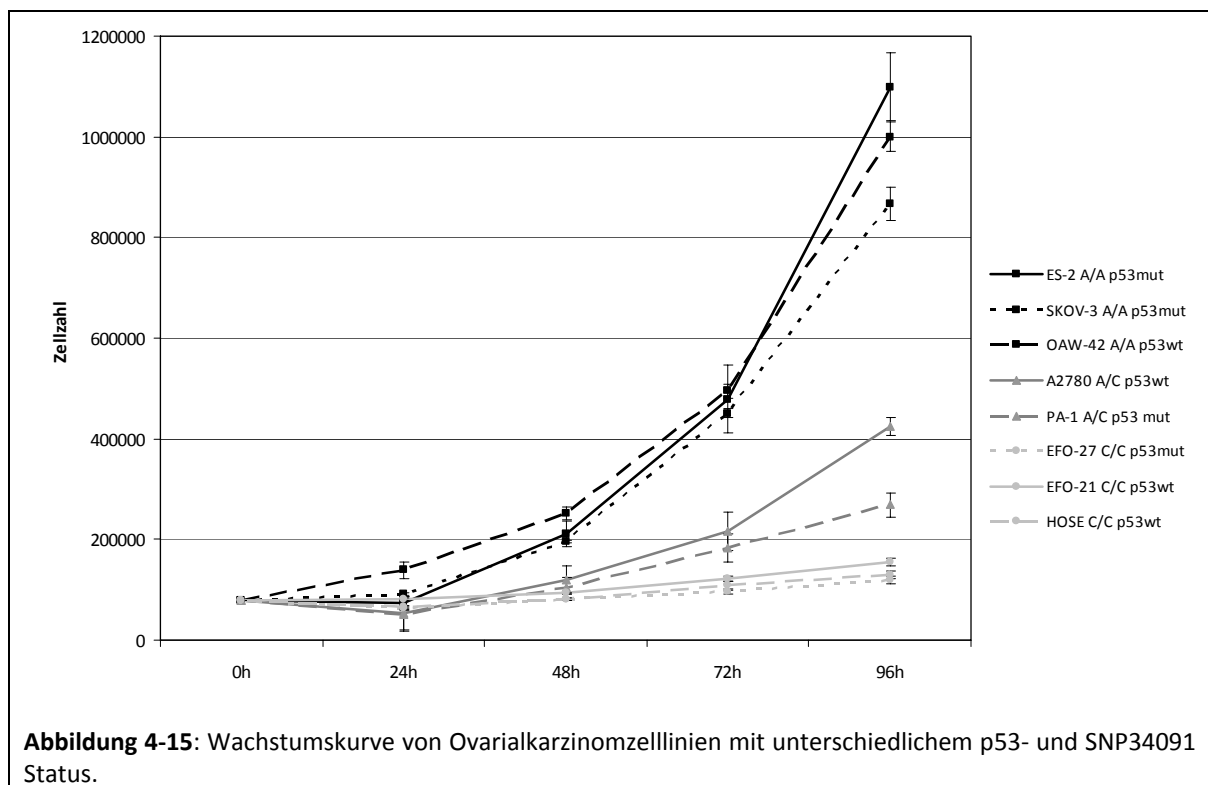
Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob sich die Menge an MDMX-Transkripten mit A-Allel bzw. C-Allel in A/C-Zellen (z.B. A2780) tatsächlich unterscheiden. Dafür wurde eine q-RT-PCR basierte Methode genutzt. Interessanterweise war das C-Transkript in allen untersuchten Zelllinien (3/3) fast nicht nachweisbar (siehe Abbildung 4-14). Dies lässt die Vermutung zu, dass in Zellen mit A/C-Genotyp die Expression des MDMX-A-Transkripts über einen unbekanntem Mechanismus erhöht wird, um die spezifische Reduktion des MDMX-C-Transkriptes auszugleichen. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass Zellen mit einem hohem MDMX-Expressionniveau einen Wachstumsvorteil haben, zumindest bei einem Wildtyp-p53 Hintergrund. Um dies zu bestätigen, wurden steigende Mengen



des miR-191 „target-site“-Blockers in A2780 Zellen transfiziert und die Menge an A- und C-Transkript erneut bestimmt. Dabei stieg die Menge an C-Transkript dosisabhängig bis auf das Niveau des A-Transkriptes an (siehe Abbildung 4-14). Zusammengenommen bestätigen die Daten die Vermutung, dass die hsa-miR-191 in A/C-Zellen selektiv das MDMX-C-Transkript für den Abbau markiert.

4.3.4 Wachstum von Ovarialkarzinomzelllinien im Zusammenhang mit dem SNP34091

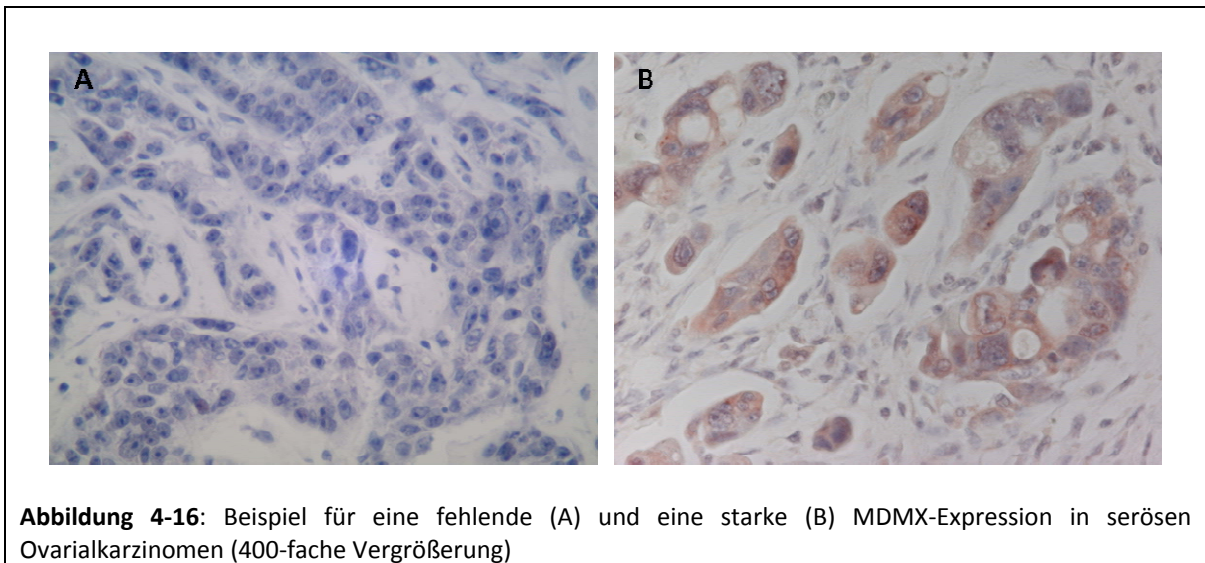
In Abbildung 4-15 ist deutlich zu erkennen, dass die Ovarialkarzinomzelllinien mit A/A-Genotyp deutlich schneller wachsen als die Zelllinien mit A/C- oder C/C-Genotyp. Dieser Effekt ist unabhängig vom p53-Mutationsstatus. Anhand dieser Daten sollte nun in Ovarialkarzinomen untersucht werden, ob Tumoren mit A/A- oder A/C+C/C-Genotyp ein unterschiedliches Wachstumsverhalten, Aggressivität oder Ansprechen auf Chemotherapeutika zeigen.



4.3.5 MDMX-Expression in Ovarialkarzinomen in Korrelation mit dem SNP34091

Die MDMX-Proteinexpression wurde an 66 primären Ovarialkarzinomen mittels Immunhistochemie (IHC) an Tissue Microarrays untersucht. In 48 % (31/66) der Fälle konnten keine MDMX-Proteinexpression nachgewiesen werden, in 14 % (10/66) eine

moderate und 38 % (25/66) eine hohe Expression (siehe Abbildung 4-16). Die MDMX-mRNA Expression wurde in dem Kollektiv der Ovarialkarzinome mittels quantitativer real-time-PCR ermittelt. Der A/A-Genotyp des SNP34091 korreliert mit einer erhöhten MDMX-mRNA Expression ($p=0,029$; exakter Test nach Fischer, siehe Abbildung 4-17B) und mit einem erhöhten MDMX-Proteinniveau ($p=0,079$; exakter Test nach Fischer). Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass der SNP34091 die Stabilität und/oder Translationseffizienz der MDMX-mRNA beeinflusst.

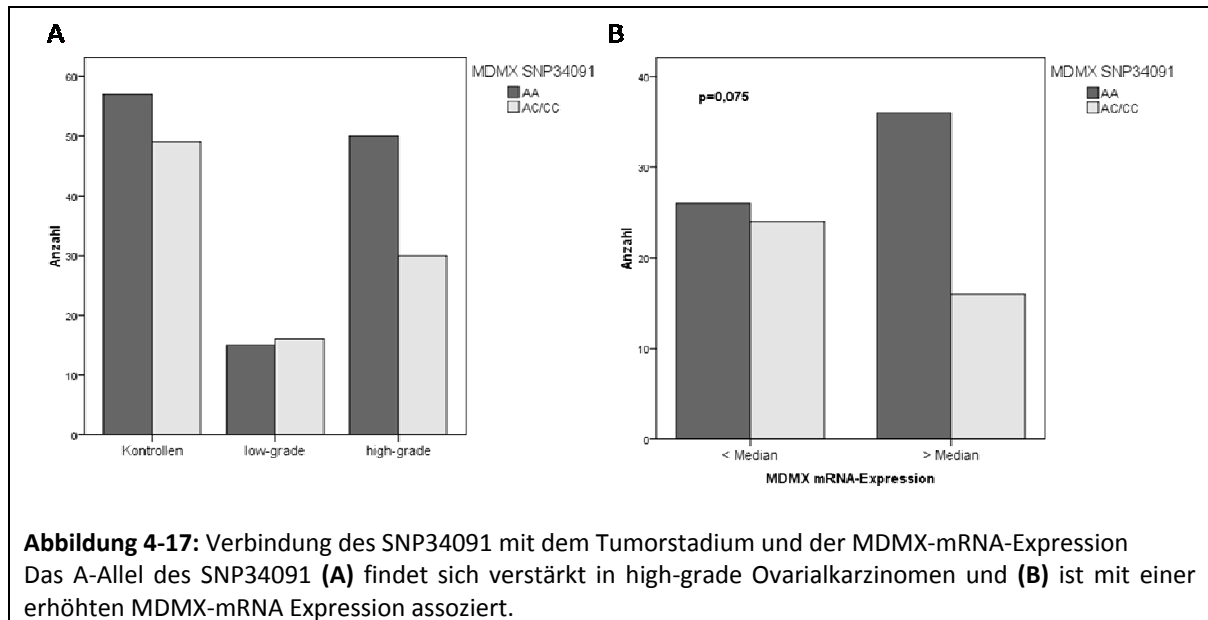


Es ist auch erwähnenswert, dass der A/A-Genotyp sowohl mit einer Überexpression von Wildtyp-p53 als auch mit mutiertem p53-Gen korreliert ($p=0,001$; exakter Test nach Fischer). Weiterhin findet sich eine signifikante Korrelation des A/A-Status mit dem T/T-Status (Wildtyp) des SNP309 im MDM2-Gen ($p=0,011$).

4.3.6 SNP34091-Status und Einfluss auf das Gesamtüberleben und krankheitsfreies Überleben von Ovarialkarzinompatientinnen

Der Status des SNP34091 wurde in 118 Ovarialkarzinompatientenproben bestimmt. Die Verteilung der Genotypen war zwischen Ovarialkarzinompatientinnen (A/A: 55,8 %; A/C+C/C: 44,2 %) und gesunden Freiwilligen mit einer passender Altersverteilung (A/A: 53,8 %; A/C+C/C: 46,2 %) vergleichbar. Der prozentuale Anteil an Fällen mit Wildtyp A/A-Genotyp ist in high-grade Karzinomen etwas höher (62,5 %) als in low-grade Karzinomen (48,4 %). Dieser Unterschied ist statistisch jedoch nicht signifikant ($p=0,176$; χ^2 -Test) (siehe Abbildung 4-17). Patientinnen mit A/A-Genotyp zeigten im Vergleich zu

Patientinnen, die heterozygot (A/C) oder homozygot (C/C) für den SNP34091 sind, ein reduziertes Gesamtüberleben (A/A: 54 Monate, A/C+C/C: 67 Monate). Dieser Unterschied erreicht jedoch nicht die statistische Signifikanz ($p=0,063$; log-Rank-Test).

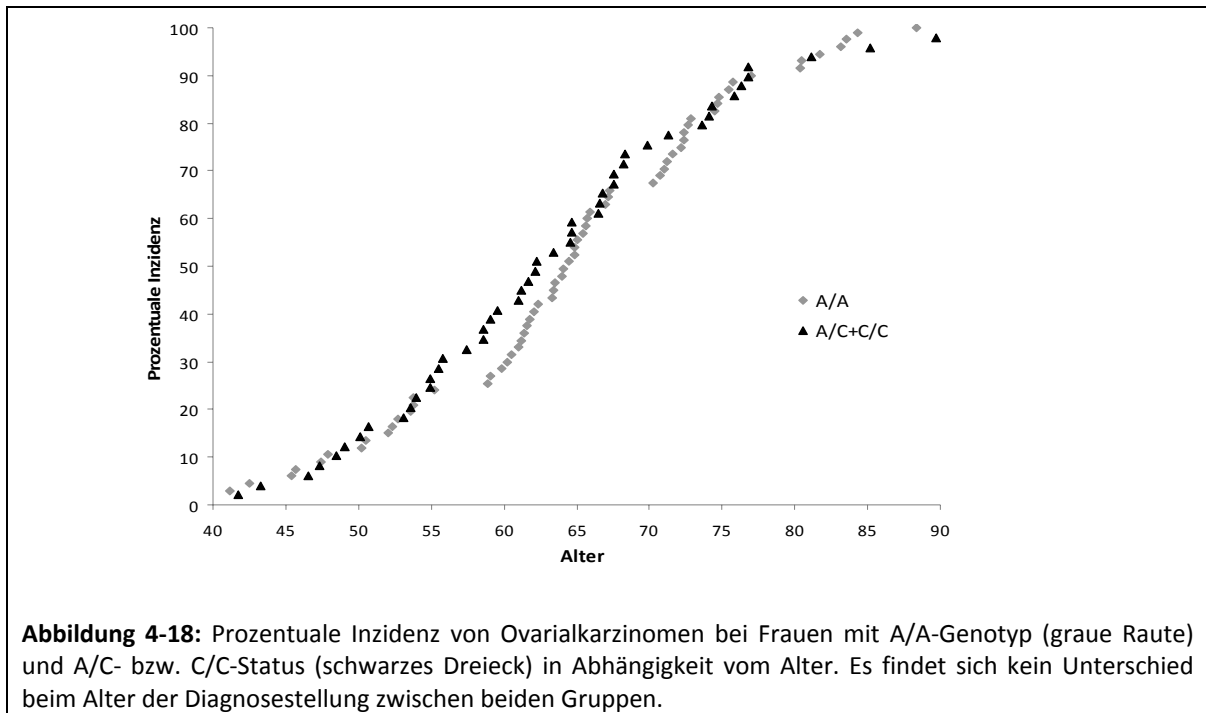


Weiterführend wurde auch untersucht, ob das Auftreten des C-Allels mit dem Alter der Frau bei Diagnosestellung des Tumors korreliert ist. Wie in Abbildung 4-18 zu sehen, zeigte sich dabei kein Unterschied im Alter der Diagnosestellung zwischen Frauen mit A/A-Genotyp und Frauen mit A/C- bzw. C/C-Status. Das durchschnittliche Alter bei Diagnosestellung von Frauen mit A/A-Genotyp lag bei 64,7 Jahren, das von Frauen mit C-Allel bei 64,2 Jahren.

4.3.7 Abhängigkeit des Überlebens vom SNP34091-Status und der Östrogenrezeptor-expression

Wie bereits in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, gibt es einen Einfluss des SNP309 im MDM2-Gen auf das Überleben von Ovarialkarzinompatientinnen in Abhängigkeit vom Östrogenrezeptorstatus (ER-Status) (Bartel *et al.*, 2008). Die gleichen Beobachtungen konnten nach statistischer Auswertung gemacht werden, wenn die Interaktion des SNP34091 und der ER-Status als Kovarianten betrachtet wurden. Die mediane Überlebenszeit für Patientinnen ohne ER-Expression und A/A-Genotyp beträgt 52 Monate gegenüber 82 Monaten für ER-negative Patientinnen mit wenigstens einem C-Allel

($p=0,042$; log-Rank-Test). Im Gegensatz dazu war die Gesamtüberlebenszeit für Patientinnen mit ER-Expression vergleichbar ($p=0,89$; log-Rank-Test). Eine multivariate



Cox-Regressionsanalyse, adjustiert nach der Resttumorgröße der ergab, dass der A/A-Genotyp signifikant mit einem 5,5-fach erhöhten Risiko, am Tumor zu versterben, bei Patientinnen mit ER-negativen Tumoren ($p=0,01$) nicht aber bei Patientinnen mit ER-positiven Tumoren korreliert ist (relatives Risiko: 1,23; $p=0,636$; siehe Abbildung 4-19 und Tabelle 4-5).

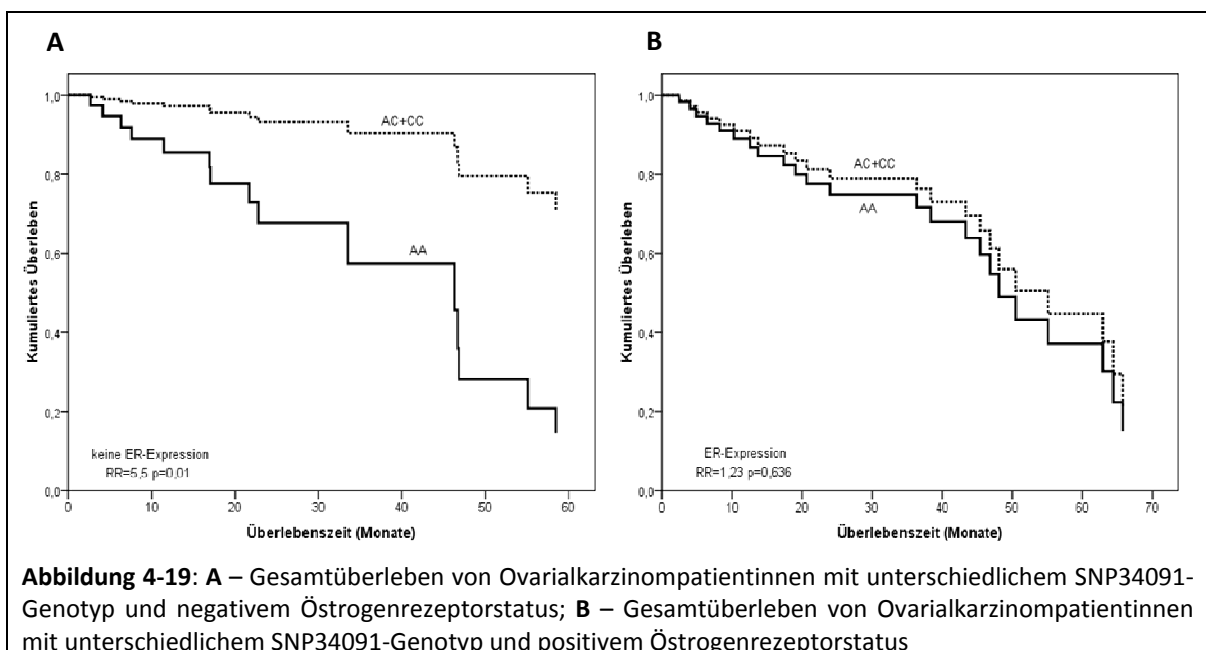


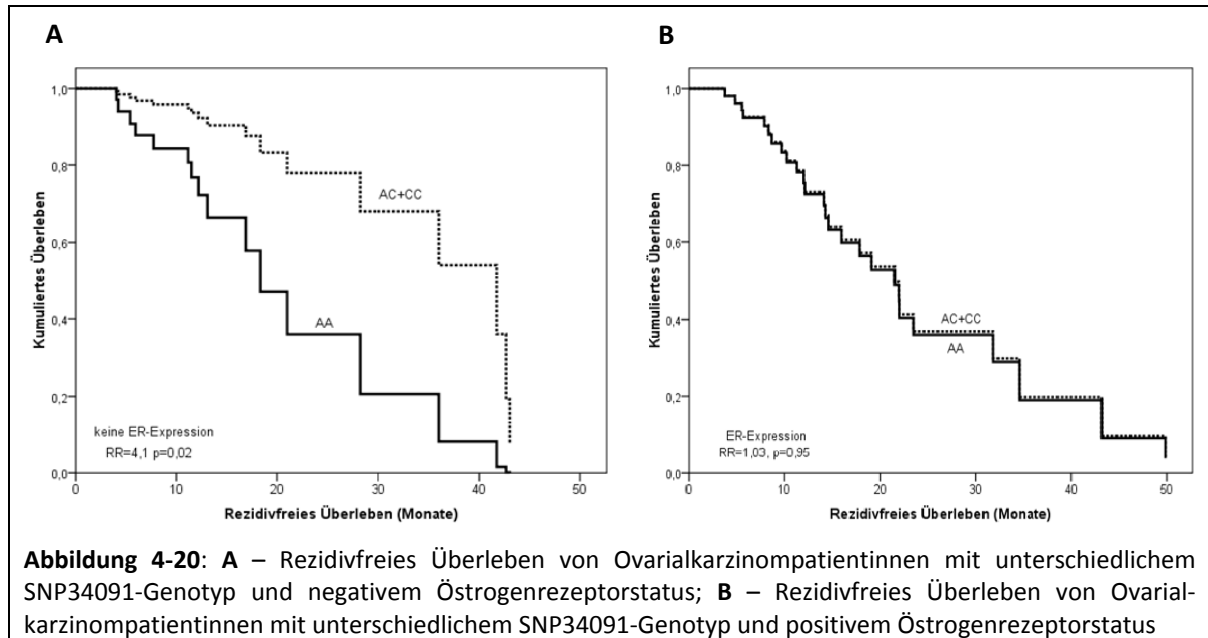
Tabelle 4-5: Durch multivariate Cox-Regression ermittelte Signifikanz der molekularen und klinischen Faktoren

Variablen	univariate Analyse			multivariate Analyse		
	nicht-adjustiert RR	95% Konfidenz- interwall	p	adjustiert RR	95% Konfidenz- interwall	p
SNP34091						
alle Patienten ^a						
A/A	1.774	0.969 – 3.247	0.063	2.401	1.111 – 4.325	0.024
A/C+C/C	1.00			1.00		
ER negativ ^a						
A/A	3.751	1.368 – 10.29	0.008	5.53	1.495 – 20.48	0.01
A/C+C/C	1.00			1.00		
ER positiv ^a						
A/A	0.917	0.427 – 1.967	0.823	1.229	0.524 – 2.885	0.636
A/C+C/C	1.00			1.00		
Histologie ^a						
serös	1.00			1.00		
nicht-serös	1.854	0.983 – 3.499		1.346	0.635 – 2.850	
undifferenziert	3.541	1.251 – 10.026	0.039	1.608	0.425 – 6.082	0.685
Aszites ^a						
nein	1.00			1.00		
ja	3.66	1.39– 9.61	0.008	1.715	0.709 – 4.144	0.231
Rezidiv ^a						
nein	1.00			1.00		
ja	20.04	2.74 – 145.82	0.003	10.86	1.4 – 84.235	0.022
Resttumor ^b						
nein	1.00			1.00		
ja	6.736	3.06 – 14.83	<0.001	5.351	2.05 – 13.967	0.001
FIGO						
I	1.00			1.00		
II	1.335	0.409 – 4.35		1.337	0.362 – 4.938	
III	3.257	1.548 – 6.851		1.534	0.521 – 4.517	
IV	9.066	2.674 – 30.741	0.001	6.081	2.05 – 13.967	<0.001

^a adjustiert nach Resttumor, ^b adjustiert nach FIGO-Stadium

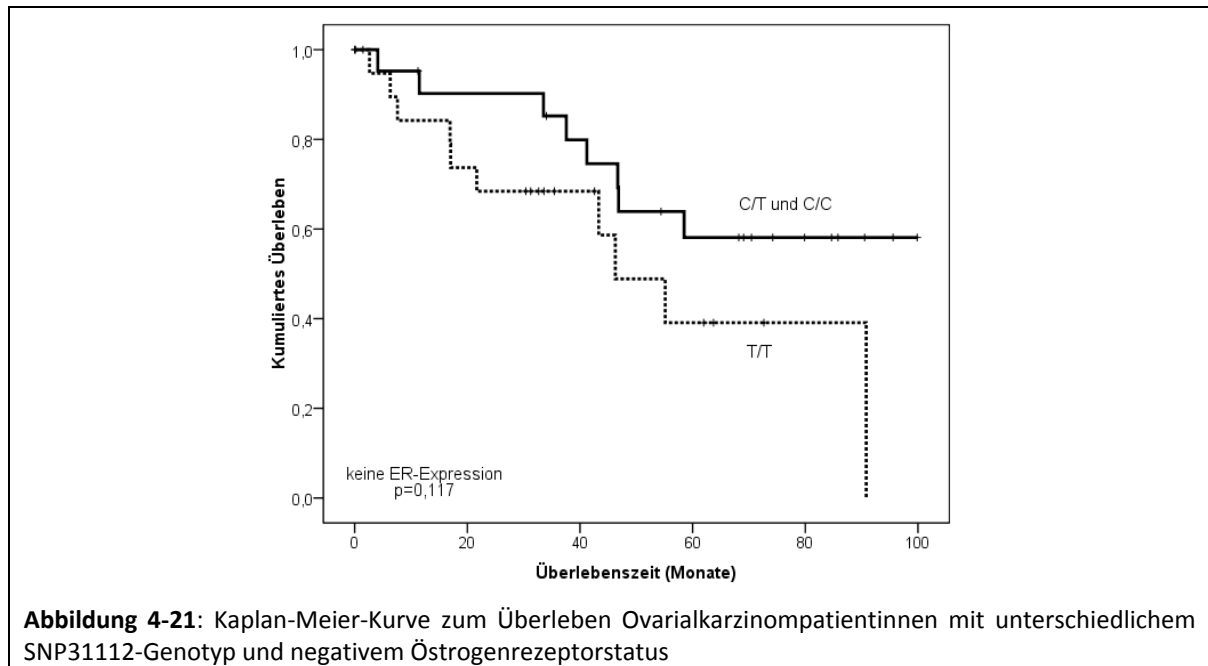
Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob es eine Verbindung zwischen dem SNP34091 und einem Fortschreiten der Erkrankungen unter Chemotherapie gibt. Bei Patientinnen mit A/A-Genotyp war die Zeit bis zum Wiederauftreten des Tumors gegenüber Patientinnen mit A/C- bzw. C/C-Genotyp leicht verkürzt, auch wenn dieser Unterschied nicht signifikant war (A/C+C/C: 40,4 Monate, A/A: 24,7 Monate; p=0,181). Wenn die Patientinnen jedoch nach ihrem ER-Status unterteilt wurden, korrelierte der A/A-Genotyp von Frauen mit ER-negativen Tumoren mit einer deutlich reduzierten rezidivfreien Überlebenszeit (A/A: 18,7 Monate, A/C+C/C: 50,6 Monate; p=0,012; log-Rank-Test). In der multivariaten Cox-Regressionsanalyse hatten diese Frauen ein 4,1-fach erhöhtes Risiko, an einem Rezidiv zu erkranken (p=0,02). Diese Unterschiede traten nicht bei Patientinnen mit ER-positiven Tumoren auf (A/A: 25,2 Monate, A/C+C/C: 22,7 Monate; p=0,419; log-

Rank-Test). Für Frauen mit A/A-Genotyp und ER-positiven Tumoren ist das Risiko, an einem Rezidiv zu erkranken, nicht erhöht (relatives Risiko: 1,03; $p=0,95$; siehe Abbildung 4-20).



4.4 Rolle des SNP31112 im Intron 9 des MDMX-Gens bei Ovarialkarzinompatientinnen

Bei der Mutationsanalyse des MDMX-Gens wurden neben des Polymorphismus im 3'-UTR zwei weitere Sequenzvariationen identifiziert, eine davon in Intron 9 an Position 31112 (T>C, rs2290855). Bei der Untersuchung der Zelllinien wurde deutlich, dass das C-Allel dieser Sequenzvariation (mit Ausnahme der Zelllinie HeLa), mit dem C-Allel des SNP34091 korreliert ist (siehe Tabelle 4-4). Die Verteilung der Genotypen war vergleichbar zwischen Ovarialkarzinompatientinnen (T/T: 50,5 %; T/C+C/C: 49,5 %) und gesunden Freiwilligen mit einer passender Altersverteilung (T/T: 50,9 %; T/C+C/C: 49,1 %). Bei der Untersuchung der Ovarialkarzinome fand sich weiterhin eine Korrelation zwischen dem Polymorphismus, dem ER-Status und der Prognose der Frauen. Patientinnen mit ER-negativen Tumoren und C-Allel hatten ein besseres Überleben im Vergleich zu Patientinnen mit T-Allel ($p=0,117$; siehe Abbildung 4-21). In der Gruppe der ER-positiven Tumoren zeigte sich kein Unterschied im Überleben der Patientinnen, wenn der SNP31112 betrachtet wurde ($p=0,827$). Patientinnen mit homozygotem T-Status wiesen keinen Unterschied im Alter der Diagnosestellung bei ER-positiven (63,7 Jahre) und ER-negativen (64,8 Jahre) Tumoren auf. Ovarialkarzinompatientinnen mit C-Allel zeigten hin-

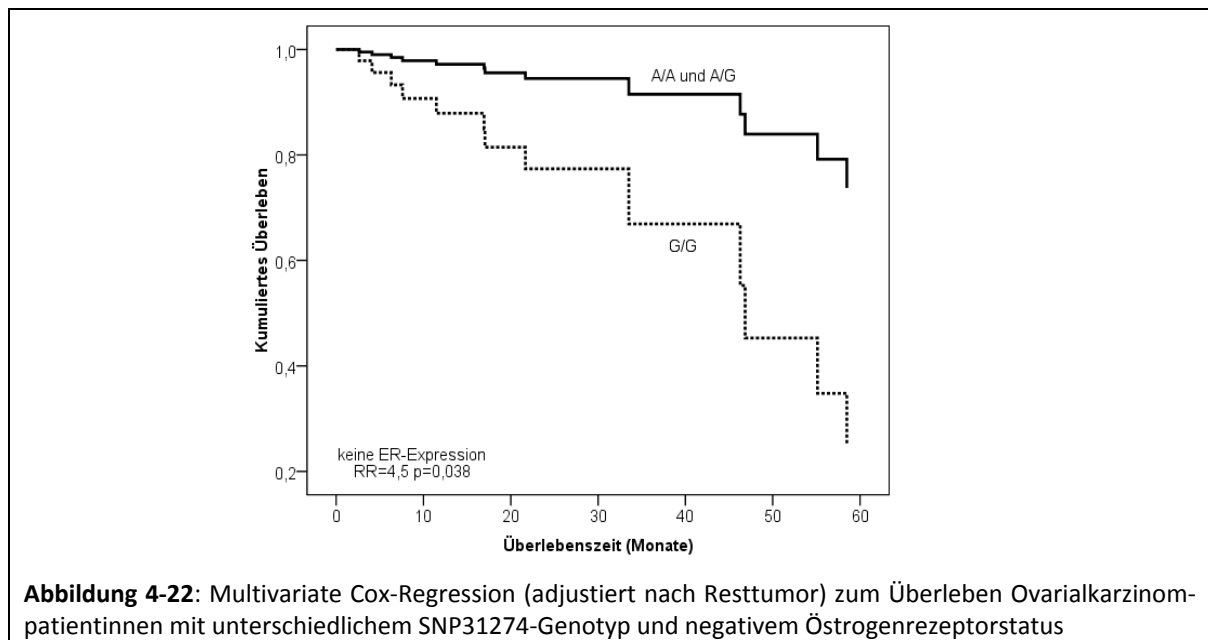


gegen einen Unterschied im Alter der Diagnosestellung des Tumors. Wenn das C-Allel vorhanden ist (C/T oder C/C), wurde das Ovarialkarziom bei Patientinnen mit ER-negativen Tumoren im Alter von durchschnittlich 60,3 Jahren diagnostiziert, bei ER-positiven Tumoren jedoch erst mit 69,1 Jahren ($p=0,003$).

4.5 Rolle des SNP31274 im Intron 10 des MDMX-Gens bei Ovarialkarzinompatientinnen

Neben den zwei bereits beschriebenen Polymorphismen im Intron 9 und im 3'-UTR wurde ein dritter Polymorphismus im Intron 10 des MDMX-Gens an Position 31274 (G>A, rs2290854) untersucht. Auch hier korreliert das Auftreten des selteneren A-Allels mit dem C-Allel der Polymorphismen im Intron 9 (SNP31112) und im 3'-UTR (SNP34091). Die Verteilung der Genotypen war vergleichbar zwischen Ovarialkarzinompatientinnen (G/G: 56,5 %; G/A+A/A: 43,5 %) und gesunden Freiwilligen mit einer passender Altersverteilung (G/G: 61,8 %; G/A+A/A: 38,2 %). Ovarialkarzinompatientinnen mit ER-negativen Tumoren und A-Allel haben der Kaplan-Meier-Analyse zufolge eine mittlere Überlebenszeit von 77 Monaten, während Patientinnen mit homozygotem G-Status nur eine mittlere Überlebenszeit von 52 Monaten aufweisen ($p=0,048$). In der multivariaten Cox-Regressionsanalyse, adjustiert nach Resttumor, zeigen diese Patientinnen ein 4,5-fach erhöhtes Risiko am Tumor zu versterben ($p=0,038$; siehe Abbildung 4-22). In der Gruppe der ER-positiven Ovarialkarzinome findet sich dieser Unterschied nicht. In der Kaplan-

Meier-Analyse beträgt in dieser Patientengruppe die mittlere Überlebenszeit für Frauen mit A-Allel 58 Monate, verglichen mit 47 Monaten für Patientinnen mit homozygotem G-Allel ($p=0,885$). Wie auch beim SNP31112 zeigt sich ein Unterschied im Alter bei Diagnosestellung bei Patientinnen mit A-Allel. Frauen mit ER-negativen Tumoren und A-Allel haben ein mittleres Alter bei Diagnosestellung von 59,2 Jahren, während bei Frauen

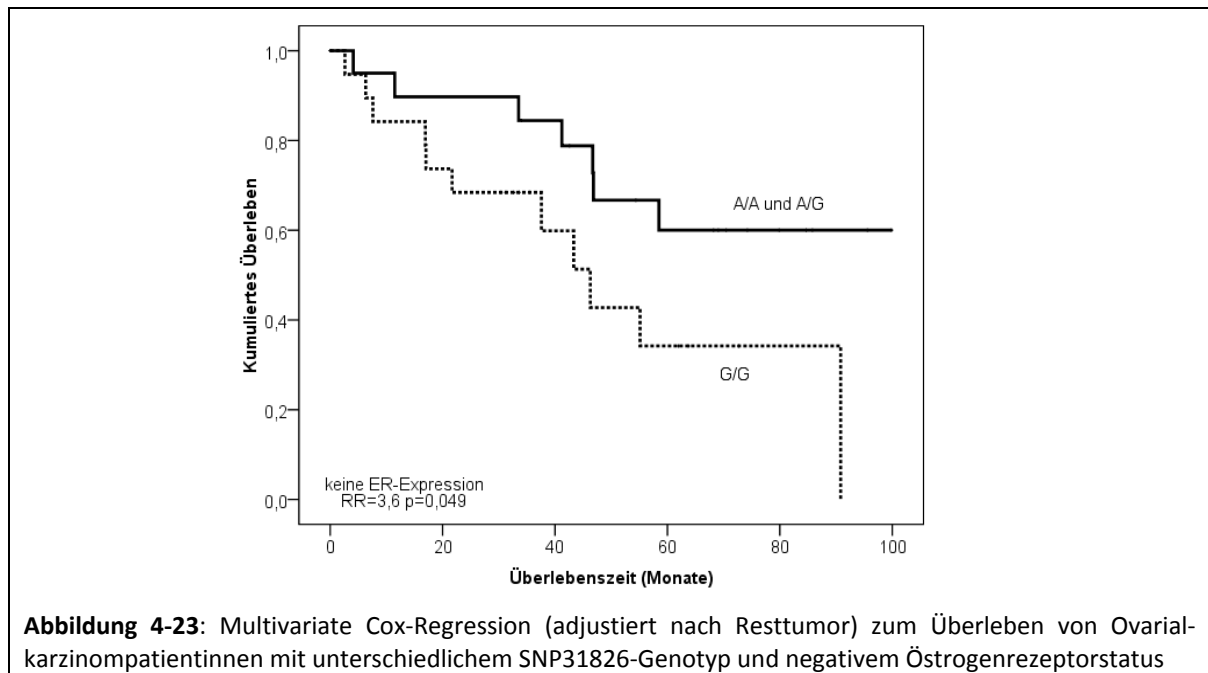


mit ER-positiven Tumoren und A-Allel die Diagnose durchschnittlich erst mit 68,7 Jahren erfolgt ($p=0,003$). Bei Patientinnen mit homozygotem G-Allel findet sich dieser Unterschied nicht (ER-negativ: 65,2 Jahre; ER-positiv: 63,4 Jahre).

4.6 Rolle des SNP31826 im Intron 10 des MDMX-Gens bei Ovarialkarzinompatientinnen

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Gareth Bond (Oxford University) wurde ein weiterer Polymorphismus hinsichtlich seiner Häufigkeit und Prognosekorrelation untersucht ($G>A$, rs1563828). Dieser befindet sich an Position 31826 im Intron 10 des MDMX-Gens. Dieser wurde während der Sequenzierung der 11 Exone des Gens nicht mit erfasst. Die Primer für die Untersuchung des Status des Polymorphismus wurden uns freundlicherweise durch Gareth Bond zur Verfügung gestellt. Die Verteilung der Genotypen war vergleichbar zwischen Ovarialkarzinompatientinnen (G/G: 51,4 %; G/A+A/A: 48,6 %) und gesunden Freiwilligen mit einer passender Altersverteilung (G/G: 47,7 %; G/A+A/A: 52,3 %). Patientinnen mit dem A-Allel und ER-negativen Tumoren zeigen in der Kaplan-Meier-Analyse ein deutlich besseres Überleben ($p=0,051$) als Frauen

mit homozygotem G-Status. In der multivariaten Cox-Regressionsanalyse (siehe Abbildung 4-23) weisen diese Patientinnen, mit G/G-Verteilung, ein 3,6-fach erhöhtes Risiko auf, am Tumor zu versterben ($p=0,049$). In der Gruppe der ER-positiven Tumoren zeigt sich dieser Unterschied nicht ($p=0,990$). Weiterführend wurde auch untersucht, ob das A-Allel einen



Einfluss auf das Alter der Frau bei Diagnosestellung des Tumors hat. Interessanterweise fand sich hier nur ein Unterschied, wenn die beiden homozygoten Allelverteilungen verglichen werden (siehe Abbildung 4-24). Die heterozygoten Fälle mit A/G-Status laufen anfänglich zwischen den beiden homozygoten Kurven, nähern sich aber mit zunehmendem Alter mehr der Kurve der homozygoten G/G-Fälle an. Bei Patientinnen mit G/G-Status wird der Tumor durchschnittlich mit 64,7 Jahren diagnostiziert, während bei Patientinnen mit dem selteneren A/A-Status der Tumor im Mittel bereits mit 59,1 Jahren festgestellt wird ($p=0,087$, Mann-Whitney-Test). Damit wird der Tumor bei Frauen mit A/A-Status durchschnittlich 5,6 Jahre früher diagnostiziert. Zeigt der Tumor dieser Frauen dann keine ER-Expression, so haben diese Patientinnen eine verlängerte Überlebenszeit.

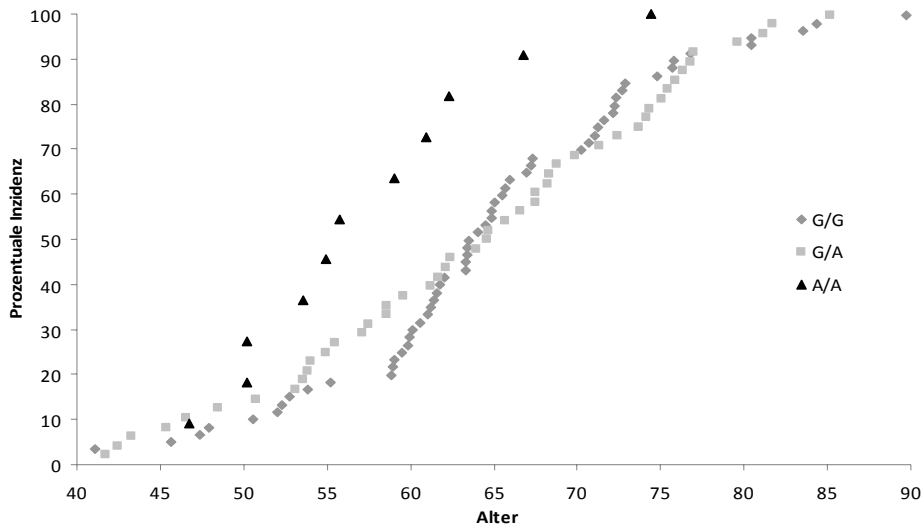


Abbildung 4-24: Prozentuale Inzidenz von Ovarialkarzinomen bei Frauen mit unterschiedlichen Genotyp des SNP31826 in Abhängigkeit vom Alter. Bei Frauen mit A/A-Status wird der Tumor durchschnittlich 5,6 Jahre eher diagnostiziert.

Zusammengenommen (siehe Tabelle 4-6) geben diese Daten eindeutige Hinweise darauf, dass genetische Varianten des MDMX-Gens, die Tumorentstehung und die Überlebenszeit von Ovarialkarzinompatientinnen beeinflussen.

Allgemein lässt sich sagen, alle untersuchten MDMX-Polymorphismen keine Rolle bei Patientinnen mit ER-positiven Tumoren spielen. Hier deutet die Expression des Östrogenrezeptors darauf hin, dass Hormone das Tumorwachstum beschleunigen. Ist in den Tumoren von Ovarialkarzinompatientinnen jedoch keine ER-Expression nachweisbar, geht der Nachweis von bestimmten Genotypen mit einem früheren Tumoraufreten und einem verlängertem Gesamtüberleben einher. Bei allen untersuchten Polymorphismen zeigt sich bei Auftreten des selteneren Genotyps und bei Vorliegen von ER-negativen Tumoren, dass das Ovarialkarzinom dieser Patientinnen zwar früher auftritt, jedoch diese Frauen eine deutlich verlängerte Überlebenszeit haben und ein geringeres Risiko aufweisen an ihrem Tumor zu versterben. Damit hat der Status der untersuchten Polymorphismen eine prognostische Relevanz für Ovarialkarzinompatientinnen mit ER-negativen Tumoren.

Tabelle 4-6: Zusammenfassung einiger statistischer Parameter der Polymorphismen in Abhängigkeit vom ER-Status

Polymorphismus	Alter bei Diagnose [#]	Mittlere Überlebenszeit [§]	p-Wert [§]	Relatives Risiko (RR) [*]	p-Wert [*]
SNP31112					
ER gesamt TT	64,2	58,9	0,310	2,3	0,027
CT+CC	65,2	64,7		1	
ER positiv TT	63,7	61,0	0,827	1,7	0,280
CT+CC	69,1	49,7		1	
ER negativ TT	64,8	53,4	0,117	3,7	0,049
CT+CC	60,3	73,0		1	
SNP31274					
ER gesamt GG	64,2	56,4	0,112	2,1	0,038
AG+AA	64,4	66,7		1	
ER positiv GG	63,4	58,2	0,885	1,3	0,530
AG+AA	68,7	47,4		1	
ER negativ GG	65,2	51,7	0,048	4,5	0,038
AG+AA	59,2	76,8		1	
SNP31826					
ER gesamt GG	64,7	57,5	0,142	2,1	0,042
AG+AA	64,1	66,8		1	
ER positiv GG	65,1	61,5	0,990	1,5	0,467
AG+AA	67,7	50,3		1	
ER negativ GG	65,1	50,4	0,051	3,6	0,049
AG+AA	59,4	74,4		1	
SNP34091					
ER gesamt AA	64,7	53,8	0,063	2,2	0,024
AC+CC	64,2	67,1		1	
ER positiv AA	65,2	58,4	0,823	1,2	0,636
AC+CC	68,7	47,1		1	
ER negativ AA	63,8	46,4	0,006	5,5	0,010
AC+CC	59,2	79,3		1	

mittleres Alter bei Diagnosestellung des Tumors in Jahren

§ mittlere Überlebenszeit in Monaten ermittelt in Kaplan-Meier-Analyse

* multivariate Cox-Regressionsanalyse adjustiert nach Resttumor

5. Diskussion

Das murine „*double minute*“ 2 (MDM2) Gen wurde als eines von drei Genen (*MDM1*, 2, 3) identifiziert, die in der spontan transformierten Maus-Zelllinie 3T3-DM mit bis zu 50 Kopien vorliegen (Fakharzadeh *et al.*, 1991). Bei der Analyse der Gene zeigte sich, dass nur das Genprodukt des MDM2-Gens in der Lage ist, Zellen spontan zu transformieren (Cahilly-Snyder *et al.*, 1987). Die Ursache dafür ist, dass MDM2 an den Tumorsuppressor p53 binden und so dessen Funktion als Transaktivator von Genen, die eine Rolle in der Zellzyklusregulation und beim Auslösen von Apoptose spielen, inhibieren kann (Momand *et al.*, 1992). Andererseits wird die Expression von MDM2 durch p53 positiv reguliert. Damit sind das Onkogen MDM2 und der Tumorsuppressor p53 durch einen „autoregulatorischen“ Feedback-Loop miteinander verbunden (Barak *et al.*, 1993). MDM2 ist weiterhin in der Lage, p53 für den proteasomalen Abbau zu markieren (Haupt *et al.*, 1997; Honda *et al.*, 1997). Ein weiterer negativer Regulator der p53-Aktivität ist das MDM2-Homologe MDMX (Shvarts *et al.*, 1996). MDMX ist wie MDM2 in der Lage, an den Tumorsuppressor p53 zu binden und so dessen transkriptionelle Aktivität zu inhibieren. Im Gegensatz zu MDM2 kann MDMX jedoch nicht als E3-Ubiquitin-Ligase fungieren und p53 für den proteosomalen Anbau markieren (Jackson und Berberich, 2000). In einer Vielzahl von Tumoren kommt es zu Störungen des Gleichgewichts zwischen MDM2, MDMX und p53 (Toledo und Wahl, 2006). Eine Ursache dafür können Mutationen im p53-Gen sein, die in bis zu 50 % aller Tumoren nachgewiesen wurden. (Hollstein *et al.*, 1991). Weiterhin zeigen einige Tumorarten eine Überexpression der Onkoproteine MDM2 und MDMX (Danovi *et al.*, 2004; Freedman *et al.*, 1999). Dies kann ebenfalls zu einer Inaktivierung des Tumorsuppressors p53 führen. Eine Ursache für eine Überexpression kann in der Amplifikation des MDMX- oder MDM2-Gens liegen. Eine verstärkte Transkription und/oder eine erhöhte Translationseffizienz der mRNA-Transkripte können ebenfalls zu einer Überexpression des MDM2- oder MDMX-Proteins führen (Barak *et al.*, 1994; Landers *et al.*, 1997). Ursachen für unterschiedliche Transkriptionseffizienzen können Polymorphismen im 5'-UTR von Genen sein. Ein Beispiel dafür ist der SNP309 (T>G) im Promotorbereich des MDM2-Gens. Hier zeigen Zellen mit dem G-Allel des SNP309 erhöhte MDM2-mRNA Expression (Bond *et al.*, 2004). Ziel dieser Arbeit war es daher zu untersuchen, ob es in Ovarialkarzinomen zu Veränderungen im p53-MDM2-MDMX-Pathway kommt und ob diese eine prognostische Bedeutung besitzen.

5.1 MDM2- und MDMX-Genamplifikationen

Die Charakterisierung der Veränderungen des p53-Pathways in Ovarialkarzinomen umfasste unter anderem die Analyse des Amplifikationsstatus des MDM2- und des MDMX-Gens. Anschließend wurden die molekularen Daten mit den klinischen Parametern korreliert, um zu prüfen, ob diese einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf haben und eventuell als unabhängige Prognosefaktoren für Ovarialkarzinome dienen können. In unseren Untersuchungen konnte in 28,8 % (26 von 90) der untersuchten Proben eine Amplifikation des MDM2-Gens detektiert werden. Dieser Wert ist deutlich höher als der für Ovarialkarzinome in einer MDM2-Amplifikationsdatenbank publizierten Wert von 3,1 % (Momand *et al.*, 1998). Foulkes *et al.* konnten in keinen der 32 untersuchten Ovarialkarzinome eine Amplifikation nachweisen (Foulkes *et al.*, 1995). Andererseits zeigen Ovarialkarzinome häufig einen Zugewinn des Chromosomenarms 12q13-14, der Region in der auch das MDM2-Gen lokalisiert ist (Hauptmann *et al.*, 2002). Die Arbeitsgruppe um Courjal *et al.* konnte in 3,8 % (6/158) der untersuchten Proben eine MDM2-Amplifikation detektieren (Courjal *et al.*, 1996). Bei den Fällen mit MDM2-Amplifikation handelte es sich ausschließlich um FIGO III-Karzinome. Diese Korrelation gibt es in dem von uns untersuchten Kollektiv nicht. Die unterschiedlichen Ergebnisse entstehen möglicherweise durch die Nutzung von verschiedenen Methoden zur Bestimmung des MDM2-Amplifikationsstatus. Courjal *et al.* isolierten für ihre Untersuchungen DNA aus Frischgewebe und führten anschließend Southern-Blot Untersuchungen durch. Für unsere Untersuchungen hingegen stand kein Frischgewebe und Normalgewebe zur Verfügung, sondern nur Formalin-fixiertes in Paraffin-eingebettetes Material. Dieses Material ist durch eine hohe Degradationsrate der DNA gekennzeichnet. Mit dieser DNA wurden keine Southern-Blots gemacht, sondern komparative real-time PCRs durchgeführt. Obwohl im Vorfeld die Reaktionsbedingungen genau ausgetestet und optimiert wurden und bei jeder Untersuchung zahlreiche Kontrollen mitgeführt wurden, sind doch die unterschiedlichen Ergebnisse durch die Verwendung von verschiedenen Ausgangsmaterialien und Methoden erklärbar. Daher sollte bei zukünftigen Amplifikationsuntersuchungen DNA sowohl aus Frischgewebe als auch aus fixiertem Material gewonnen werden, um die Ergebnisse besser vergleichen zu können.

Die Untersuchung der MDMX-Amplifikation ergab, dass das Gen in 15,3 % (15 von 98) der Fälle amplifiziert vorlag. Dabei hatten die Patientinnen ohne Amplifikation eine mittlere Überlebenszeit von 61 Monaten, während die Frauen mit MDMX-Genamplifikation durchschnittlich nur 32 Monate überlebten. Auch wenn dieses Ergebnis mit einem p-Wert von 0,121 nicht signifikant ist, so zeigt sich doch ein deutlicher Trend. Statistisch signifikant ($p=0,001$) wurde das Ergebnis jedoch, wenn nur die Überlebenszeiten von Patientinnen mit high-grade Karzinomen und MDMX-Amplifikation betrachtet wurden. In der Literatur gibt es bisher keine weiteren Untersuchungen zum MDMX-Amplifikationsstatus in Ovarialkarzinomen. Das MDMX-Gen ist auf Chromosom 1 in der Region 1q32 lokalisiert, einer Region, die in Ovarialkarzinomen ebenfalls häufig Veränderungen aufweist (Gallion *et al.*, 1990; Hauptmann *et al.*, 2002). Für Weichteilsarkome konnte bereits gezeigt werden, dass das MDMX-Gen in 17 % der untersuchten Fälle amplifiziert vorliegt, und dass dies auch mit einer schlechten Prognose korreliert (Bartel *et al.*, 2005). Bartel *et al.* konnten in dieser Arbeit auch zeigen, dass die Expression der MDMX-S mRNA mit einer schlechten Prognose für Weichteilsarkompatienten korreliert. Dies konnten wir an unserem Kollektiv nicht nachweisen. Hier korrelierte eine MDMX-Amplifikation weder mit der MDMX-mRNA noch der MDMX-S mRNA Expression, wobei RNA aus Formalin-fixiertem Gewebe eine sehr schlechte Qualität aufweist und diese Messungen mit Frischgewebe wiederholt werden sollten. Riemenschneider *et al.* beschrieben, dass eine MDMX-Genamplifikation und eine mRNA-Überexpression in Glioblastomen gefunden wurde, die keine p53-Mutationen aufwiesen. Sie schlussfolgerten daraus, dass eine MDMX-Amplifikation ein neuer Mechanismus für die Entstehung maligner Gliome sein könnte, um sich der p53-regulierten Wachstumskontrolle zu entziehen (Riemenschneider *et al.*, 2003). Dies konnte für unser Patientenkollektiv nur teilweise bestätigt werden: 5 der 11 untersuchten high-grade Karzinome mit MDMX-Amplifikation wiesen auch eine p53-Mutation auf, von denen 4 eine Überexpression des p53-Proteins in der Immunhistochemie zeigen. In einer kürzlich veröffentlichten Publikation konnten Ahmed *et al.* zeigen, dass 96 % der untersuchten serösen high-grade Karzinome, darunter auch Ovarialkarzinome, eine p53-Mutation aufweisen. Die restlichen Karzinome zeigten andere Veränderungen wie Kras-Mutationen oder eine MDMX-Amplifikation (Ahmed *et al.*, 2010). Daher sind weitere

Untersuchungen nötig, um zu beweisen, dass MDMX-Genamplifikationen und p53-Mutationen unabhängige Mechanismen darstellen, um p53 in Tumoren zu inaktivieren.

5.2 p53-Mutations- und Expressionanalyse

Für die Untersuchungen zu Veränderungen im p53-Pathway wurden weiterhin der p53-Mutationsstatus und die p53-Expressionsrate in einem Kollektiv von 107 Ovarialkarzinomen bestimmt. In 39 % (42/107) der Tumoren konnten p53-Mutationen nachgewiesen werden, die eine Veränderung der Aminosäuresequenz bewirken. Dieser Prozentsatz liegt nahe dem in der Literatur für Ovarialkarzinome beschriebenen Bereich von 40-80 % (Feki und Irminger-Finger, 2004). Eine positive Immunfärbung lag bei 51 % der Tumoren vor. Hier schwankt der in der Literatur beschriebene Wert zwischen 29-62 % (Geisler *et al.*, 1997; Henriksen *et al.*, 1994; Klemi *et al.*, 1995; Levesque *et al.*, 1995; Rohlke *et al.*, 1997). Diese Ergebnisse zeigen, dass die p53-Immunhistochemie nicht immer ein sicherer Marker für den p53-Genstatus ist. In unserem Kollektiv zeigte die Hälfte der Fälle mit Wildtyp p53-Gen (49,2 %) auch eine positive p53-Immunfärbung. Ein Wert, der über dem liegt, was bisher in der Literatur beschrieben wurde (Havrilesky *et al.*, 2003; Reles *et al.*, 2001). Havrilesky *et al.* fanden in 28 % und Reles *et al.* in 38 % der von ihnen untersuchten Tumorproben eine positive p53-Immunhistochemie bei Vorhandensein eines nicht mutierten p53-Gens. Das Wildtyp p53-Protein besitzt eine kurze Halbwertszeit, wird normalerweise nur in sehr geringem Maße expremiert und sollte daher immunhistochemisch nicht nachweisbar sein (Ljungman, 2000). Es ist noch überraschender, dass es sich bei 90 % der Wildtyp-p53 überexpremierenden Tumoren um high-grade Karzinome handelt. Die Ursache für diese stark erhöhte Expression des p53-Proteins ist bisher nicht bekannt. Es ist zum einen möglich, dass die Stabilität des p53-Proteins stark erhöht ist oder zum anderen eine permanente Transkription des p53-Gens bzw. eine verstärkte Translation der p53-mRNA erfolgt. Eine Ursache dafür könnte sein, dass es Veränderungen in der Funktionalität von p53-interagierenden Proteinen, wie MDM2 oder MDMX, gibt (Finch *et al.*, 2002; Kubbutat *et al.*, 1997). Zum anderen könnte durch eine fortwährende p53-Phosphorylierung eine Interaktion mit Regulatoren verhindert werden. Es wird auch diskutiert, ob ein bisher unbekannter Faktor zwischen polyubiquitinyliertem p53-Protein und Proteasom in diesen Tumoren herunterreguliert ist (Kubbutat *et al.*, 1997; Yamauchi *et al.*, 2005). Wang *et al.* und Kraus *et al.* konnten

zeigen, dass die Stabilisierung von p53 mit der Expression von MDM2-Spleißvarianten korreliert (Kraus *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2005). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es bisher noch keine eindeutige Erklärung für den Mechanismus und die Bedeutung von akkumuliertem Wildtyp-p53-Protein in den Tumorzellen gibt. Weitere Studien sind nötig, um die Gründe für diesen Befund zu klären, besonders unter dem Aspekt, dass in unserer Studie 82 % dieser Tumoren rezidierten, während dies bei nur 52 % der Patientinnen mit „normalem“ p53 (Wildtyp-Gen, keine Expression) der Fall war.

p53 spielt eine Schlüsselrolle bei der Platin-induzierten Apoptose. Daher könnten p53-Veränderungen mit einem Platin-resistenten Phänotyp einhergehen. Die Reaktion einer Tumorzelle auf ein Platinderivat, würde dann von der Art der p53-Mutation und/oder vom Status einzelner Polymorphismen abhängen. Vikhanskaya *et al.* untersuchten verschiedene p53-hotspot-Mutationen in Verbindung mit dem Status des Arg72Pro-Polymorphismus (Vikhanskaya *et al.*, 2005). Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass Zellen mit einem homozygoten Arginin-Status resistenter gegenüber Chemotherapeutika waren, als Zellen mit homozygoten Prolin-Allelen. In unserer Studie gab es keinen signifikanten Unterschied im rezidivfreien Überleben von Patientinnen mit homozygoten Arg-Allelen ($p=0,87$; log-rank-Test). Im Gegensatz dazu zeigten Patientinnen mit heterozygotem Arg72Pro-Status eine mittlere rezidivfreie Überlebenszeit, von 61 Monaten, wenn ihr Tumor Wildtyp-p53 aufwies, verglichen mit 19 Monaten rezidivfreier Überlebenszeit wenn der Tumor p53-mutiert war und/oder das Protein überexprimiert wird ($p=0,02$). Andererseits hatten Patientinnen mit p53-mutierten Tumoren im FIGO Stadium III eine längere Gesamtüberlebenszeit (59,2 Monate), verglichen mit Patientinnen mit Wildtyp-p53 (40,6 Monate; $p=0,058$). Diese Daten stimmen zumindest teilweise mit denen von Havrilesky *et al.* überein, die zeigen konnten, dass Frauen mit p53-mutierten Ovariakarzinomen ein geringeres Risiko hatten, an einem frühen Rezidiv zu erkranken (Havrilesky *et al.*, 2003). Viele Chemotherapeutika verursachen DNA-Schäden, die in Zellen mit „normalem“ p53 vermutlich eher repariert werden, als dass in diesen Zellen Apoptose eingeleitet wird. Damit hätten Patientinnen mit p53-mutierten Tumoren eine bessere Prognose. Andere Arbeitsgruppen fanden ebenfalls ein besseres Ansprechen auf eine platinhaltige Chemotherapie bei p53-mutierten Tumoren (Kandioler-Eckersberger *et al.*, 2000; Lavarino *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu zeigten Reles *et al.*, dass p53-

Mutationen mit einem früheren Auftreten von Rezidiven in frühen und späten Stadien von Ovarialkarzinomen einhergehen (Reles *et al.*, 2001).

In der Literatur gibt es Hinweise, dass eher die Überexpression von p53 als Mutationen mit einem verkürzten Gesamtüberleben korrelieren (Fallows *et al.*, 2001; Kupryjanczyk, 2006; Rohlke *et al.*, 1997; Viale *et al.*, 1997). Unsere Ergebnisse zeigen, dass eine p53-Immunfärbung von >10% der Tumorzellen mit einem verringertem Gesamtüberleben korreliert ($p=0,0065$) und, dass das Auftreten von p53-Mutationen ($p=0,86$) allein keinen Einfluss auf das Überleben hat. Wir konnten auch zeigen, dass Patientinnen mit p53-Veränderungen generell eine schlechtere Prognose ($p=0,047$) und eine verkürzte Gesamtüberlebenszeit ($p=0,05$) hatten, im Vergleich zu Patientinnen mit „normalem“ p53. Bei den Patientinnen mit verändertem p53 haben überraschender Weise die Frauen mit Wildtyp-p53-Überexpression die kürzeste Überlebenszeit. Da bisher nur wenige Studien sowohl den p53-Genstatus als auch die Proteinexpression untersucht haben, wurde der prognostische Wert einer Überexpression von Wildtyp-p53 bisher unterschätzt (Casey *et al.*, 1996; Havrilesky *et al.*, 2003; Reles *et al.*, 2001). Unsere Studie unterstreicht die Bedeutung der p53-Funktionalität. Das Vorliegen von funktionsfähigem Protein scheint wichtiger zu sein, als die getrennte Untersuchung von p53-Mutationen und Proteinexpression.

Obwohl p53 eine entscheidende Rolle bei der Tumorentstehung und dem Fortschreiten der Erkrankung spielt, so gibt es in der Literatur doch viele Diskrepanzen zur Bedeutung von p53-Veränderungen im Ovarialkarzinom. Eine Ursache kann darin liegen, dass das Studiendesign zwischen den Arbeiten sehr unterschiedlich, und daher oft nicht vergleichbar ist. Ein entscheidender Faktor ist dabei die Zusammensetzung des Patientenkollektivs. In manchen Arbeiten werden nur seröse Ovarialkarzinome betrachtet, andere Studien beinhalten alle Fälle, die in einem bestimmten Zeitraum diagnostiziert wurden. In den publizierten Arbeiten werden bei Mutationsanalysen teilweise Exon 2-11 betrachtet, andere Arbeitsgruppen untersuchten dagegen nur Exon 5-8 auf Mutationen. Dies könnte erklären, warum in manchen Publikationen ein geringerer Prozentsatz an p53-Mutationen gefunden wurde. Weitere Diskrepanzen entstehen durch die Verwendung von unterschiedlichen Antikörpern bei immunhistochemischen Färbungen, und der anschließend Evaluierung der Präparate. Es werden in den Studien unterschiedliche Prozentwerte festgelegt, ab wann ein Protein als niedrig oder hoch

überexpressiert gilt (de Graeff *et al.*, 2009). Deshalb ist es wichtig, die Studienkriterien genauer zu definieren, um die Bedeutung von p53-Veränderungen für bestimmte Tumorsubgruppen reproduzierbar zu erforschen.

5.3 Rolle des SNP309 im Ovarialkarzinom

Zusätzlich zu p53-Veränderungen haben wir auch den SNP309-Status im p53-sensitiven P2-Promotor des MDM2-Gens untersucht. Seit der erstmaligen Beschreibung des SNP309 konnte in zahlreichen Tumorarten ein Zusammenhang mit einem frühem Auftreten des Tumors und auch mit einem erhöhten Risiko, an einem Tumor zu erkranken, gezeigt werden, unter anderem beim Mammakarzinom, Kolonkarzinom und dem Magenkarzinom (Menin *et al.*, 2006; Ohmiya *et al.*, 2006; Yarden *et al.*, 2008). Demgegenüber konnte bei Basalzellkarzinomen, Lungenkarzinomen und Prostatakarzinomen kein Einfluss des SNP309 auf die Tumorentstehung nachgewiesen werden (Pine *et al.*, 2006; Stoehr *et al.*, 2008; Wilkening *et al.*, 2007). Bond *et al.* konnten für B-Zell-Lymphome und Weichteilsarkome zeigen, dass das G-Allel des SNP309 mit einem früheren Erkrankungsalter für Frauen, aber nicht für Männer, verbunden ist (Bond *et al.*, 2006). Daten von Patientinnen mit invasiv-duktalem Mammakarzinom geben Hinweise darauf, dass das G-Allel einen intakten Östrogenrezeptor-Signalweg benötigt, um die Tumorentstehung zu beschleunigen. Tatsächlich konnte in unserer Arbeit gezeigt werden, dass das G-Allel des SNP309 nur bei Tumoren mit einer sehr starken ER-Expression mit einem früheren Diagnosealter (8 Jahre früher; $p=0,048$) verbunden ist, aber nicht für ER negative Ovarialkarzinome (1 Jahr früher; $p=0,77$). Wenn das Niveau der ER-Expression in Ovarialkarzinomen nicht berücksichtigt wird, findet sich bei den verschiedenen SNP309-Genotypen kein Unterschied im Erkrankungsalter, wie es bereits vor kurzem publiziert wurde (Campbell *et al.*, 2006). Auch die Arbeitsgruppe um Galic *et al.* untersuchte den Status des SNP309 in einer Gruppe von 150 Ovarialkarzinomen (Galic *et al.*, 2007). In dieser Studie konnte kein Zusammenhang zwischen G-Allel und Alter bei Diagnosestellung gefunden werden. Die Verteilung der Genotypen war unterschiedlich zu unserer Arbeit. Galic *et al.* fanden 13 % mit G/G, 40 % mit T/G und 47 % mit T/T-Status, verglichen mit 7 % G/G, 50 % T/G und 43 % T/T in unserer Studie. Ein möglicher Zusammenhang zwischen ER-Expression und SNP309-Status wurde in den Patientengruppen nicht untersucht. Unsere Arbeit gibt damit weitere Hinweise für eine

Verbindung zwischen G-Allel des SNP309 und Östrogenrezeptor-Signalweg. Der ER-Status und das Risiko, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, sind auch im Zusammenhang mit der menopausalen Hormonersatztherapie (HET) von Bedeutung. Frauen in den Wechseljahren werden entweder nur mit Östrogenen oder zusätzlich mit Progestin behandelt, um Beschwerden, wie z.B. Schlafstörungen, zu verringern. Greiser *et al.* kamen nach der Auswertung von 42 Studien zu dem Schluss, dass das Risiko, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, nach Behandlung mit Östrogenen um das 1,28-fache steigt, während das Risiko, an einem Mammakarzinom zu erkranken, nicht erhöht ist (Greiser *et al.*, 2007). Möglicherweise zeigen besonders Frauen mit G-Allel des SNP309 ein erhöhtes Risiko nach einer HET, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken. Hervorzuheben ist außerdem, dass das G-Allel des SNP309 – das aufgrund zahlreicher Befunde mit einem geschwächten p53-Pathway assoziiert ist – ebenso wie ein mutiertes p53-Gen bei Patientinnen im FIGO III-Stadium mit einem längeren Gesamtüberleben korreliert. Dies zeigt die komplexe Wechselwirkung von p53 und MDM2 unter unterschiedlichen hormonellen Bedingungen bei der Entstehung und Progression von Ovarialkarzinomen.

5.4 Alterationen im MDMX-Gen

Veränderungen im MDMX-Gen und deren Einfluss auf die Tumorentstehung und Tumorprogression wurden in Ovarialkarzinomen bisher nicht untersucht. Für diese Arbeit wurden zunächst alle codierenden Exone des MDMX-Gens in vierzehn Tumorzelllinien sequenziert. Dabei konnte ein heterozygoter Austausch von Prolin zu Alanin in Codon 388 von Exon 11 der Zelllinie A2780 nachgewiesen werden. Bei dieser Veränderung handelt es sich jedoch um keine Mutation, sondern um einen bereits bekannten Polymorphismus (rs61754765). Die Häufigkeit dieser Alteration ist bisher nicht publiziert. Codon 388 liegt zwar im C-terminalen Bereich des Proteins, jedoch außerhalb von bisher bekannten funktionellen Domänen. Ein Austausch von Prolin zu Alanin könnte aber einen Einfluss auf die Struktur des Proteins haben. Somit wäre es interessant, diese strukturelle Veränderung weiter zu untersuchen. Da Exon 11 des MDMX-Gens die für die Funktion des Proteins wichtige RING-Finger Domäne enthält, wurde dieser Bereich in 113 Ovarialkarzinompatientenproben sequenziert. Bei dieser Untersuchung wurden zwei missense-Mutationen und eine stille Mutation detektiert. Die missense-Mutation in Codon 421 (AGA->GGA; Arg->Gly) konnte in 3 Patientenproben nachgewiesen werden.

Ein Austausch der basischen Aminosäure Arginin zu Glycin hat möglicherweise einen Einfluss auf die Struktur und Stabilität des MDMX-Proteins. Codon 421 liegt vor der RING-Fingerdomäne (ASrest 437-483). Sowohl die stille Mutation in Codon 439 (TTA->TTG, Leu->Leu) als auch die missense-Mutation in Codon 458 (GTC->ATC, Val->Ile) traten im Tumor der gleichen Patientin auf. Der Aminosäurerest 458 liegt innerhalb der RING-Fingerdomäne des MDMX-Proteins. Die Bedeutung dieser Veränderung könnte nur eine zielgerichtete Mutagenese mit anschließender Struktur- und Stabilitätsuntersuchung klären. Weiterhin wurde Exon 11 des MDMX-Gens auch in 79 Weichteilsarkomen sequenziert. Dabei lag in zwei Fällen eine heterozygote missense-Mutation in Codon 374 (AAA->CAA, Lys->Gln) vor. Mit dem Austausch von Lysin zu Glutamin könnte dem Protein eine mögliche Ubiquitinylierungs-, Acetylierungs-, Neddylierungs- oder Sumoquitinylierungsstelle fehlen. Der Aminosäurerest 374 findet sich außerhalb von funktionellen Domänen. Lysinrest 254 und 379 sind in der Literatur jedoch bereits als Sumoquitinylierungsstellen beschrieben (Pan und Chen, 2005). Der Lysinrest 442 wurde durch Linke *et al.* als Ubiquitinylierungsstelle für die E3-Ligase MDM2 identifiziert (Linke *et al.*, 2008). Weitere Untersuchungen könnten klären, ob auch an Lysinrest 374 Modifikationen auftreten können. Die geringe Frequenz an MDMX-Mutationen in Ovarialkarzinomen und Weichteilsarkomen deckt sich mit den Daten einer kürzlich publizierten Studie von Reinicke *et al.*, die Mutationen im MDMX-Gen von Patientinnen mit familiären Mammakarzinomen untersucht haben. Hier konnte in vier der untersuchten 40 Fälle eine MDMX-Mutation detektiert werden (Reincke *et al.*, 2008). Dabei wiesen drei Fälle eine stille Mutation in Codon 74 (Val->Val) auf. Im Tumor einer anderen Patientin fand sich eine A->G Mutation in Codon 153. Dies bewirkt einen Austausch der Aminosäure Aspartat zu Glycin. Auch wenn die Frequenz an MDMX-Mutationen in den drei bisher untersuchten Tumorarten gering ist, so konnten doch keine übereinstimmenden Mutationen gefunden werden. Möglicherweise spielen in unterschiedlichen Tumorarten auch unterschiedliche MDMX-Mutationen eine Rolle bei der Tumorentstehung oder Tumorprogression. Auch für das MDM2-Gen ist in der Literatur bisher nur eine geringe Mutationsrate beschrieben. Unsere Arbeitsgruppe konnte bei der Sequenzierung von Exon 11 des MDM2-Gens in Tumoren von 82 Weichteilsarkompatienten und 108 gesunden Blutspendern keine Mutationen nachweisen. Hier konnte jedoch ein Polymorphismus in Codon 354 detektiert werden,

welcher einen Einfluss auf das Überleben der Patienten hat (Taubert *et al.*, 2000). Eine andere Arbeitsgruppe konnte bei der Sequenzierung der Zink-Finger-Region von MDM2 in verschiedenen Karzinomen Mutationen nachweisen. In zwei Lymphomen und einem Osteosarkom konnten Mutationen von Cysteinresten nachgewiesen werden, welche eine Rolle bei der Koordination von Zink-Ionen spielen, und damit bei der Stabilität des Proteins (Schlott *et al.*, 1997). Erwartungsgemäß scheint die Mutationsrate der Onkogene MDM2 und MDMX gering zu sein. Allerdings kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass in einzelnen Tumoren Mutationen im MDM2- oder MDMX-Gen die Tumorentstehung beeinflussen oder das Tumorwachstum beschleunigen.

5.4.1 Die prognostische Bedeutung des Polymorphismus 34091 für das Ovarialkarzinom

Es wird zunehmend beschrieben, dass genetische Veränderungen einen Einfluss auf regulatorische Prozesse des gesamten Organismus haben, dazu gehört auch die Anfälligkeit für bestimmte Krankheiten. Die meisten bisher beschriebenen genetischen Varianten beeinflussen das Transkriptionsniveau von mRNAs durch veränderte Aktivitäten im Promoterbereich, zum Beispiel durch eine verstärkte oder verringerte Bindung von Enhancer-Proteinen. Allerdings wird auch zunehmend publiziert, dass genetische Varianten durch eine gestörte microRNA-vermittelte Genregulation den Phänotyp von Organismen beeinflussen können. In einer holländischen Schafrasse findet sich eine Mutation im 3'-UTR des *Myostatin*-Gens, einem Gen, welches das Muskelwachstum hemmt. Diese Alteration schafft eine neue microRNA-Bindungsstelle für miR-1 und miR-206. Die Bindung dieser microRNAs hemmt die Translation der *Myostatin*-mRNA. Somit zeigen diese Schafe eine Hypertrophie der Muskulatur und sind entsprechend reich an Fleisch (Clop *et al.*, 2006). Die Daten unserer Arbeit geben Hinweise darauf, dass Veränderungen im 3'-UTR von bestimmten Genen auch einen Einfluss auf das Krebsrisiko von Menschen haben können. Wir konnten im Rahmen unserer Arbeit erstmals zeigen, dass ein SNP im 3'-untranslatierten Bereich des MDMX-Gens (SNP34091, rs4245739) eine neue Bindungsstelle für die microRNA hsa-miR-191 schafft, und dass diese Sequenzvariation sowohl mit dem Gesamtüberleben als auch mit dem rezidivfreien Überleben von Ovarialkarzinompatientinnen korreliert. Unsere biochemischen Daten geben Hinweise darauf, dass das A-Allel des SNP34091, welches nicht durch die miR-191 reguliert werden kann, mit einem erhöhten MDMX-Expressionsniveau korreliert. Dabei

zeigt sich in dem Patientenkollektiv eine deutliche Assoziation von A/A-Status mit einer erhöhter MDMX-mRNA und Proteinexpression. In den sechs untersuchten Ovarialkarzinomzelllinien ist das Bild jedoch nicht so eindeutig (siehe Abbildung 4-13). Die MDMX-mRNA-Expression scheint in allen Zelllinien nahezu gleich zu sein. Nur die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 weist eine deutlich erhöhte Expression auf, wobei diese Zelllinie auch durch eine Amplifikation des MDMX-Gens gekennzeichnet ist. Die C/C-Zelllinie EFO-21 zeigt tatsächlich eine geringe MDMX-Proteinexpression im Western-Blot. Jedoch ist auch bei der A/A-Zelllinie OVCAR-3 kaum MDMX-Protein nachweisbar. Die Zelllinien mit A/C-Status hingegen zeigen eine starke MDMX-Expression, obwohl sich Karzinome mit A/C-Status wie Karzinome mit C/C-Status verhalten. In weiteren Untersuchungen müsste der MDMX-Expressionsstatus an weiteren Zelllinien mit C/C-Status überprüft werden, wobei das Auftreten des homozygoten C-Allels eher selten ist. Auch die MDMX-mRNA-Expression sollte an Tumorgefriermaterial überprüft werden. Vielleicht lassen sich aber auch MDMX-Expressionsmuster zwischen Zelllinien und Tumoren nicht ohne weiteres aufeinander übertragen, da ein Tumor ein komplexes Netzwerk an unterschiedlichen Zellen enthält, und die entsprechende Zelllinie nur einen Bruchteil davon widerspiegelt.

Da es bereits viele Belege dafür gibt, dass MDMX neben MDM2 einer der wichtigsten Regulatoren des Tumorsuppressors p53 ist, lässt sich spekulieren, dass die verkürzte rezidivfreie Überlebenszeit und die verkürzte Gesamtüberlebenszeit bei Ovarialkarzinompatientinnen mit A/A-Allel zumindest teilweise durch eine Abschwächung der p53-Tumorsuppressoraktivität bedingt ist. Bei Patientinnen mit ER-negativen Tumoren und C-Allel finden sich mehr Tumoren mit intaktem p53, während Frauen mit A/A-Status eher eine Überexpression des p53-Proteins, egal ob Wildtyp oder mutiert, zeigen. Vielleicht trägt bei Tumoren mit A/A-Status die erhöhte MDMX-Expression zur Stabilisierung des Wildtyp p53-Proteins bei. Auch Mancini *et al.* fanden in einer Gruppe von 17 Ovarialkarzinomen mit Wildtyp-p53 eine erhöhte MDMX-mRNA und Proteinexpression bei den Tumoren, die besonders gut auf eine cis-Platin-Behandlung ansprachen (Mancini *et al.*, 2009). Die Tumoren, die eine Chemoresistenz aufwiesen, zeigten ein geringes MDMX-Expressionsniveau. Vermutlich ist in Tumoren mit verstärkter MDMX-Proteinexpression p53 nicht in der Lage, die Platin-induzierten DNA-Schäden zu reparieren. Daher sprechen diese Tumoren bessere auf platinhaltige Chemotherapeutika

an. Die Daten sollten jedoch noch in einem größeren Patientenkollektiv bestätigt werden, und dann sollte neben dem p53-Mutationsstatus auch der p53-Expressionstatus in den Tumoren bestimmen werden.

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, führt das G-Allel des SNP309 im P2-Promotor des MDM2-Gens zu einem früheren Auftreten von Ovarialkarzinomen bei Patientinnen mit ER-positiven Tumoren. Ursache dafür ist vermutlich auch hier eine Abschwächung des p53-Pathways. Andererseits haben die Patientinnen mit G-Allel und ER-negativen Tumoren eine signifikant bessere Prognose im Vergleich zu Patientinnen mit T/T-Status ($p=0,024$). Im Gegensatz zu MDM2 (Kinyamu und Archer, 2003) besitzt MDMX keine ER-Bindestellen im Promotorbereich des Gens (persönliche Mitteilung von Prof. Große, I.) Daher kann die MDMX-Expression vermutlich nicht über Östrogene reguliert werden. Der negative Effekt des A/A-Genotyps des SNP34091 auf das rezidivfreie Überleben und das Gesamtüberleben konnte auch nur bei Patientinnen mit ER-negativen Tumoren beobachtet werden. Jedoch korreliert dieser Polymorphismus nicht mit einem früheren Alter des Tumorauftritts. Dies lässt vermuten, dass das erhöhte MDMX-Expressionsniveau mit dem klinischen Verlauf und der Antwort des Tumors auf Chemotherapeutika korreliert und nicht mit der Entstehung eines Ovarialkarzinoms bei Patientinnen mit ER-negativen Tumoren. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass bei Patientinnen mit ER-positiven Tumoren die Rolle von Polymorphismen auf das Überleben klein ist, da die Expression der Geschlechtshormone diesen Effekt überlagert. Der humane Östrogenrezeptor gehört zur Familie der nukleären Rezeptoren für kleine hydrophobe Liganden, die Wachstum, Differenzierung und Homöostase in eukaryontischen Zellen regulieren (Hanstein *et al.*, 1996). Das Gen des klassischen Östrogenrezeptors (α) ist auf Chromosom 6q24-27 lokalisiert (Ponglikitmongkol *et al.*, 1988). Nach der Diffusion in die Zelle bindet Östradiol an den Östrogenrezeptor. Diese Bindung induziert eine allosterische Konformationsänderung des Rezeptors. Diesem Schritt folgt die Dimerbildung zweier ligandengebundener Rezeptormoleküle. Diese Dimerisierung erlaubt dann die Bindung des Rezeptor-Hormon-Komplexes an seine spezifische Ziel-DNA, das Östrogen-responsive Element (ERE). Es gibt Hinweise, dass sowohl Wachstumsfaktoren wie TGF α (Transforming growth-factor), IGF-1 (Insulin-like growth-factor) und Wachstumsfaktorrezeptoren wie der EGF-Rezeptor (Epidermal growth-factor) und erbB2 in Mammakarzinomzellen nach Behandlung mit Östradiol

hochreguliert sein können (Mangelsdorf *et al.*, 1995). Weitere Östrogen-regulierte Zielgene sind Fibulin-1 und Cathepsin D, welche eine Rolle bei der zellulären Motilität und Invasionsfähigkeit spielen (Clinton *et al.*, 1996; Rochefort *et al.*, 2001). Damit werden bei Patientinnen mit ER-positiven Tumoren vermutlich andere Wege angeschaltet, die zu einem verstärkten Tumorwachstum führen, als dass bei diesen Patientinnen eine Abschwächung des p53-Pathways durch Polymorphismen eine Rolle beim klinischen Verlauf der Erkrankung spielt.

5.4.2 Die prognostische Bedeutung weiterer Polymorphismen des MDMX-Gens

Bei der Sequenzierung des MDMX-Gens wurden neben dem Polymorphismus im 3'-UTR, zwei weitere Alterationen in Intron 9 (rs2290855) und 10 (rs2290854) untersucht. Atwal *et al.* analysierten die evolutionäre Selektion von genetischen Varianten des MDMX-Gens, und deren Bedeutung bei der Tumorentstehung (Atwal *et al.*, 2009). Sie konnten zeigen, dass die Vererbung vieler über das ganze Gen verteilter Polymorphismen eng aneinander gekoppelt ist. Diese Kopplung ist in der kaukasischen Bevölkerung stärker als bei der afroamerikanischen und der afrikanischen Bevölkerung. In dieser Studie wurde auch der Status eines Intron 10 Polymorphismus (rs1563828) in einer Gruppe von 95 Frauen mit hohen Raten an familiären Mamma- und Ovarialkarzinomen bestimmt. Dabei wird bei Frauen, die homozygot für das seltenere Allel sind, der Tumor 4-5 Jahre früher diagnostiziert, verglichen mit Frauen, die homozygot für das häufigere Allel sind ($p=0,0236$). Für diese Publikation der Arbeitsgruppe um Atwal *et al.* wurde der Status dieses Polymorphismus auch an unserem Kollektiv von sporadischen Ovarialkarzinomen bestimmt. Frauen mit A/A-Status bekommen ihren Tumor durchschnittlich mit 59,1 Jahren, während die Frauen mit dem häufigeren G/G-Status ihren Tumor erst mit 64,7 Jahren bekommen ($p=0,087$). Interessanterweise läuft anfänglich die Kurve der prozentualen Inzidenz für Frauen mit heterozygotem Status zwischen den beiden homozygoten Kurven, nähert sich dann aber der des homozygoten G-Allels an (Abbildung 4-24). Diese Ergebnisse wurden auch durch die Arbeitsgruppe um Kulkarni *et al.* bestätigt. Sie konnten an zwei Kohorten von Mammakarzinomen zeigen, dass das homozygote A-Allel mit einer 4-5 Jahre früheren Diagnose einhergeht, bei Frauen mit ER-negativen Tumoren, jedoch nicht bei Patientinnen mit ER-positiven Tumoren (Kulkarni *et al.*, 2009). Sowohl Atwal *et al.* als auch Kulkarni *et al.* untersuchten jedoch nicht den Einfluss dieses

Polymorphismus auf das Gesamtüberleben der Frauen. In unserem Kollektiv zeigte sich, dass die Frauen mit ER-negativen Tumoren, die später ihr Karzinom bekamen, ein 3,6-fach erhöhtes Risiko hatten, an ihrem Tumor zu versterben ($p=0,049$). Generell korrelierte in dieser Arbeit immer das homozygot häufigere Allel aller untersuchten Polymorphismen mit einem schlechteren Gesamtüberleben für Ovarialkarzinompatientinnen mit ER-negativen Tumoren, jedoch nicht bei ER-positiven Tumoren. Laut Atwal *et al.* und HapMap-Databse werden diese Polymorphismen auch aneinander gekoppelt vererbt. In unserem Kollektiv tritt in 45 der 118 Fälle das homozygot häufigere Allel aller vier untersuchten MDMX-Polymorphismen zusammen auf. In 35 der 118 Fälle wird das seltenere Allel aller vier untersuchten Polymorphismen expremiert. Die durchschnittliche Überlebenszeit für Patientinnen mit ER-negativen Tumoren und den homozygot häufigeren Allelen aller Polymorphismen beträgt 45,3 Monate, während Patientinnen, bei denen die selteneren Allele aller vier Polymorphismen nachweisbar sind, durchschnittlich 75,4 Monate überleben. Dieser Unterschied findet sich bei Patientinnen mit ER-positiven Tumoren nicht (homozygot häufigere Allele: 50,7 Monate; seltere Allele: 45,4 Monate). Eine Erklärung für die verlängerte Überlebenszeit von Patientinnen mit ER-negativen Tumoren könnte sein, dass an das C-Allel des SNP34091 die microRNA-191 binden kann und so die MDMX-Proteinexpression verringert ist. Dadurch könnte in diesen Tumoren eine Aktivierung p53-Tumorsuppressorweges schneller und effizienter erfolgen, als in Tumoren mit erhöhter MDMX-Proteinexpression. Da mit einer großen Wahrscheinlichkeit alle vier Polymorphismen aneinander gekoppelt vererbt werden, zeigt sich der Effekt auf das Überleben von Ovarialkarzinompatientinnen mit ER-negativen Tumoren, bei der getrennten Betrachtung der Polymorphismen immer wenn das seltenere Allel nachweisbar ist.

Zusammengenommen geben diese Daten eindeutige Hinweise darauf, dass genetische Varianten des MDMX-Gens, die Tumorentstehung und die Überlebenszeit von Ovarialkarzinompatientinnen beeinflussen.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Den Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bildete die Aufklärung von Mechanismen, die zur Fehlregulation des p53-MDM2-MDMX-Pathways in Ovarialkarzinomen führen, dem Karzinom, welches in den westlichen Ländern die höchste Sterblichkeitsrate unter den gynäkologischen Tumoren aufweist. Diese Untersuchungen umfasste die Analyse von Alterationen, wie z.B. Mutationen und Polymorphismen, Genamplifikationen und Proteinüberexpressionen und die Frage, ob diese Veränderungen mit klinischen Parametern der Patientinnen, wie Überlebenszeit oder Rezidivrisiko, korrelieren.

In 28,8 % der von uns untersuchten Ovarialkarzinomproben konnte eine Amplifikation des MDM2-Gens und in 15,3 % der Fälle eine Amplifikation des MDMX-Gens nachgewiesen werden. Dabei korrelierte nur die MDMX-Amplifikation mit einer deutlich verkürzten Überlebenszeit. Besonders Patientinnen mit high-grade Ovarialkarzinomen und MDMX-Amplifikation haben ein 3,2-fach erhöhtes Risiko, am Tumor zu versterben.

Weitere interessante Beobachtungen wurden bei der Bestimmung des p53-Mutations- und Proteinexpressionsstatus gemacht. Patientinnen, deren Tumoren das Wildtyp-p53-Protein überexprimierten, zeigten die kürzeste Überlebenszeit. Dieses Ergebnis macht deutlich, dass die isolierte Betrachtung des p53-Gen- und Proteinexpressionsstatus wenig prognostische Bedeutung hat und erklärt auch teilweise die widersprüchlichen Daten aus der Literatur zur prognostischen Relevanz von p53-Mutationen oder Expressionsstatus, speziell für das Ovarialkarzinom. Des Weiteren wurde der Status des SNP309 im P2-Promotor des MDM2-Gens bestimmt. Dabei ist das seltenere G-Allel mit einem früheren Alter des Tumorauftritts bei Östrogenrezeptor (ER) positiven Tumoren von Ovarialkarzinompatientinnen assoziiert, obwohl der ER-Status selbst keine prognostische Aussagekraft besitzt. Diese Daten stützen die Hypothese, dass Östrogene die Entwicklung von Tumoren bei Individuen mit G/G-Genotyp beschleunigen können. Andererseits korrelierte bei unseren Ovarialkarzinompatientinnen ein geschwächter p53-Weg (durch p53-Mutation oder G-Allel des SNP309) mit einer deutlich verlängerten Überlebenszeit.

Da bisher wenige Daten zu Mutationen des MDMX-Gens in Tumoren vorlagen, wurde der gesamte codierende Bereich zunächst in diversen Tumorzelllinien und anschließend Exon 11 des MDMX-Gens in Ovarialkarzinomproben sequenziert. Dabei konnte nur eine geringe Mutationsrate detektiert werden, aber es wurden hohe Frequenzen für verschiedene Polymorphismen gefunden. Eine dieser Sequenzvariationen liegt im 3'-UTR

des MDMX-Gens (SNP34091) und erschafft eine mögliche Bindungsstelle für die microRNA hsa-miR-191. Unsere biochemischen Daten geben Hinweise darauf, dass die miR-191 spezifisch die MDMX-C-Variante reguliert, nicht jedoch die MDMX-A-Variante. Der A/A-Genotyp tritt in high-grade Ovarialkarzinomen verglichen mit low-grade Karzinomen mit einer höheren Frequenz auf. Patientinnen mit A/A-Status, deren Tumoren keine ER-Expression zeigen, haben ein erhöhtes Rezidivrisiko und ein 5,5-fach erhöhtes Risiko, am Tumor zu versterben. Die Bedeutung weiterer Polymorphismen im Intron 9 und 10 des MDMX-Gens auf das Überleben wurde ebenfalls untersucht. Auch hier ging das seltenere Allel, bei ER-negativen Tumoren, mit einem besseren Überleben der Patientinnen einher. Eine Ursache für diese Beobachtung könnte sein, dass die Vererbung dieser Genotypen aneinander gekoppelt ist.

Um die Rolle der Polymorphismen für die Prognose von Ovarialkarzinomen zu bestätigen, sollten die durchgeführten Untersuchungen an einem anderen Kollektiv wiederholt werden. Es wäre auch interessant, den Status des SNP34091 in anderen Karzinomen zu bestimmen. Dabei stehen Tumoren, wie das Mammakarzinom, im Vordergrund, bei denen eine Rolle von Geschlechtshormonen bereits beschrieben ist. Auch hier könnte bei ER-negativen Karzinomen das Vorhandensein des C-Allels mit einem verlängerten Überleben korrelieren.

Zusammengenommen geben die Daten dieser Arbeit deutliche Hinweise darauf, dass Alterationen im p53-MDM2-MDMX-Pathway Einfluss auf die Entstehung von Ovarialkarzinomen haben und die Prognose der Patientinnen beeinflussen. Genauere Erkenntnisse über diese Veränderungen können in Zukunft dazu beitragen, den Verlauf von Tumorerkrankungen und eine mögliche Resistenzentwicklung besser vorherzusagen und somit die Therapie der Patienten zu optimieren.

7. Literatur

1. Ahmed,A.A. *et al.* (2010). Driver mutations in TP53 are ubiquitous in high grade serous carcinoma of the ovary. *J. Pathol.* *221*, 49-56.
2. Atwal,G.S. *et al.* (2009). Altered tumor formation and evolutionary selection of genetic variants in the human MDM4 oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *106*, 10236-10241.
3. Badgwell,D. and Bast,R.C., Jr. (2007). Early detection of ovarian cancer. *Dis. Markers* *23*, 397-410.
4. Barak,Y., Gottlieb,E., Juven-Gershon,T., and Oren,M. (1994). Regulation of mdm2 expression by p53: alternative promoters produce transcripts with nonidentical translation potential. *Genes Dev.* *8*, 1739-1749.
5. Barak,Y., Juven,T., Haffner,R., and Oren,M. (1993). mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *EMBO J.* *12*, 461-468.
6. Barnes,M.R., Deharo,S., Grocock,R.J., Brown,J.R., and Sanseau,P. (2007). The micro RNA target paradigm: a fundamental and polymorphic control layer of cellular expression. *Expert. Opin. Biol. Ther.* *7*, 1387-1399.
7. Bartel,D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* *116*, 281-297.
8. Bartel,F., Jung,J., Bohnke,A., Gradhand,E., Zeng,K., Thomssen,C., and Hauptmann,S. (2008). Both germ line and somatic genetics of the p53 pathway affect ovarian cancer incidence and survival. *Clin. Cancer Res.* *14*, 89-96.
9. Bartel,F., Meye,A., Wurl,P., Kappler,M., Bache,M., Lautenschlager,C., Grunbaum,U., Schmidt,H., and Taubert,H. (2001a). Amplification of the MDM2 gene, but not expression of splice variants of MDM2 mRNA, is associated with prognosis in soft tissue sarcoma. *Int. J. Cancer* *95*, 168-175.
10. Bartel,F., Schulz,J., Bohnke,A., Blumke,K., Kappler,M., Bache,M., Schmidt,H., Wurl,P., Taubert,H., and Hauptmann,S. (2005). Significance of HDMX-S (or MDM4) mRNA splice variant overexpression and HDMX gene amplification on primary soft tissue sarcoma prognosis. *Int. J. Cancer* *117*, 469-475.
11. Bartel,F., Taubert,H., and Harris,L.C. (2002). Alternative and aberrant splicing of MDM2 mRNA in human cancer. *Cancer Cell* *2*, 9-15.
12. Bartel,F., Taylor,A.C., Taubert,H., and Harris,L.C. (2001b). Novel mdm2 splice variants identified in pediatric rhabdomyosarcoma tumors and cell lines. *Oncol. Res.* *12*, 451-457.
13. Beckman,G., Birgander,R., Sjalander,A., Saha,N., Holmberg,P.A., Kivela,A., and Beckman,L. (1994). Is p53 polymorphism maintained by natural selection? *Hum. Hered.* *44*, 266-270.
14. Behrens,B.C., Hamilton,T.C., Masuda,H., Grotzinger,K.R., Whang-Peng,J., Louie,K.G., Knutsen,T., McKoy,W.M., Young,R.C., and Ozols,R.F. (1987). Characterization of a cis-diamminedichloroplatinum(II)-resistant human ovarian cancer cell line and its use in evaluation of platinum analogues. *Cancer Res.* *47*, 414-418.

15. Bjorkholm,E., Pettersson,F., Einhorn,N., Krebs,I., Nilsson,B., and Tjernberg,B. (1982). Long-term follow-up and prognostic factors in ovarian carcinoma. The radiumhemmet series 1958 to 1973. *Acta Radiol. Oncol.* *21*, 413-419.
16. Blower,P.E. *et al.* (2007). MicroRNA expression profiles for the NCI-60 cancer cell panel. *Mol. Cancer Ther.* *6*, 1483-1491.
17. Bohnsack,M.T., Czaplinski,K., and Gorlich,D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA.* *10*, 185-191.
18. Bond,G.L. *et al.* (2006). MDM2 SNP309 accelerates tumor formation in a gender-specific and hormone-dependent manner. *Cancer Res.* *66*, 5104-5110.
19. Bond,G.L. *et al.* (2004). A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell* *119*, 591-602.
20. Boren,T., Xiong,Y., Hakam,A., Wenham,R., Apte,S., Chan,G., Kamath,S.G., Chen,D.T., Dressman,H., and Lancaster,J.M. (2009). MicroRNAs and their target messenger RNAs associated with ovarian cancer response to chemotherapy. *Gynecol. Oncol.* *113*, 249-255.
21. Bottger,V., Bottger,A., Garcia-Echeverria,C., Ramos,Y.F., van der Eb,A.J., Jochemsen,A.G., and Lane,D.P. (1999). Comparative study of the p53-mdm2 and p53-MDMX interfaces. *Oncogene* *18*, 189-199.
22. Brooks,C.L. and Gu,W. (2003). Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* *15*, 164-171.
23. Bueso-Ramos,C.E., Manshour,T., Haidar,M.A., Huh,Y.O., Keating,M.J., and Albitar,M. (1995). Multiple patterns of MDM-2 deregulation in human leukemias: implications in leukemogenesis and prognosis. *Leuk. Lymphoma* *17*, 13-18.
24. Bueso-Ramos,C.E., Yang,Y., deLeon,E., McCown,P., Stass,S.A., and Albitar,M. (1993). The human MDM-2 oncogene is overexpressed in leukemias. *Blood* *82*, 2617-2623.
25. Cahilly-Snyder,L., Yang-Feng,T., Francke,U., and George,D.L. (1987). Molecular analysis and chromosomal mapping of amplified genes isolated from a transformed mouse 3T3 cell line. *Somat. Cell Mol. Genet.* *13*, 235-244.
26. Cai,X., Hagedorn,C.H., and Cullen,B.R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA.* *10*, 1957-1966.
27. Calin,G.A. *et al.* (2004). Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *101*, 2999-3004.
28. Campbell,I.G., Eccles,D.M., and Choong,D.Y. (2006). No association of the MDM2 SNP309 polymorphism with risk of breast or ovarian cancer. *Cancer Lett.* *240*, 195-197.
29. Carvajal,D., Tovar,C., Yang,H., Vu,B.T., Heimbrook,D.C., and Vassilev,L.T. (2005). Activation of p53 by MDM2 antagonists can protect proliferating cells from mitotic inhibitors. *Cancer Res.* *65*, 1918-1924.
30. Casey,G., Lopez,M.E., Ramos,J.C., Plummer,S.J., Arboleda,M.J., Shaughnessy,M., Karlan,B., and Slamon,D.J. (1996). DNA sequence analysis of exons 2 through 11 and

immunohistochemical staining are required to detect all known p53 alterations in human malignancies. *Oncogene* 13, 1971-1981.

31. Caspari,T. (2000). How to activate p53. *Curr. Biol.* 10, R315-R317.
32. Chandler,D.S., Singh,R.K., Caldwell,L.C., Bitler,J.L., and Lozano,G. (2006). Genotoxic stress induces coordinately regulated alternative splicing of the p53 modulators MDM2 and MDM4. *Cancer Res.* 66, 9502-9508.
33. Chen,K., Song,F., Calin,G.A., Wei,Q., Hao,X., and Zhang,W. (2008). Polymorphisms in microRNA targets: a gold mine for molecular epidemiology. *Carcinogenesis* 29, 1306-1311.
34. Cho,Y., Gorina,S., Jeffrey,P.D., and Pavletich,N.P. (1994). Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* 265, 346-355.
35. Christoffersen,N.R., Shalgi,R., Frankel,L.B., Leucci,E., Lees,M., Klausen,M., Pilpel,Y., Nielsen,F.C., Oren,M., and Lund,A.H. (2010). p53-independent upregulation of miR-34a during oncogene-induced senescence represses MYC. *Cell Death. Differ.* 17, 236-245.
36. Clinton,G.M., Rougeot,C., Derancourt,J., Roger,P., Defrenne,A., Godyna,S., Argraves,W.S., and Rochefort,H. (1996). Estrogens increase the expression of fibulin-1, an extracellular matrix protein secreted by human ovarian cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 316-320.
37. Clop,A. *et al.* (2006). A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nat. Genet.* 38, 813-818.
38. Courjal,F., Cuny,M., Rodriguez,C., Louason,G., Speiser,P., Katsaros,D., Tanner,M.M., Zeillinger,R., and Theillet,C. (1996). DNA amplifications at 20q13 and MDM2 define distinct subsets of evolved breast and ovarian tumours. *Br. J. Cancer* 74, 1984-1989.
39. Crum,C.P. (2009). Intercepting pelvic cancer in the distal fallopian tube: theories and realities. *Mol. Oncol.* 3, 165-170.
40. Dabholkar,M., Bostick-Bruton,F., Weber,C., Bohr,V.A., Egwuagu,C., and Reed,E. (1992). ERCC1 and ERCC2 expression in malignant tissues from ovarian cancer patients. *J. Natl. Cancer Inst.* 84, 1512-1517.
41. Danovi,D. *et al.* (2004). Amplification of Mdmx (or Mdm4) directly contributes to tumor formation by inhibiting p53 tumor suppressor activity. *Mol. Cell Biol.* 24, 5835-5843.
42. de Oca Luna,R.M., Tabor,A.D., Eberspaecher,H., Hulboy,D.L., Worth,L.L., Colman,M.S., Finlay,C.A., and Lozano,G. (1996). The organization and expression of the mdm2 gene. *Genomics* 33, 352-357.
43. de Graeff,P., de Crijns,A.P., de Jong,S., Boezen,M., Post,W.J., de Vries,E.G., van der Zee,A.G., de Bock,G.H. (2009). Modest effect of p53, EGFR and HER-2/neu on prognosis in epithelial ovarian cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer* 101, 149-159
44. de Graaf,P., Little,N.A., Ramos,Y.F., Meulmeester,E., Letteboer,S.J., and Jochemsen,A.G. (2003). Hdmx protein stability is regulated by the ubiquitin ligase activity of Mdm2. *J. Biol. Chem.* 278, 38315-38324.

45. DeLeo,A.B., Jay,G., Appella,E., Dubois,G.C., Law,L.W., and Old,L.J. (1979). Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 76, 2420-2424.
46. Denli,A.M., Tops,B.B., Plasterk,R.H., Ketting,R.F., and Hannon,G.J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432, 231-235.
47. Dogan,E., Saygili,U., Tuna,B., Gol,M., Gurel,D., Acar,B., and Koyuncuoglu,M. (2005). p53 and mdm2 as prognostic indicators in patients with epithelial ovarian cancer: a multivariate analysis. *Gynecol. Oncol.* 97, 46-52.
48. Dokianakis,D.N., Koumantaki,E., Billiri,K., and Spandidos,D.A. (2000). P53 codon 72 polymorphism as a risk factor in the development of HPV-associated non-melanoma skin cancers in immunocompetent hosts. *Int. J. Mol. Med.* 5, 405-409.
49. Donehower,L.A., Harvey,M., Slagle,B.L., McArthur,M.J., Montgomery,C.A., Jr., Butel,J.S., and Bradley,A. (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356, 215-221.
50. Esquela-Kerscher,A. and Slack,F.J. (2006). Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 6, 259-269.
51. Evans,S.C., Viswanathan,M., Grier,J.D., Narayana,M., El-Naggar,A.K., and Lozano,G. (2001). An alternatively spliced HDM2 product increases p53 activity by inhibiting HDM2. *Oncogene* 20, 4041-4049.
52. Fakharzadeh,S.S., Trusko,S.P., and George,D.L. (1991). Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumor cell line. *EMBO J.* 10, 1565-1569.
53. Fallows,S., Price,J., Atkinson,R.J., Johnston,P.G., Hickey,I., and Russell,S.E. (2001). P53 mutation does not affect prognosis in ovarian epithelial malignancies. *J. Pathol.* 194, 68-75.
54. Feki,A. and Irminger-Finger,I. (2004). Mutational spectrum of p53 mutations in primary breast and ovarian tumors. *Crit Rev. Oncol. Hematol.* 52, 103-116.
55. Finch,R.A. *et al.* (2002). mdmx is a negative regulator of p53 activity in vivo. *Cancer Res.* 62, 3221-3225.
56. Finlay,C.A., Hinds,P.W., and Levine,A.J. (1989). The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 57, 1083-1093.
57. Fogh,J., Fogh,J.M., and Orfeo,T. (1977). One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 59, 221-226.
58. Fotouhi,N. and Graves,B. (2005). Small molecule inhibitors of p53/MDM2 interaction. *Curr. Top. Med. Chem.* 5, 159-165.
59. Foulkes,W.D., Stamp,G.W., Afzal,S., Lalani,N., McFarlane,C.P., Trowsdale,J., and Campbell,I.G. (1995). MDM2 overexpression is rare in ovarian carcinoma irrespective of TP53 mutation status. *Br. J. Cancer* 72, 883-888.

60. Freedman,D.A., Wu,L., and Levine,A.J. (1999). Functions of the MDM2 oncoprotein. *Cell Mol. Life Sci.* *55*, 96-107.
61. Galic,V., Willner,J., Wollan,M., Garg,R., Garcia,R., Goff,B.A., Gray,H.J., and Swisher,E.M. (2007). Common polymorphisms in TP53 and MDM2 and the relationship to TP53 mutations and clinical outcomes in women with ovarian and peritoneal carcinomas. *Genes Chromosomes. Cancer* *46*, 239-247.
62. Gallion,H.H., Powell,D.E., Smith,L.W., Morrow,J.K., Martin,A.W., van,N., Jr., and Donaldson,E.S. (1990). Chromosome abnormalities in human epithelial ovarian malignancies. *Gynecol. Oncol.* *38*, 473-477.
63. Geisler,J.P., Geisler,H.E., Wiemann,M.C., Givens,S.S., Zhou,Z., and Miller,G.A. (1997). Quantification of p53 in epithelial ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* *66*, 435-438.
64. Giglio,S. *et al.* (2005). Identification of an aberrantly spliced form of HDMX in human tumors: a new mechanism for HDM2 stabilization. *Cancer Res.* *65*, 9687-9694.
65. Granja,F., Morari,J., Morari,E.C., Correa,L.A., Assumpcao,L.V., and Ward,L.S. (2004). Proline homozygosity in codon 72 of p53 is a factor of susceptibility for thyroid cancer. *Cancer Lett.* *210*, 151-157.
66. Gregory,R.I., Yan,K.P., Amuthan,G., Chendrimada,T., Doratotaj,B., Cooch,N., and Shiekhattar,R. (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* *432*, 235-240.
67. Greiser,C.M., Greiser,E.M., and Doren,M. (2007). Menopausal hormone therapy and risk of ovarian cancer: systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod. Update.* *13*, 453-463.
68. Gu,J., Nie,L., Wiederschain,D., and Yuan,Z.M. (2001). Identification of p53 sequence elements that are required for MDM2-mediated nuclear export. *Mol. Cell Biol.* *21*, 8533-8546.
69. Hamilton,T.C., Young,R.C., McKoy,W.M., Grotzinger,K.R., Green,J.A., Chu,E.W., Whang-Peng,J., Rogan,A.M., Green,W.R., and Ozols,R.F. (1983). Characterization of a human ovarian carcinoma cell line (NIH:OVCA-3) with androgen and estrogen receptors. *Cancer Res.* *43*, 5379-5389.
70. Han,X. *et al.* (2007). HDM4 (HDMX) is widely expressed in adult pre-B acute lymphoblastic leukemia and is a potential therapeutic target. *Mod. Pathol.* *20*, 54-62.
71. Hanstein,B., Eckner,R., DiRenzo,J., Halachmi,S., Liu,H., Searcy,B., Kurokawa,R., and Brown,M. (1996). p300 is a component of an estrogen receptor coactivator complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *93*, 11540-11545.
72. Haupt,Y., Maya,R., Kazaz,A., and Oren,M. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* *387*, 296-299.
73. Hauptmann,S., Denkert,C., Koch,I., Petersen,S., Schluns,K., Reles,A., Dietel,M., and Petersen,I. (2002). Genetic alterations in epithelial ovarian tumors analyzed by comparative genomic hybridization. *Hum. Pathol.* *33*, 632-641.

74. Havrilesky,L., Darcy,M., Hamdan,H., Priore,R.L., Leon,J., Bell,J., and Berchuck,A. (2003). Prognostic significance of p53 mutation and p53 overexpression in advanced epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *J. Clin. Oncol.* *21*, 3814-3825.
75. Hayashita,Y., Osada,H., Tatematsu,Y., Yamada,H., Yanagisawa,K., Tomida,S., Yatabe,Y., Kawahara,K., Sekido,Y., and Takahashi,T. (2005). A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res.* *65*, 9628-9632.
76. He,H. *et al.* (2005). The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *102*, 19075-19080.
77. Henriksen,R., Strang,P., Wilander,E., Backstrom,T., Tribukait,B., and Oberg,K. (1994). p53 expression in epithelial ovarian neoplasms: relationship to clinical and pathological parameters, Ki-67 expression and flow cytometry. *Gynecol. Oncol.* *53*, 301-306.
78. Hogberg,T., Carstensen,J., and Simonsen,E. (1993). Treatment results and prognostic factors in a population-based study of epithelial ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* *48*, 38-49.
79. Hollstein,M., Sidransky,D., Vogelstein,B., and Harris,C.C. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science* *253*, 49-53.
80. Honda,R., Tanaka,H., and Yasuda,H. (1997). Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett.* *420*, 25-27.
81. Honda,R. and Yasuda,H. (2000). Activity of MDM2, a ubiquitin ligase, toward p53 or itself is dependent on the RING finger domain of the ligase. *Oncogene* *19*, 1473-1476.
82. Hori,M., Shimazaki,J., Inagawa,S., Itabashi,M., and Hori,M. (2000). Alternatively spliced MDM2 transcripts in human breast cancer in relation to tumor necrosis and lymph node involvement. *Pathol. Int.* *50*, 786-792.
83. Hu,B., Gilkes,D.M., Farooqi,B., Sebti,S.M., and Chen,J. (2006). MDMX overexpression prevents p53 activation by the MDM2 inhibitor Nutlin. *J. Biol. Chem.* *281*, 33030-33035.
84. Hupp,T.R. and Lane,D.P. (1995). Two distinct signaling pathways activate the latent DNA binding function of p53 in a casein kinase II-independent manner. *J. Biol. Chem.* *270*, 18165-18174.
85. Hutvagner,G. and Zamore,P.D. (2002). A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* *297*, 2056-2060.
86. Jackson,M.W. and Berberich,S.J. (2000). MdmX protects p53 from Mdm2-mediated degradation. *Mol. Cell Biol.* *20*, 1001-1007.
87. Janus,F., Albrechtsen,N., Dornreiter,I., Wiesmuller,L., Grosse,F., and Deppert,W. (1999). The dual role model for p53 in maintaining genomic integrity. *Cell Mol. Life Sci.* *55*, 12-27.
88. Jeffrey,P.D., Gorina,S., and Pavletich,N.P. (1995). Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms. *Science* *267*, 1498-1502.
89. John,B., Enright,A.J., Aravin,A., Tuschl,T., Sander,C., and Marks,D.S. (2004). Human MicroRNA targets. *PLoS. Biol.* *2*, e363.

90. Jones,S.N., Roe,A.E., Donehower,L.A., and Bradley,A. (1995). Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature* 378, 206-208.
91. Kandioler-Eckersberger,D. *et al.* (2000). TP53 mutation and p53 overexpression for prediction of response to neoadjuvant treatment in breast cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 6, 50-56.
92. Karlan,B.Y., Jones,J., Slamon,D.J., and Lagasse,L.D. (1994). Glucocorticoids stabilize HER-2/neu messenger RNA in human epithelial ovarian carcinoma cells. *Gynecol. Oncol.* 53, 70-77.
93. Kawai,H., Wiederschain,D., Kitao,H., Stuart,J., Tsai,K.K., and Yuan,Z.M. (2003). DNA damage-induced MDMX degradation is mediated by MDM2. *J. Biol. Chem.* 278, 45946-45953.
94. Kertesz,M., Iovino,N., Unnerstall,U., Gaul,U., and Segal,E. (2007). The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nat. Genet.* 39, 1278-1284.
95. Khvorova,A., Reynolds,A., and Jayasena,S.D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115, 209-216.
96. Kinyamu,H.K. and Archer,T.K. (2003). Estrogen receptor-dependent proteasomal degradation of the glucocorticoid receptor is coupled to an increase in mdm2 protein expression. *Mol. Cell Biol.* 23, 5867-5881.
97. Klein,C. and Vassilev,L.T. (2004). Targeting the p53-MDM2 interaction to treat cancer. *Br. J. Cancer* 91, 1415-1419.
98. Klemi,P.J., Pylkanen,L., Kiilholma,P., Kurvinen,K., and Joensuu,H. (1995). p53 protein detected by immunohistochemistry as a prognostic factor in patients with epithelial ovarian carcinoma. *Cancer* 76, 1201-1208.
99. Klug,S.J. *et al.* (2001). TP53 polymorphism, HPV infection, and risk of cervical cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 10, 1009-1012.
100. Kohler,M.F., Marks,J.R., Wiseman,R.W., Jacobs,I.J., Davidoff,A.M., Clarke-Pearson,D.L., Soper,J.T., Bast,R.C., Jr., and Berchuck,A. (1993). Spectrum of mutation and frequency of allelic deletion of the p53 gene in ovarian cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 85, 1513-1519.
101. Kraus,A., Neff,F., Behn,M., Schuermann,M., Muenkel,K., and Schlegel,J. (1999). Expression of alternatively spliced mdm2 transcripts correlates with stabilized wild-type p53 protein in human glioblastoma cells. *Int. J. Cancer* 80, 930-934.
102. Krutzfeldt,J., Rajewsky,N., Braich,R., Rajeev,K.G., Tuschl,T., Manoharan,M., and Stoffel,M. (2005). Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* 438, 685-689.
103. Kubbutat,M.H., Jones,S.N., and Vousden,K.H. (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 387, 299-303.
104. Kulkarni,D.A., Vazquez,A., Haffty,B.G., Bandera,E.V., Hu,W., Sun,Y.Y., Toppmeyer,D.L., Levine,A.J., and Hirshfield,K.M. (2009). A polymorphic variant in human MDM4 associates with accelerated age of onset of estrogen receptor negative breast cancer. *Carcinogenesis* 30, 1910-1915.

105. Kupryjanczyk, J. (2006). Why TP53 status does not associate with clinical endpoints in ovarian cancer: facts and hypotheses. *Gynecol. Oncol.* *100*, 5-7.
106. Kussie, P.H., Gorina, S., Marechal, V., Elenbaas, B., Moreau, J., Levine, A.J., and Pavletich, N.P. (1996). Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science* *274*, 948-953.
107. Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* *294*, 853-858.
108. Lai, Z., Ferry, K.V., Diamond, M.A., Wee, K.E., Kim, Y.B., Ma, J., Yang, T., Benfield, P.A., Copeland, R.A., and Auger, K.R. (2001). Human mdm2 mediates multiple mono-ubiquitination of p53 by a mechanism requiring enzyme isomerization. *J. Biol. Chem.* *276*, 31357-31367.
109. Lambert, P.F., Kashanchi, F., Radonovich, M.F., Shiekhata, R., and Brady, J.N. (1998). Phosphorylation of p53 serine 15 increases interaction with CBP. *J. Biol. Chem.* *273*, 33048-33053.
110. Landen, C.N., Jr., Birrer, M.J., and Sood, A.K. (2008). Early events in the pathogenesis of epithelial ovarian cancer. *J. Clin. Oncol.* *26*, 995-1005.
111. Landers, J.E., Cassel, S.L., and George, D.L. (1997). Translational enhancement of mdm2 oncogene expression in human tumor cells containing a stabilized wild-type p53 protein. *Cancer Res.* *57*, 3562-3568.
112. Lane, D.P. (1992). Worrying about p53. *Curr. Biol.* *2*, 581-583.
113. Lane, D.P. and Crawford, L.V. (1979). T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* *278*, 261-263.
114. Laptenko, O. and Prives, C. (2006). Transcriptional regulation by p53: one protein, many possibilities. *Cell Death. Differ.* *13*, 951-961.
115. Lau, D.H., Lewis, A.D., Ehsan, M.N., and Sikić, B.I. (1991). Multifactorial mechanisms associated with broad cross-resistance of ovarian carcinoma cells selected by cyanomorpholino doxorubicin. *Cancer Res.* *51*, 5181-5187.
116. Lau, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G., and Bartel, D.P. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* *294*, 858-862.
117. Laurie, N.A. *et al.* (2006). Inactivation of the p53 pathway in retinoblastoma. *Nature* *444*, 61-66.
118. Lavarino, C. *et al.* (2000). p53 gene status and response to platinum/paclitaxel-based chemotherapy in advanced ovarian carcinoma. *J. Clin. Oncol.* *18*, 3936-3945.
119. Lee, H.W. *et al.* (2009). Expression of excision repair cross-complementation group 1 protein predicts poor outcome in advanced non-small cell lung cancer patients treated with platinum-based doublet chemotherapy. *Lung Cancer*.
120. Lee, R.C. and Ambros, V. (2001). An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* *294*, 862-864.

121. Lee,R.C., Feinbaum,R.L., and Ambros,V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843-854.
122. Lee,Y., Kim,M., Han,J., Yeom,K.H., Lee,S., Baek,S.H., and Kim,V.N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 23, 4051-4060.
123. Levesque,M.A., Katsaros,D., Yu,H., Zola,P., Sismondi,P., Giardina,G., and Diamandis,E.P. (1995). Mutant p53 protein overexpression is associated with poor outcome in patients with well or moderately differentiated ovarian carcinoma. *Cancer* 75, 1327-1338.
124. Levine,A.J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323-331.
125. Lewis,B.P., Burge,C.B., and Bartel,D.P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120, 15-20.
126. Lewis,B.P., Shih,I.H., Jones-Rhoades,M.W., Bartel,D.P., and Burge,C.B. (2003). Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 115, 787-798.
127. Li,C., Chen,L., and Chen,J. (2002). DNA damage induces MDMX nuclear translocation by p53-dependent and -independent mechanisms. *Mol. Cell Biol.* 22, 7562-7571.
128. Li,M., Brooks,C.L., Wu-Baer,F., Chen,D., Baer,R., and Gu,W. (2003). Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. *Science* 302, 1972-1975.
129. Lim,L.P., Lau,N.C., Garrett-Engele,P., Grimson,A., Schelter,J.M., Castle,J., Bartel,D.P., Linsley,P.S., and Johnson,J.M. (2005). Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 433, 769-773.
130. Lind,H., Zienolddiny,S., Ekstrom,P.O., Skaug,V., and Haugen,A. (2006). Association of a functional polymorphism in the promoter of the MDM2 gene with risk of nonsmall cell lung cancer. *Int. J. Cancer* 119, 718-721.
131. Linke,K., Mace,P.D., Smith,C.A., Vaux,D.L., Silke,J., and Day,C.L. (2008). Structure of the MDM2/MDMX RING domain heterodimer reveals dimerization is required for their ubiquitylation in trans. *Cell Death. Differ.* 15, 841-848.
132. Linzer,D.I. and Levine,A.J. (1979). Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17, 43-52.
133. Liu,J., Carmell,M.A., Rivas,F.V., Marsden,C.G., Thomson,J.M., Song,J.J., Hammond,S.M., Joshua-Tor,L., and Hannon,G.J. (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305, 1437-1441.
134. Livak,K.J. and Schmittgen,T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method. *Methods* 25, 402-408.
135. Ljungman,M. (2000). Dial 9-1-1 for p53: mechanisms of p53 activation by cellular stress. *Neoplasia*. 2, 208-225.
136. Longley,D.B. and Johnston,P.G. (2005). Molecular mechanisms of drug resistance. *J. Pathol.* 205, 275-292.

137. Lord,R.V. *et al.* (2002). Low ERCC1 expression correlates with prolonged survival after cisplatin plus gemcitabine chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* **8**, 2286-2291.
138. Lukas,J., Gao,D.Q., Keshmeshian,M., Wen,W.H., Tsao-Wei,D., Rosenberg,S., and Press,M.F. (2001). Alternative and aberrant messenger RNA splicing of the mdm2 oncogene in invasive breast cancer. *Cancer Res.* **61**, 3212-3219.
139. Malkin,D. *et al.* (1990). Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* **250**, 1233-1238.
140. Mancini,F. *et al.* (2009). MDM4 (MDMX) localizes at the mitochondria and facilitates the p53-mediated intrinsic-apoptotic pathway. *EMBO J.* **28**, 1926-1939.
141. Mangelsdorf,D.J. *et al.* (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83**, 835-839.
142. Marx,D., Meden,H., Ziemek,T., Lenthe,T., Kuhn,W., and Schauer,A. (1998). Expression of the p53 tumour suppressor gene as a prognostic marker in platinum-treated patients with ovarian cancer. *Eur. J. Cancer* **34**, 845-850.
143. Matsumoto,R., Tada,M., Nozaki,M., Zhang,C.L., Sawamura,Y., and Abe,H. (1998). Short alternative splice transcripts of the mdm2 oncogene correlate to malignancy in human astrocytic neoplasms. *Cancer Res.* **58**, 609-613.
144. Melton,D.W., Ketchen,A.M., Nunez,F., Bonatti-Abbondandolo,S., Abbondandolo,A., Squires,S., and Johnson,R.T. (1998). Cells from ERCC1-deficient mice show increased genome instability and a reduced frequency of S-phase-dependent illegitimate chromosome exchange but a normal frequency of homologous recombination. *J. Cell Sci.* **111 (Pt 3)**, 395-404.
145. Menin,C. *et al.* (2006). Association between MDM2-SNP309 and age at colorectal cancer diagnosis according to p53 mutation status. *J. Natl. Cancer Inst.* **98**, 285-288.
146. Metzger,R. *et al.* (1998). ERCC1 mRNA levels complement thymidylate synthase mRNA levels in predicting response and survival for gastric cancer patients receiving combination cisplatin and fluorouracil chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* **16**, 309-316.
147. Michael,M.Z., O' Connor,S.M., van Holst Pellekaan,N.G., Young,G.P., and James,R.J. (2003). Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol. Cancer Res.* **1**, 882-891.
148. Migliorini,D., Danovi,D., Colombo,E., Carbone,R., Pelicci,P.G., and Marine,J.C. (2002a). Hdmx recruitment into the nucleus by Hdm2 is essential for its ability to regulate p53 stability and transactivation. *J. Biol. Chem.* **277**, 7318-7323.
149. Migliorini,D., Lazzerini,D.E., Danovi,D., Jochemsen,A., Capillo,M., Gobbi,A., Helin,K., Pelicci,P.G., and Marine,J.C. (2002b). Mdm4 (Mdmx) regulates p53-induced growth arrest and neuronal cell death during early embryonic mouse development. *Mol. Cell Biol.* **22**, 5527-5538.
150. Mihara,M. and Moll,U.M. (2003). Detection of mitochondrial localization of p53. *Methods Mol. Biol.* **234**, 203-209.

151. Momand,J., Jung,D., Wilczynski,S., and Niland,J. (1998). The MDM2 gene amplification database. *Nucleic Acids Res.* *26*, 3453-3459.
152. Momand,J., Zambetti,G.P., Olson,D.C., George,D., and Levine,A.J. (1992). The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* *69*, 1237-1245.
153. Niwa,K., Itoh,M., Murase,T., Morishita,S., Itoh,N., Mori,H., and Tamaya,T. (1994). Alteration of p53 gene in ovarian carcinoma: clinicopathological correlation and prognostic significance. *Br. J. Cancer* *70*, 1191-1197.
154. Ohmiya,N., Taguchi,A., Mabuchi,N., Itoh,A., Hirooka,Y., Niwa,Y., and Goto,H. (2006). MDM2 promoter polymorphism is associated with both an increased susceptibility to gastric carcinoma and poor prognosis. *J. Clin. Oncol.* *24*, 4434-4440.
155. Oliner,J.D., Kinzler,K.W., Meltzer,P.S., George,D.L., and Vogelstein,B. (1992). Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* *358*, 80-83.
156. Olivier,M., Eeles,R., Hollstein,M., Khan,M.A., Harris,C.C., and Hainaut,P. (2002). The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum. Mutat.* *19*, 607-614.
157. Orom,U.A. and Lund,A.H. (2007). Isolation of microRNA targets using biotinylated synthetic microRNAs. *Methods* *43*, 162-165.
158. Ota,A., Tagawa,H., Karnan,S., Tsuzuki,S., Karpas,A., Kira,S., Yoshida,Y., and Seto,M. (2004). Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma. *Cancer Res.* *64*, 3087-3095.
159. Pan,Y. and Chen,J. (2003). MDM2 promotes ubiquitination and degradation of MDMX. *Mol. Cell Biol.* *23*, 5113-5121.
160. Pan,Y. and Chen,J. (2005). Modification of MDMX by sumoylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *332*, 702-709.
161. Parant,J., Chavez-Reyes,A., Little,N.A., Yan,W., Reinke,V., Jochemsen,A.G., and Lozano,G. (2001). Rescue of embryonic lethality in Mdm4-null mice by loss of Trp53 suggests a nonoverlapping pathway with MDM2 to regulate p53. *Nat. Genet.* *29*, 92-95.
162. Patton,J.T., Mayo,L.D., Singhi,A.D., Gudkov,A.V., Stark,G.R., and Jackson,M.W. (2006). Levels of HdmX expression dictate the sensitivity of normal and transformed cells to Nutlin-3. *Cancer Res.* *66*, 3169-3176.
163. Pegoraro,R.J., Rom,L., Lanning,P.A., Moodley,M., Naiker,S., and Moodley,J. (2002). P53 codon 72 polymorphism and human papillomavirus type in relation to cervical cancer in South African women. *Int. J. Gynecol. Cancer* *12*, 383-388.
164. Peltier,H.J. and Latham,G.J. (2008). Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA.* *14*, 844-852.

165. Petitjean,A., Mathe,E., Kato,S., Ishioka,C., Tavtigian,S.V., Hainaut,P., and Olivier,M. (2007). Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum. Mutat.* **28**, 622-629.
166. Pignata,S. and Vermorken,J.B. (2004). Ovarian cancer in the elderly. *Crit Rev. Oncol. Hematol.* **49**, 77-86.
167. Pim,D. and Banks,L. (2004). p53 polymorphic variants at codon 72 exert different effects on cell cycle progression. *Int. J. Cancer* **108**, 196-199.
168. Pine,S.R., Mechanic,L.E., Bowman,E.D., Welsh,J.A., Chanock,S.C., Shields,P.G., and Harris,C.C. (2006). MDM2 SNP309 and SNP354 are not associated with lung cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **15**, 1559-1561.
169. Ponglikitmongkol,M., Green,S., and Chambon,P. (1988). Genomic organization of the human oestrogen receptor gene. *EMBO J.* **7**, 3385-3388.
170. Prodosmo,A. *et al.* (2008). Analysis of human MDM4 variants in papillary thyroid carcinomas reveals new potential markers of cancer properties. *J. Mol. Med.* **86**, 585-596.
171. Purdie,D., Green,A., Bain,C., Siskind,V., Ward,B., Hacker,N., Quinn,M., Wright,G., Russell,P., and Susil,B. (1995). Reproductive and other factors and risk of epithelial ovarian cancer: an Australian case-control study. Survey of Women's Health Study Group. *Int. J. Cancer* **62**, 678-684.
172. Rallapalli,R., Strachan,G., Cho,B., Mercer,W.E., and Hall,D.J. (1999). A novel MDMX transcript expressed in a variety of transformed cell lines encodes a truncated protein with potent p53 repressive activity. *J. Biol. Chem.* **274**, 8299-8308.
173. Rallapalli,R., Strachan,G., Tuan,R.S., and Hall,D.J. (2003). Identification of a domain within MDMX-S that is responsible for its high affinity interaction with p53 and high-level expression in mammalian cells. *J. Cell Biochem.* **89**, 563-575.
174. Ramos,Y.F., Stad,R., Attema,J., Peltenburg,L.T., van der Eb,A.J., and Jochemsen,A.G. (2001). Aberrant expression of HDMX proteins in tumor cells correlates with wild-type p53. *Cancer Res.* **61**, 1839-1842.
175. Reardon,J.T., Vaisman,A., Chaney,S.G., and Sancar,A. (1999). Efficient nucleotide excision repair of cisplatin, oxaliplatin, and Bis-aceto-amine-dichloro-cyclohexylamine-platinum(IV) (JM216) platinum intrastrand DNA diadducts. *Cancer Res.* **59**, 3968-3971.
176. Reincke,S., Govbakh,L., Wilhelm,B., Jin,H., Bogdanova,N., Bremer,M., Karstens,J.H., and Dork,T. (2008). Mutation analysis of the MDM4 gene in German breast cancer patients. *BMC. Cancer* **8**, 52.
177. Reles,A. *et al.* (2001). Correlation of p53 mutations with resistance to platinum-based chemotherapy and shortened survival in ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* **7**, 2984-2997.
178. Riemenschneider,M.J., Buschges,R., Wolter,M., Reifenberger,J., Bostrom,J., Kraus,J.A., Schlegel,U., and Reifenberger,G. (1999). Amplification and overexpression of the MDM4 (MDMX) gene from 1q32 in a subset of malignant gliomas without TP53 mutation or MDM2 amplification. *Cancer Res.* **59**, 6091-6096.

179. Riemenschneider,M.J., Knobbe,C.B., and Reifenberger,G. (2003). Refined mapping of 1q32 amplicons in malignant gliomas confirms MDM4 as the main amplification target. *Int. J. Cancer* *104*, 752-757.
180. Righetti,S.C. *et al.* (1996). A comparative study of p53 gene mutations, protein accumulation, and response to cisplatin-based chemotherapy in advanced ovarian carcinoma. *Cancer Res.* *56*, 689-693.
181. Rochefort,H., Chalbos,D., Cunat,S., Lucas,A., Platet,N., and Garcia,M. (2001). Estrogen regulated proteases and antiproteases in ovarian and breast cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *76*, 119-124.
182. Rodriguez,A., Griffiths-Jones,S., Ashurst,J.L., and Bradley,A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.* *14*, 1902-1910.
183. Rohlke,P., Milde-Langosch,K., Weyland,C., Pichlmeier,U., Jonat,W., and Loning,T. (1997). p53 is a persistent and predictive marker in advanced ovarian carcinomas: multivariate analysis including comparison with Ki67 immunoreactivity. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* *123*, 496-501.
184. Rosenthal,A.N. (1998). Screening for gynecologic cancers. *Curr. Opin. Oncol.* *10*, 447-451.
185. Rusinov,V., Baev,V., Minkov,I.N., and Tabler,M. (2005). MicroInspector: a web tool for detection of miRNA binding sites in an RNA sequence. *Nucleic Acids Res.* *33*, W696-W700.
186. Ruvkun,G., Ambros,V., Coulson,A., Waterston,R., Sulston,J., and Horvitz,H.R. (1989). Molecular genetics of the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-14*. *Genetics* *121*, 501-516.
187. Schlott,T., Reimer,S., Jahns,A., Ohlenbusch,A., Ruschenburg,I., Nagel,H., and Droese,M. (1997). Point mutations and nucleotide insertions in the MDM2 zinc finger structure of human tumours. *J. Pathol.* *182*, 54-61.
188. Schwarz,D.S., Hutvagner,G., Du,T., Xu,Z., Aronin,N., and Zamore,P.D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* *115*, 199-208.
189. Sharp,D.A., Kratowicz,S.A., Sank,M.J., and George,D.L. (1999). Stabilization of the MDM2 oncoprotein by interaction with the structurally related MDMX protein. *J. Biol. Chem.* *274*, 38189-38196.
190. Shen,H., Solari,A., Wang,X., Zhang,Z., Xu,Y., Wang,L., Hu,X., Guo,J., and Wei,Q. (2004). P53 codon 72 polymorphism and risk of gastric cancer in a Chinese population. *Oncol. Rep.* *11*, 1115-1120.
191. Shih,I. and Kurman,R.J. (2004). Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am. J. Pathol.* *164*, 1511-1518.
192. Shvarts,A., Bazuine,M., Dekker,P., Ramos,Y.F., Steegenga,W.T., Merckx,G., van Ham,R.C., van der Houven van Oordt, van der Eb,A.J., and Jochemsen,A.G. (1997). Isolation and identification of the human homolog of a new p53-binding protein, Mdmx. *Genomics* *43*, 34-42.
193. Shvarts,A. *et al.* (1996). MDMX: a novel p53-binding protein with some functional properties of MDM2. *EMBO J.* *15*, 5349-5357.

194. Sigalas,I., Calvert,A.H., Anderson,J.J., Neal,D.E., and Lunec,J. (1996). Alternatively spliced mdm2 transcripts with loss of p53 binding domain sequences: transforming ability and frequent detection in human cancer. *Nat. Med.* 2, 912-917.
195. Silverberg,S.G. (1999). Toward the development of a universal grading system for ovarian epithelial carcinoma. *Gynecol. Oncol.* 73, 170-171.
196. Simon J (1983). *J Natl Cancer Inst* 70, 839-845.
197. Singer,G., Oldt,R., III, Cohen,Y., Wang,B.G., Sidransky,D., Kurman,R.J., and Shih,I. (2003). Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 95, 484-486.
198. Sionov,R.V. and Haupt,Y. (1999). The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene* 18, 6145-6157.
199. Sorbe,B., Frankendal,B., and Veress,B. (1982). Importance of histologic grading in the prognosis of epithelial ovarian carcinoma. *Obstet. Gynecol.* 59, 576-582.
200. Stad,R., Ramos,Y.F., Little,N., Grivell,S., Attema,J., van der Eb,A.J., and Jochemsen,A.G. (2000). Hdmx stabilizes Mdm2 and p53. *J. Biol. Chem.* 275, 28039-28044.
201. Stadel,B.V. (1975). Letter: The etiology and prevention of ovarian cancer. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 123, 772-774.
202. Steegenga,W.T., van der Eb,A.J., and Jochemsen,A.G. (1996). How phosphorylation regulates the activity of p53. *J. Mol. Biol.* 263, 103-113.
203. Steffensen,K.D., Waldstrom,M., and Jakobsen,A. (2009). The relationship of platinum resistance and ERCC1 protein expression in epithelial ovarian cancer. *Int. J Gynecol. Cancer* 19, 820-825.
204. Stoehr,R., Hitzebichler,F., Kneitz,B., Hammerschmied,C.G., Burger,M., Tannapfel,A., and Hartmann,A. (2008). Mdm2-SNP309 polymorphism in prostate cancer: no evidence for association with increased risk or histopathological tumour characteristics. *Br. J. Cancer* 99, 78-82.
205. Storey,A., Thomas,M., Kalita,A., Harwood,C., Gardiol,D., Mantovani,F., Breuer,J., Leigh,I.M., Matlashewski,G., and Banks,L. (1998). Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* 393, 229-234.
206. Swinney,R.M., Hsu,S.C., Hirschman,B.A., Chen,T.T., and Tomlinson,G.E. (2005). MDM2 promoter variation and age of diagnosis of acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 19, 1996-1998.
207. Tagawa,H. and Seto,M. (2005). A microRNA cluster as a target of genomic amplification in malignant lymphoma. *Leukemia* 19, 2013-2016.
208. Tamborini,E., Della,T.G., Lavarino,C., Azzarelli,A., Carpinelli,P., Pierotti,M.A., and Pilotti,S. (2001). Analysis of the molecular species generated by MDM2 gene amplification in liposarcomas. *Int. J. Cancer* 92, 790-796.
209. Tanimura,S., Ohtsuka,S., Mitsui,K., Shirouzu,K., Yoshimura,A., and Ohtsubo,M. (1999). MDM2 interacts with MDMX through their RING finger domains. *FEBS Lett.* 447, 5-9.

210. Taubert,H., Kappler,M., Meye,A., Bartel,F., Schlott,T., Lautenschlager,C., Bache,M., Schmidt,H., and Wurl,P. (2000). A Mbol polymorphism in exon 11 of the human MDM2 gene occurring in normal blood donors and in soft tissue sarcoma patients: an indication for an increased cancer susceptibility? *Mutat. Res.* 456, 39-44.
211. Tavani,A., Negri,E., Franceschi,S., Parazzini,F., and La,V.C. (1993). Risk factors for epithelial ovarian cancer in women under age 45. *Eur. J. Cancer* 29A, 1297-1301.
212. Terzian,T., Wang,Y., Van Pelt,C.S., Box,N.F., Travis,E.L., and Lozano,G. (2007). Haploinsufficiency of Mdm2 and Mdm4 in tumorigenesis and development. *Mol. Cell Biol.* 27, 5479-5485.
213. Toledo,F. and Wahl,G.M. (2006). Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat. Rev. Cancer* 6, 909-923.
214. Tovar,C. *et al.* (2006). Small-molecule MDM2 antagonists reveal aberrant p53 signaling in cancer: implications for therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 1888-1893.
215. Tsao,S.W., Mok,S.C., Fey,E.G., Fletcher,J.A., Wan,T.S., Chew,E.C., Muto,M.G., Knapp,R.C., and Berkowitz,R.S. (1995). Characterization of human ovarian surface epithelial cells immortalized by human papilloma viral oncogenes (HPV-E6E7 ORFs). *Exp. Cell Res.* 218, 499-507.
216. Valencia-Sanchez,M.A., Liu,J., Hannon,G.J., and Parker,R. (2006). Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev.* 20, 515-524.
217. Vassilev,L.T. (2004). Small-molecule antagonists of p53-MDM2 binding: research tools and potential therapeutics. *Cell Cycle* 3, 419-421.
218. Vassilev,L.T. *et al.* (2004). In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 303, 844-848.
219. Viale,G., Maisonneuve,P., Bonoldi,E., Di,B.A., Bevilacqua,P., Panizzoni,G.A., Radaelli,U., and Gasparini,G. (1997). The combined evaluation of p53 accumulation and of Ki-67 (MIB1) labelling index provides independent information on overall survival of ovarian carcinoma patients. *Ann. Oncol.* 8, 469-476.
220. Vikhanskaya,F., Siddique,M.M., Kei,L.M., Brogini,M., and Sabapathy,K. (2005). Evaluation of the combined effect of p53 codon 72 polymorphism and hotspot mutations in response to anticancer drugs. *Clin. Cancer Res.* 11, 4348-4356.
221. Vogelstein,B., Lane,D., and Levine,A.J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307-310.
222. Waldman,T., Kinzler,K.W., and Vogelstein,B. (1995). p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res.* 55, 5187-5190.
223. Walker,K.K. and Levine,A.J. (1996). Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 15335-15340.
224. Wang,Y.C., Lin,R.K., Tan,Y.H., Chen,J.T., Chen,C.Y., and Wang,Y.C. (2005). Wild-type p53 overexpression and its correlation with MDM2 and p14ARF alterations: an alternative pathway to non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 23, 154-164.

225. Welch,P.L. and King,M.C. (2001). BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Hum. Mol. Genet.* *10*, 705-713.
226. Wilkening,S., Hemminki,K., Rudnai,P., Gurzau,E., Koppova,K., Forsti,A., and Kumar,R. (2007). No association between MDM2 SNP309 promoter polymorphism and basal cell carcinoma of the skin. *Br. J. Dermatol.* *157*, 375-377.
227. Wilson,A.P. (1984). Characterization of a cell line derived from the ascites of a patient with papillary serous cystadenocarcinoma of the ovary. *J. Natl. Cancer Inst.* *72*, 513-521.
228. Wright DK and Manos MM (1990). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic press; San Diego.
229. Wu,X., Zhao,H., Amos,C.I., Shete,S., Maman,N., Hong,W.K., Kadlubar,F.F., and Spitz,M.R. (2002). p53 Genotypes and Haplotypes Associated With Lung Cancer Susceptibility and Ethnicity. *J. Natl. Cancer Inst.* *94*, 681-690.
230. Xirodimas,D.P., Stephen,C.W., and Lane,D.P. (2001). Cocompartmentalization of p53 and Mdm2 is a major determinant for Mdm2-mediated degradation of p53. *Exp. Cell Res.* *270*, 66-77.
231. Yamauchi,M., Suzuki,K., Kodama,S., and Watanabe,M. (2005). Abnormal stability of wild-type p53 protein in a human lung carcinoma cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *330*, 483-488.
232. Yarden,R.I., Friedman,E., Metsuyanin,S., Olender,T., Ben-Asher,E., and Papa,M.Z. (2008). MDM2 SNP309 accelerates breast and ovarian carcinogenesis in BRCA1 and BRCA2 carriers of Jewish-Ashkenazi descent. *Breast Cancer Res. Treat.* *111*, 497-504.
233. Yi,R., Qin,Y., Macara,I.G., and Cullen,B.R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* *17*, 3011-3016.
234. Youn,C.K., Kim,M.H., Cho,H.J., Kim,H.B., Chang,I.Y., Chung,M.H., and You,H.J. (2004). Oncogenic H-Ras up-regulates expression of ERCC1 to protect cells from platinum-based anticancer agents. *Cancer Res.* *64*, 4849-4857.
235. Zauberman,A., Flusberg,D., Haupt,Y., Barak,Y., and Oren,M. (1995). A functional p53-responsive intronic promoter is contained within the human mdm2 gene. *Nucleic Acids Res.* *23*, 2584-2592.
236. Zeuthen,J., Norgaard,J.O., Avner,P., Fellous,M., Wartiovaara,J., Vaheri,A., Rosen,A., and Giovanella,B.C. (1980). Characterization of a human ovarian teratocarcinoma-derived cell line. *Int. J. Cancer* *25*, 19-32.
237. Zurawski,V.R., Jr., Orjaseter,H., Andersen,A., and Jellum,E. (1988). Elevated serum CA 125 levels prior to diagnosis of ovarian neoplasia: relevance for early detection of ovarian cancer. *Int. J. Cancer* *42*, 677-680.

8. Anhang

8.1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaar(e)
Bsp.	Beispiel
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
CT	„threshold cycle“
Da	Dalton
DAPI	4', 6-diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
Del.	Deletion
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco`s modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure („desoxy ribonucleic acid“)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat(e)
ds	doppelsträngig
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
DTT	Dithiothreitol
ECL	„enhanced chemiluminescence“
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Östrogenrezeptor
et al.	et altera
evtl.	eventuell
FACS	„fluorescent activated cell sorting“
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d`Obstétrique
FKS	fötales Kälberserum
g	Gramm
h	Stunde
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HPV	humanes Papilloma-Virus
IARC	International Agency for Research on Cancer

kb	Kilobase(n)
kDa	kilo-Dalton
L	Liter
LB	Luria Broth – Bakteriennährmedium
Lu	Abkürzung für die siRNA, die gegen Luciferase gerichtet ist
mA	Milliampere
max.	maximal
min	Minute
miRNA	microRNA
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure („messenger ribonucleic acid“)
MRT	Magnetresonanz-Tomographie
nt	Nukleotide
µL	Mikroliter
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung („phosphate buffered saline“)
PCR	Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“)
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qRT-PCR	quantitative „real-time“ PCR
RING	„really interesting new gene domain“
RNase	Ribonuklease
RR	relatives Risiko („Hazard ratio“)
RT	Raumtemperatur
siRNA	„small interfering RNA“
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus („single nucleotide polymorphism“)
Tab.	Tabelle
TBE	Tris/Borsäure/EDTA
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
U	Unit
U/min	Umdrehungen/min
UTR	nicht-translatierter Bereich („untranslated region“)
Vgl.	Vergleich
WB	Western-Blot
WHO	Weltgesundheitsorganisation („world health organization“)
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

Tabelle 8-1: pTNM-Klassifikation und FIGO-Stadien des Ovarialkarzinoms

pTNM-Kategorien	FIGO-Stadien	Erläuterungen
pTx		Primärtumor kann nicht beurteilt werden
pT0		kein Anhalt für Primärtumor
pT1	I	Tumor begrenzt auf Ovarien
pT1a	IA	Tumor auf ein Ovar begrenzt; Kapsel intakt; kein Tumor auf Oberfläche des Ovars; keine malignen Zellen in Aszites oder bei Peritonealspülung
pT1b	IB	Tumor auf beide Ovarien begrenzt; Kapsel intakt; kein Tumor auf Oberfläche der Ovarien; keine malignen Zellen in Aszites oder Peritonealspülung
pT1c	IC	Tumor begrenzt auf ein oder beide Ovarien mit Kapselruptur; Tumor an Ovaroberfläche oder malignen Zellen in Aszites o. Peritonealspülung
pT2	II	Tumor befällt ein oder beide Ovarien und breitet sich im Becken aus
pT2a	IIA	Ausbreitung auf Uterus und Tuben
pT2b	IIB	Infiltration anderer Beckenorgane
pT2c	IIC	wie IIA/ IIB, aber mit Tumor an peritonealer Oberfläche u./o. malignen Zellen in Aszites o. Peritonealspülung
pT3 und/oder pN1	III	Tumor befällt ein o. beide Ovarien, mit mikrosk. nach- gewiesenen Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens u./o. regionäre Lymphknotenmetastasen
pT3a	IIIA	mikrosk. Peritonealmetastasen jenseits des Beckens
pT3b	IIIB	makrosk. Peritonealmetastasen jenseits des Beckens < 2 cm
pT3c	IIIC	makrosk. Peritonealmetastasen jenseits des Beckens > 2 cm; u./o. regionäre Lymphknotenmetastasen
pN-Regionäre Lymphknoten		
pNx		regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
pN0		keine regionären Lymphknotenmetastasen
pN1		regionäre Lymphknotenmetastasen
pM-Fernmetastasen		
pMx		Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
pM0		keine Fernmetastasen
pM1	IV	Fernmetastasen (ausschließlich Peritonealmetastasen)

Tabelle 8-2: Zusammenfassung der molekularen Daten und einiger klinischer Parameter

Fall-Nr.	SNP 309	SNP 31112	SNP 31274	SNP 31826	SNP 34091	p53-Mut.	p53-Expr.	ER-Status	rez.fr. ÜLZ	ges. ÜLZ
2	TG	TT	GG	GG	AA	nein	nein	ja	22,0	109,2
3	TG	TT	GG	GG	AA	ja	ja	ja	49,8	65,8
4	TG	CT	AG	AG	AC	ja	ja	ja	12,0	46,9
5		TT	GG	GG		nein	nein	ja	101,1	101,1
6	TG	CT	AG	AG	AC	nein	nein	ja	31,8	64,4
7	TT	TT	GG	GG	AA	ja	nein	nein		46,3
8	TG	CC	AA	AG	CC	ja	nein	nein		95,6
9	TG				AC	ja	nein	nein	21,0	100,3
10	TT	CT	AG	AG	AC	nein	nein	nein	42,3	99,9
11	TG	CT	AG	AG	AC	nein	nein	ja	14,3	38,4
12	TT	CC	AA		AC	nein	nein	nein	90,5	90,5
13	TT	TT	GG	GG	AA	nein	ja	nein	16,9	16,9
14	TT	CC	AA	AA	AA	nein	ja	nein	11,5	11,5
15	TT	TT	GG	GG	AC	ja	nein	nein		0,1
16	TG	CC		AA	AC	nein	nein	nein	41,7	46,7
17						nein	ja	ja	33,9	63,1
18	TG	CT	AG	AG	AC	nein	ja	nein	16,1	46,8
20	TT	TT	GG	GG	AA	ja	nein	ja	14,4	45,4
21	TT	TT	GG	GG	AA	nein	nein	nein		90,8
22	TG	CT	AG	AG	AC	nein	nein	ja		55,1
23						nein	ja	nein	3,9	6,7
24	TG	CT	GG	GG	AA	ja	ja	ja	23,5	81,8
25	TG	CT	AG	AG	AC	nein	nein	ja	6,6	11,9
26	TG	CT	AG	AG	AC	nein	ja	nein	85,8	85,8
27	TG	CT	GG		AA	ja	nein	ja	8,7	12,6
28	GG	CT	AG	AG	AC	nein	ja	ja	7,9	7,9
29	TG	CC	AA	AG	CC	nein	nein	nein	84,7	84,7
30	GG				AC	nein	ja	nein	5,5	22,8
32	TT	TT	GG	GG	AA	ja	ja	ja	13,6	17,4
33	TG	CT	AA	AA	AC	ja	ja	nein	36,0	79,9
34	TG	TT	GG	GG	AA	ja	ja	nein	19,1	43,3
35	GG	CT	GG	GG	AA	nein	nein	nein		1,5
36	TG	CT		AG	AC	nein	nein	ja	76,9	76,9
37	TT	CC	AA	AA	AC	ja	nein	nein	43,0	70,5
38	TG	CT	AG	AG	AC	nein	nein	nein		74,2
39	TG	TT	GG	GG	AA	ja	ja	ja	4,8	20,6
40	GG	TT	GG	GG		ja	ja	nein	58,8	72,67
41	TG	CT	AG	AG	AA	ja	ja	nein	42,6	68,2
42	TG	TT	GG	GG	AA	ja	ja	ja	10,3	10,3
43	TG	CT	AG	AG	AC	ja	nein	ja	7,9	62,9
44	TT	CT	AG	AG	AC	nein	nein	ja		47,4
45	GG	TT	GG	GG	AA	ja	ja	nein	28,2	55,1
46	TT	CC	AA	AG	AC	nein	ja	nein	25,4	69,1
47	TT	TT	GG	GG	AA	ja	ja	ja		0,7
49	GG	TT	GG	GG	AA	nein	ja	nein		0
50	TG	TT	GG	GG		nein	ja	ja	7,5	19,4
51	TG	TT	GG	GG	AA	nein	nein	ja	14,1	36,4

Fall-Nr.	SNP 309	SNP 31112	SNP 31274	SNP 31826	SNP 34091	p53-Mut.	p53-Expr.	ER-Status	rez.fr. ÜLZ	ges. ÜLZ
53	TG	TT	GG	GG	AA	nein	nein	nein	61,9	61,9
55	TT	TT	GG	GG	AA	nein	ja	ja	62,9	62,9
56	TG	CT	AG	AG	AC	nein	nein	nein	4,1	4,1
57	TT	TT	GG	GG	AA	nein	ja	ja	34,6	43,2
58	TT	TT	GG	GG	AA	nein	ja	nein	7,8	21,7
59	TT	CT	GG	GG	AA	ja	ja	nein	12,5	37,6
60	GG	TT	GG	GG	AA	ja	ja	nein	12,2	17,0
61	TT	CT	AG	AG	AC	ja	nein	nein		58,5
62	TG	CT		AG	AC	nein	ja	ja		14,8
63	TT	TT	GG	GG	AA	nein	ja	ja	43,2	55,4
64	TT	TT	GG	GG	AA	ja	ja	ja	21,9	24,0
65	TT	TT	GG	GG	AA	nein	nein	ja	52,6	54,5
66	GG	CT	AG	AG	AC	nein	nein	nein	24,9	54,3
67	TT	TT	GG	GG	AC	ja	nein	nein	63,7	63,7
68	TG	CT	AG	AG	AC	ja	nein	ja	12,1	19,1
69	TG	TT	GG	GG	AA	ja	ja	ja	21,2	34,2
70	TT	CT	AG	AG	AC	nein	nein	ja	4,5	48,1
71	TG	TT	GG	GG	AA	nein	nein	ja	4,3	32,0
72	TT	TT	GG	GG	AA	nein	nein	ja	15,9	56,9
73	TG	CT	AG	AG	AC	nein	nein	ja	3,8	50,5
74	TT	CT	AG	AG	AA	nein	ja	ja	51,6	51,6
75	TG	CT	AG	AG		nein	ja	nein	41,2	41,2
76	TG	CT	AG	AG	AC	ja	ja	nein	18,4	33,5
77	TT			AA	AA	nein	nein	ja	2,4	2,4
78	TG	CT	AG	AG	AC	ja	nein	ja	11,3	43,3
79	TG	CT	AG	AG	AC	ja	ja	ja	14,6	47,9
80	TG	TT	GG	GG	AA	ja	ja	ja	31,6	52,6
81	TG	TT	GG	GG	AA	ja	nein	nein	4,3	7,6
82	TT	TT	GG		AA	nein	ja	ja	4,8	4,8
84	TG	CT	AG	AG	AC	ja	nein	ja	7,2	22,3
86	TT	TT		AG	AA	ja	nein	ja	48,2	52,1
87	TT	TT	GG	GG	AA	nein	ja	ja		46,3
88	TG	CT	AG	AG	AC	nein	nein	ja	26,3	45,4
90	TG	CT	AG	AG	AC	nein	nein	ja		46,7
91	TG	CT	AG	AG	AA	ja	nein	nein	14,7	34,1
93	TG	TT	GG	AA	AC	nein	nein	nein		42,6
94	TG	TT	GG	GG	AA	nein	ja	ja	21,6	36,7
95	TG	TT			AC	nein	nein	ja	5,7	38,4
96	TT	CC	GG	GG	AC	nein	ja	ja	4,0	4,0
97	TT	TT	GG	GG	AA	nein	nein	nein	22,1	33,6
98	TG	TT	GG	GG	AA	ja	ja	nein	13,1	32,7
99	TG	TT	GG	GG	AA	ja	nein	nein	11,2	35,5
100	TT	TT	GG	GG	AA	nein	nein	nein		31,3
101	TG	TT	GG	GG	AA	nein	ja	ja	5,7	8,2
102	TG		AG	AA	AA	nein	ja	ja	19,1	34,2
103	TT	CT	AG	GG	AC	nein	nein	ja		
105	TT	TT	GG	GG	AA	nein	ja	nein	6,3	6,3
106	TG	TT	GG	AG	AC	ja	nein	ja	29,3	29,3

Fall-Nr.	SNP 309	SNP 31112	SNP 31274	SNP 31826	SNP 34091	p53-Mut.	p53-Expr.	ER-Status	rez.fr. ÜLZ	ges. ÜLZ
107	TT	TT	GG	GG	AA	nein	ja	ja	9,7	13,7
108	TG				AA	nein	ja	ja	6,4	6,4
109	TG	TT	GG	GG	AA	ja	ja	nein		30,4
110	TT	TT	GG	GG	AA	ja	ja	nein		2,6
111	TG	TT	GG		AA	ja	nein	ja	17,9	20,5
112		CT	AG	AG		nein	ja	ja		20,7
113	TG	TT	GG	GG	AA	nein	ja	ja	15,5	15,5
114	TT	CT	AG	AG	AC	nein	ja	nein	6,0	11,3
115	TT	CT	AG	AG	AA	ja	ja	ja	11,6	11,6
116	TT	CT	AG	AG	AA	ja	nein	ja	11,3	11,3
117	TT	CC	GG	AG	AA	nein	ja	ja	8,3	10,1
118	TT	CT	AG	AG	AC	ja	ja	ja	10	10
123	TG	TT	GG	GG	AA	nein	nein	ja	0,4	0,4
124	TT	TT	GG	GG	AA	ja	ja	ja	6,0	6,0
125	TT	CT	AG	AG	AA	ja	ja	ja		
126	TG	TT	GG	GG	AA	ja	nein	ja		
127	TT	TT	GG	GG	AA	ja	ja	nein	7,1	7,1
128	TT	CT	AG	AG	AA	nein	nein	nein	4,4	4,4
129	TT	CT	AG	AG	AA	ja	ja	ja	3,1	3,1
130	TT	TT	GG	GG	AA	nein	nein	ja	3,9	3,9
131	TG	TT	GG	GG	AA	ja	ja	ja	5,5	5,5
135	GG	CC	AG	AA	AC	nein	nein	ja	3,3	3,3
136		CC	AG	AA	AC	ja	ja	ja	4,4	4,4

p53-Mut. – p53-Mutationsstatus; p53-Expr. – p53-Expressionsstatus; ER-Status – Expressionstatus des Östrogenrezeptor im Tumor; rez.fr. ÜLZ – rezidivfreie Überlebenszeit in Monaten; ges. ÜLZ – Gesamtüberlebenszeit in Monaten

Publikationsliste

Wynendaele J[#], Böhnke A[#], Leucci E, Nielsen SJ, Lambertz I, Hammer S, Sbrzesny N, Kubitza D, Wolf A, Gradhand E, Balschun K, Braicu I, Chekerov R, Darb-Esfahani S, Denkert C, Thomssen C, Hauptmann S, Lund A, Marine JC, Bartel F. An illegitimate microRNA target site within the 3' UTR of *MDM4* affects ovarian cancer progression and chemosensitivity # both authors contributed equally; submitted to Cancer Research, in review process

Bartel F, Jung J, Böhnke A, Gradhand E, Zeng K, Thomssen C, Hauptmann S. Both germ line and somatic genetics of p53 pathway effect ovarian cancer incidence and survival. *Clin Cancer Res* 2008;14:89-96

Böhnke A, Jung J, Taubert H, Hauptmann S, Bartel F. Einfluss von Mutationen und Polymorphismen im TP53-Tumorsuppressorpathway auf die Entstehung und Prognose von Ovarialkarzinomen. *Verh Dtsch Ges Pathol* 2007;91:233-242

Atwal GS, Kirchhoff T, Bond EE, Montagna M, Menin C, Bertorelle R, Scaini MC, Bartel F, Böhnke A, Pempe C, Gradhand E, Hauptmann S, Offit K, Levine AJ, Bond GL. Altered tumor formation and evolutionary selection of genetic variants in the human MDM4 oncogene *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;23:10236-41

Phillips A, Teunisse A, Lam S, Lodder K, Darley M, Emaduddin M, Wolf A, Richter J, de Lange J, de Vries MV, Lenos K, Böhnke A, Bartel F, Blaydes JP and Jochemsen AG. HDMX-L is expressed from a functional p53-responsive promoter in the first intron of the *HDMX* gene, and participates in an auto-regulatory feedback loop to control p53 activity ; revision submitted to JCB in June 2010

Bartel F, Schulz J, Böhnke A, Blumke K, Kappler M, Bache M, Schmidt H, Würl P, Taubert H, Hauptmann S. Significance of HDMX-S (or MDM4) mRNA splice variant overexpression and HDMX gene amplification on primary soft tissue sarcoma prognosis. *Int J Cancer* 2005;117:469-75

Taubert H, Bartel F, Greither T, Bache M, Kappler M, Köhler T, Böhnke A, Lautenschläger C, Schmidt H, Holzhausen HJ, Hauptmann S, Würl P. Association of HDM2 transcript levels with age of onset and prognosis in soft tissue sarcomas. *Mol Cancer Res*. 2008;6:1575-81.

Taubert H, Würl P, Greither T, Kappler M, Bache M, Bartel F, Kehlen A, Lautenschläger C, Harris LC, Kaushal D, Füssel S, Meye A, Böhnke A, Schmidt H, Holzhausen HJ, Hauptmann S. Stem cell-associated genes are extremely poor prognostic factors for soft-tissue sarcoma patients. *Oncogene* 2007;26:7170-4.

Preise und Auszeichnungen

1. Bester Forschungsbeitrag 2007 bei der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie in Magdeburg

„Einfluss von Mutationen und Polymorphismen im TP53-Tumorsuppressorpathway auf die Entstehung und Prognose von Ovarialkarzinomen“

2. Posterpreis auf dem AEK International Cancer Congress 2009 in Berlin

„A SNP in the 3'-UTR of the MDMX gene is strongly correlated with decreased overall and disease-free survival in ovarian carcinoma patients“

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Anja Böhnke
Geburtstag und -ort: 20.10.1981 in Zeitz/Sachsen-Anhalt
Wohnort: Schwetschkestraße 38
06110 Halle/Saale
Familienstand: ledig
1 Kind: Max Thore Haak geb. am 12.07.2007

Beruflicher Werdegang

Seit 08/09 Leitung der Abteilung für Molekularpathologie des Instituts für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Studium

Seit 10/05 Promotion am Institut für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
10/04-06/05 Diplomarbeit am Institut für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
09/00-06/05 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Schulbildung

09/92-06/00 Otto-Baensch-Gymnasium Zeitz
09/88-08/92 Sigmund-Jähn-Grundschule Zeitz

Wissenschaftliches Engagement

06/03-09/03 Praktikum am Karolinska-Institut bei Dr. Yihai Cao, Stockholm, Schweden
06/05-10/05 Praktikum am Leiden University Medical Center Dr. Aart Jochemsen, Leiden, Niederlande
05/06 Teilnahme am p53-Workshop in New York, USA (mit Posterpräsentation)
03/09 Teilnahme am AEK International Cancer Congress, Berlin (mit Posterpräsentation)
08/09 Teilnahme am MDM2-Workshop in Gent, Belgien (mit Posterpräsentation)

Danksagung

Für die Überlassung des Themas möchte ich mich bei Dr. Frank Bartel und Prof. Dr. Steffen Hauptmann herzlich bedanken. Ihnen gilt mein besonderer Dank für Ihr Vertrauen in meine Arbeit und die zahlreichen Hilfestellungen und Anregungen bei Problemen.

Ich danke sowohl Sandra Göpfarth, Ute Rolle, Ilona Wiederhold und Birgit Wypior, als auch Anja Wolf, Stefanie Hammer und allen Mitarbeitern des Instituts für Pathologie für die stetige Hilfe, anregende Diskussionen und das angenehme Arbeitsklima.

Bei Prof. Dr. Behrens, vom Fachbereich Biochemie/Biotechnologie, möchte ich mich für seine Bereitschaft die Betreuung meiner Promotion zu übernehmen herzlich bedanken.

Weiterhin möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Helge Taubert und Dr. Thomas Greither für Ihre Hilfestellungen bei Problemen und ihre immer optimistische Art bedanken.

Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern der Institute für Humangenetik, Immunologie und Rechtsmedizin, die mir DNA von gesunden Blutspendern zur Verfügung gestellt haben.

Ich möchte mich des Weiteren bei Frau Dr. Darmer vom Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung für die Durchführung der unzähligen Sequenzierreaktionen bedanken.

Ich bedanke mich bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Jean-Christophe Marine in Gent, Belgien für die sehr kollegiale Zusammenarbeit und die vielen interessanten Diskussionen.

Danken möchte ich auch den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Anders Lund in Kopenhagen, die die Affinitätsreinigung der Biotin-markierten microRNA-191 durchgeführt haben.

Ich danke all meinen Freunden für den kontinuierlichen Beistand und die aufmunternden Worte beim Anfertigen dieser Arbeit.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, Großeltern, meinem Freund Guido und unserem Sohn Max für Ihre vielfältige Unterstützung und stets motivierenden Worte bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt entnommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Dissertation wurde an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Begutachtung eingereicht. Ferner habe ich mich selbst noch um keinen Doktorgrad beworben.

Halle/Saale, den

Anja Böhnke