

**Genetische Veränderungen im p53-
Tumorsuppressorpathway und deren prognosti-
sche Relevanz in Weichteilsarkomen und Ovari-
alkarzinomen**

Habilitationsschrift

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium medicinalium habilitatus
(Dr. rer. nat., rer. medic. habil.)

vorgelegt der

Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Dr. rer. nat. Frank Bartel
geboren am 22. April 1972 in Ludwigslust (Mecklenburg)

Gutachter:

1. Prof. Dr. Roland Moll (Marburg)
2. C. James Kirkpatrick, MD, Ph.D. (Mainz)
3. Prof. Dr. Thorsten Stiewe (Marburg)

Datum der Verteidigung: 16.11.2010

Referat und Bibliographisches Verzeichnis

Referat:

Den Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bildete die Aufklärung der Mechanismen, die zur Fehlregulation des p53-MDM2-MDMX-Pathways in zwei völlig unterschiedlichen Tumorarten, den Weichteilsarkomen und den Ovarialkarzinomen, führen. Dies umfasste die Analyse von Alterationen wie z.B. Mutationen und Polymorphismen, Genamplifikationen, Überexpression der mRNA bzw. des Proteins sowie die Expression von Spleißvarianten und die Frage, ob diese Veränderungen können mit dem Krankheitsverlauf bzw. dem individuellen Todesrisiko betroffener Patienten korrelieren. In 28 % der von uns untersuchten Weichteilsarkomproben konnte ein amplifiziertes MDM2-Gen nachgewiesen werden. Dies war mit einer erhöhten Expression der MDM2-mRNA assoziiert. Interessanterweise korrelierten sowohl die MDM2-Genamplifikation als auch eine leicht erhöhte MDM2-mRNA-Expression mit einer guten Prognose bei Weichteilsarkompatienten. Patienten ohne MDM2-Genamplifikation wiesen ein 4,5-fach erhöhtes Risiko auf, am Tumor zu versterben. Demgegenüber war jedoch für Patienten, deren Tumor durch eine MDMX-Genamplifikation charakterisiert war, das relative Risiko um das 2,8-fache erhöht. Das MDMX-Gen war in 27 % der Weichteilsarkome amplifiziert. Neben dem MDMX-Genamplifikationsstatus wurde auch die Expression der „full-length“-MDMX-mRNA und der MDMX-S-Spleißvariante untersucht. Es stellte sich heraus, dass das Verhältnis „full-length“ MDMX/MDMX-S einen unabhängigen Prognosefaktor für Weichteilsarkome darstellt. Patienten, deren Tumor eine Überexpression der MDMX-S-Spleißvariante aufwies, verstarben durchschnittlich 13 Monate nach Diagnosestellung, während Patienten, bei denen das Verhältnis zu Gunsten der FL-MDMX-mRNA verschoben war, 53 Monate überlebten. Bei der Sequenzanalyse des p53-sensitiven MDM2-P2-Promotors, die in Zusammenarbeit mit A.J. Levine und G.L. Bond (Princeton, USA) durchgeführt wurde, konnte ein Einzelnukleotid-polymorphismus (T>G; SNP309) identifiziert werden. Das G-Allel war in Weichteilsarkompatienten mit einem 12 Jahre früheren Tumoraufreten assoziiert. Weitere Untersuchungen zeigten, dass das G-Allel die Tumorentwicklung vor allem in pre-menopausalen Frauen, nicht jedoch bei Männern, beschleunigen konnte. Bei den Ovarialkarzinomen konnte die Assoziation des G-Allels mit einem früheren Alter der Tumorentstehung nur bei einer Überexpression des Östrogen-Rezeptors beobachtet werden. Diese Daten stützen die Hypothese, dass Geschlechtshormone (hier: Östrogen), die Entwicklung von Tumoren bei Individuen mit einem G/G-Genotyp beschleunigen können. Bei einem SNP im 3'-UTR des MDMX-Gens zeigte sich ebenfalls eine Abhängigkeit von Östrogen-Rezeptor. Bei den von uns untersuchten Ovarialkarzinomen konnten wir ebenfalls zahlreiche Veränderungen des p53-MDM2-MDMX-Pathways detektieren, die einen Einfluss auf das rezidiv-freie und Gesamtüberleben der Patientinnen haben. Interessant war der Befund, dass Patientinnen, deren Tumor das Wildtyp-p53-Protein überexprimierte, die kürzeste Überlebenszeit aufwiesen. Dies zeigt deutlich, dass die isolierte Betrachtung des p53-Gen- bzw. Proteinexpressionsstatus nicht aussagekräftig ist. Des Weiteren zeigen unsere Arbeiten die Bedeutung der Östrogenrezeptorexpression beim Ovarialkarzinom. Obwohl der ER-Status selbst keine prognostische Aussagekraft besitzt, jedoch war das G-Allel des SNP309 bei Patientinnen mit einem ER-positiven Tumor mit einem signifikant früheren Auftreten des Ovarialkarzinoms verbunden.

Bartel, Frank: Genetische Veränderungen im p53-Tumorsuppressorpathway und deren prognostische Relevanz in Weichteilsarkomen und Ovarialkarzinomen. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Medizinische Fakultät, Habilitation, 2008, 59 S., 160 Lit., 12 Abb., 2 Tab., Anlagen

Inhaltsverzeichnis

Bibliographisches Verzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Danksagung

1.	Einleitung	1
1.1.	Der p53-MDM2-MDMX-Pathway und seine Bedeutung im Tumorprozess	1
1.2.	Weichteilsarkome	1
1.3.	Ovarialkarzinome	3
1.4.	MDM2 und MDMX – Gemeinsamkeiten und Unterschiede	5
1.4.1.	MDM2	5
1.4.2.	MDMX	7
1.4.3.	Spleißvarianten der MDM2- und MDMX-mRNA	8
1.5.	Veränderungen des p53-MDM2-Pathways und deren Bedeutung als molekulare Prognosefaktoren	10
1.5.1.	Weichteilsarkome	10
1.5.2.	Ovarialkarzinome	11
1.6.	Die MDM2-MDMX-p53-Interaktion als Ziel einer therapeutischen Intervention	12
1.7.	Zielstellung der Arbeit	14
2.	Material und Methoden	15
2.1.	Methoden	15
2.2.	Tumormaterial und Patientenkollektive	15
2.2.1.	Tumorzelllinien	15
2.2.2.	Patientenkollektive	16
2.3.	Versuchstiere	16
3.	Ergebnisse	18
3.1.	Thematik 1 – Genetische Veränderungen von MDM2, MDMX, p53 bei WTS und OVCA	18
3.1.1.	Nachweis der Amplifikation des MDM2-Gens im WTS und Korrelation mit dem Überleben	18
3.1.2.	Mikrosatellitenanalyse für die MDM2-Marker D12S80b und D12S83a bei WTS	19
3.1.3.	MDMX-Genamplifikation in WTS	20
3.1.4.	MDMX-mRNA-Expression in WTS	21
3.1.5.	Polymorphismen im MDM2-Gen	22
3.1.6.	MDM2-P1- and P2-Transkriptlevels bei WTS-Patienten	25

3.2.	Thematik 2 - Genetische Veränderungen von MDM2 und MDMX bei Ovarialkarzinomen	27
3.2.1.	p53-Mutationen and p53 Proteinexpression.	27
3.2.2.	p53-Status und Ansprechen auf die Chemotherapie	28
3.2.3.	Status des SNP309 im MDM2-P2-Promotor bei Ovarialkarzinomen	29
3.2.4.	p53- und SNP309-Status und der Einfluss auf das Gesamtüberleben.	29
3.2.5.	MDMX-Alterationen in Ovarialkarzinomen (unveröffentlichte Daten)	30
3.3.	Thematik 3 - Spleißvarianten von MDM2 und MDMX - Auftreten, Prognose	31
3.3.1.	Detektion verkürzter Transkripte der MDM2-mRNA in WTS	31
3.3.2.	Detektion von MDM2-Spleißformen in Normalgewebe und Lymphozyten	33
3.3.3.	Charakterisierung der Spleißvarianten der MDM2-mRNA	33
3.4.	Thematik 4 - MDM2 als ein therapeutisches Target für WTS	34
3.4.1.	Etablierung eines WTS-Xenotransplantationsmodells in nu/nu-Ratten	34
3.4.2.	Behandlung von Xenotransplantattumoren mit MDM2-AS-Oligonukleotiden	34
4.	Diskussion	36
4.1.	Molekulare Veränderungen des p53-MDM2-MDMX-Pathways und deren prognostische Bedeutung	36
4.2.	Expression von Spleißvarianten der MDM2-mRNA	43
4.3.	MDM2 als Ziel einer Gentherapie für WTS	45
4.4.	Zusammenfassung und Ausblick	47
5.	Literaturverzeichnis	50
6.	Anhang	60

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AS	antisense
amol	attomol
ATCC	American Type and Tissue Collection – Amerikanische Zell- und Gewebesammlung
bidest.	bidestilliertes Wasser
bp	Basenpaar
cDNA	komplementäre DNA
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dmin	- „double minute chromosomes“ – kurze Doppelchromosomen ohne Zentromer
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	Doppelstrang
dsODN	Doppelstrangoligodesoxynukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FL	„full length“ – in der Arbeit als Synonym für das regulär gespleißte MDM2- bzw. MDMX-Transkript verwendet
g	Gramm
HE	Haematoxylin-Eosin (-Färbung)
IHC	Immunhistochemie
kDa	Kilodalton
LMS	Leiomyosarkom
LOH	„loss of heterozygosity“ – Verlust der Heterozygotie
MBO	“mixed backbone oligonucleotid” – Oligonukleotid, das aus DNA und RNA besteht
MDM2	„murine double minute gene 2“ – in der Arbeit für das humane Homolog HDM2 verwendet; in der Literatur werden beide Bezeichnungen parallel verwendet
MFH	malignes fibröses Histiocytom
MM	Mismatch
mRNA	“messenger RNA” – Boten-RNA
mt	Mutante, mutiert
n.b.	nicht bestimmt
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
ODN	Oligodesoxyribonukleinsäure
PBS	“phosphate buffered saline” – Phosphat-gefufferte Kochsalzlösung
PCR	„polymerase chain reaction“ – Polymerasekettenreaktion
RMS	Rhabdomyosarkom
rpm	„revolutions per minute“ – Umdrehungen pro Minute
RT	reverse Transkription, Raumtemperatur
SE	sense
wt	Wild-Typ
WTS	Weichteilsarkom
zmol	zeptomol

Danksagung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit entstanden während meiner Tätigkeit als Leiter der Juniorgruppe und als Laborleiter am Institut für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Ich möchte an dieser Stelle zunächst die Gelegenheit nutzen, um mich bei den zahlreichen Unterstützern und Begleitern während meiner Forschungen auf dem Gebiet der molekularen Charakterisierung von Tumoren bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt dem Direktor des Instituts für Pathologie, Prof. Dr. Steffen Hauptmann, der mir die Möglichkeit eröffnete, zunächst eine vom Wilhelm-Roux-Programm geförderte Juniorgruppe am Institut anzusiedeln, und mir anschließend anbot, die Leitung des Forschungslabors zu übernehmen. Auch der ehemalige Institutsdirektor, Prof. Dr. Friedrich-Wilhelm Rath, hat die Arbeiten des Forschungslabors allseits unterstützt.

Für die Unterstützung zu Beginn meiner Arbeiten in Halle möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Helge Taubert (jetzt Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie) und Prof. Dr. Peter Würfl (jetzt Klinikum Flensburg) bedanken. Nur durch die enge Zusammenarbeit und die zahlreichen Diskussionen zwischen Forschern und Klinikern konnten wir so erfolgreich sein.

Einen wesentlichen Beitrag zum Gelingen der hier beschriebenen Arbeiten leisteten alle wissenschaftlichen Mitarbeiter, Doktoranden, Diplomanden und technischen Mitarbeiterinnen des Forschungslabors der Pathologie. Hervorheben möchte ich an dieser Stelle Dr. Hannelore Schmidt, Anja Böhnke (MDMX-Charakterisierung im Ovarialkarzinom), Dr. Matthias Kappler (SNPs im MDM-Gen bei Weichteilsarkomen), Juliane Jung (p53-Status und SNPs im Ovarialkarzinom), Anja Wolf (MDM2/MDMX-Spleißvarianten im Ovarialkarzinom), Stefanie Hammer (MDMX als therapeutisches Target im Ovarialkarzinom) sowie die technischen Mitarbeiterinnen Birgit Wypior, Ilona Wiederhold, Ute Rolle und Kathrin Spröte. Es war und ist immer ein anspornender Teamgeist im Labor vorherrschend.

Des Weiteren bin ich den Pathologen des Instituts für die Hilfe bei der Erstellung der Patientenkollektive und die zahlreichen Diskussionen dankbar. Dieser Dank gilt ganz besonders Katarina Balschun (jetzt Universität Kiel), Dr. Elise Gradhand, Dr. Wolfgang Schmitt und Dr. Martin Köbel (Vancouver), die mir viele wertvolle Informationen vor allem zu den gynäkologischen Tumoren gegeben haben.

Für die Unterstützung bei der Durchführung der *in vivo* MDM2-AS-Therapiestudien danke ich Frau Ulrike Rolle und Frau Claudia Vogel aus dem histologischen Labor der Chirurgischen Klinik I des Universitätsklinikums Leipzig.

Die Sequenzanalysen wurden freundlicherweise von Herrn PD Dr. Georg Kaltenborn sowie von Dr. Dorothea Darmer am Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung der Medi-

zinischen Fakultät der Universität Halle durchgeführt. Herrn Prof. Dr. Hans Heynemann (Klinik für Urologie, Universität Halle), der Fa. Chiron und Dr. Karen Blümke danke ich für die Unterstützung bei den Arbeiten am Nierenzellkarzinom. Ein weiterer besonderer Dank gilt Frau Dr. Anne-Kathrin Rost und Herrn Dr. Thomas Köhler der Fa. Roboscreen (Leipzig) für die Hilfe bei der Entwicklung von Assays zur Quantifizierung von mRNAs.

Im November 2001 hatte ich die Gelegenheit, am I. Internationalen MDM2-Workshop in Dundee (Schottland) teilzunehmen. Dies war in mehrfacher Hinsicht ein wichtiger Kongress für mich. Ich konnte dort in unvergleichlicher Atmosphäre als Doktorand meine Ergebnisse vorstellen. Ich war überrascht, wie leicht man mit den „Großen“ der MDM2/p53-Community sprechen konnte. So etwas hatte ich auf Kongressen noch nie erlebt. Dort traf ich Kollegen, die meine weiteren Arbeiten maßgeblich mit beeinflusst haben. Zum Beispiel verbindet mich seitdem eine enge Freundschaft und Zusammenarbeit mit Aart G. Jochemsen (Leiden University Medical Center), dem „Entdecker“ des MDMX. Die Untersuchungen zu Veränderungen von MDMX in Tumoren bilden seitdem einen wesentlichen Schwerpunkt meiner Arbeiten. In Dundee traf ich auch das erste Mal mit Gareth Bond zusammen, der damals Postdoc im Labor von Arnie Levine in Princeton war. Mit Gareth und Arnie haben wir seitdem zahlreiche Studien zur Bedeutung von SNPs im p53-Pathway in Weichteilsarkomen und Ovarialkarzinomen durchgeführt und publiziert.

Ein besonderer Dank gilt auch Linda Harris vom *St. Jude Children's Research Hospital* (SJCRH) in Memphis, Tenn., und dem *American Lebanese Syrian Associated Charities* (ALSAC), die mir die Möglichkeit gegeben haben, mehrere Monate an diesem wunderbaren Ort zu arbeiten. Es herrschte dort eine ganz besondere Atmosphäre, die durch das Motto des Gründers des SJCRH, Danny Thomas, geprägt war: „*No child should die in the dawn of life*“.

Ferner danke ich Chris Marine vom VIB in Gent (Belgien), Gigi Lozano (University of Texas, Houston, USA), Dr. Stephen Jones (University of Massachusetts, Worcester, USA) sowie Masha Poyurovsky (Columbia University, New York, USA) für die spannenden und überaus konstruktiven Diskussionen über MDM2 und die Überlassung unveröffentlichter Daten.

Für den sprachlichen Feinschliff der Arbeit danke ich ganz herzlich „dem Hüter der deutschen Sprache“ – Peter Sommer.

Mein besonderer Dank gilt meiner Frau Marion für ihre vielfältige Unterstützung und den steten Zuspruch bei der Anfertigung der Arbeit sowie meinen Kindern Jasper und Neele, die mich beim Schreiben mit ihrem Lachen immer wieder aufgemuntert haben.

1 Einleitung

1.1 Der p53-MDM2-MDMX-Pathway und seine Bedeutung im Tumorprozess

Die Kontrolle und das Aufrechterhalten der genomischen Integrität sowie eine strikte Regulation des Zellzyklus sind unerlässlich für die Tumorsuppression, aber auch für das Ansprechen auf eine Chemotherapie und/oder Bestrahlung. Ein Schlüsselprotein für die Wirksamkeit einer Vielzahl von Chemotherapeutika ist der Tumorsuppressor p53. Nach einer Schädigung der DNA, z.B. durch Carboplatin, aktiviert p53 verschiedene Signalwege, die einerseits zum Zellzyklusarrest führen andererseits Apoptose auslösen können. Obwohl p53 in etwa 50 % der malignen Tumoren KEINE Mutationen aufweist, ist der p53-Tumorsuppressor-Pathway in seiner Funktion gestört, z.B. aufgrund der Überexpression von negativen Regulatoren. Dazu zählen unter anderem die Proteine MDM2 und MDMX.

Im Rahmen meiner Forschungstätigkeit habe ich mich intensiv mit der Aufklärung der Mechanismen, die zur Fehlregulation des p53-MDM2-MDMX-Pathways in Tumoren führen, beschäftigt. Dies schließt Alterationen wie z.B. Mutationen und Polymorphismen, Genamplifikationen, Überexpression der mRNA bzw. des Proteins sowie die Expression von Spleißvarianten ein. Alle diese Veränderungen können eng mit dem Krankheitsverlauf und dem individuellen Progression betroffener Patienten korrelieren. Des Weiteren stand die Aufgabe im Mittelpunkt, neue molekulare Targets für alternative und/oder ergänzende Tumorthérapien zu identifizieren. Untersuchungsobjekte waren die seltene, histologisch und tumorbilologisch äußerst heterogene Gruppe der Weichteilsarkome und die vergleichsweise häufigen, klinisch jedoch ebenso problematischen Ovarialkarzinome.

1.2 Weichteilsarkome

Alle malignen Tumoren des nichtepithelialen und extraskelatalen Gewebes sowie neuroektodermale Malignome des peripheren und autonomen Nervensystems mit Ausnahme des retikuloendothelialen Systems, der Glia und des Stützgewebes parenchymatöser Organe werden unter dem Begriff Weichteilsarkome (WTS) zusammengefasst²⁹. Der Anteil der WTS an malignen Geschwülsten im Erwachsenenalter beträgt ca. 1 %^{29,61}. Für die Bundesrepublik Deutschland bedeutet dies, dass jährlich etwa 800 bis 1500 Neuerkrankungen auftreten³⁹.

WTS stellen eine sehr heterogene Tumorgruppe dar. Man unterscheidet etwa 150 Entitäten und Subtypen. Die Histogenese der WTS ist weitgehend ungeklärt. Es wird angenommen, dass sich WTS aus undifferenzierten, mesenchymalen Stammzellen entwickeln. Die

Tumorbezeichnung spiegelt nicht deren Histogenese wider, sondern vielmehr den durch Differenzierungs- bzw. Dedifferenzierungsprozesse erreichten Phänotyp^{53,60}. Ein Liposarkom ist demnach ein WTS mit Differenzierungsmerkmalen, die denen des Fettgewebes ähneln. Etwa 15 % aller WTS lassen sich keiner bestimmten Entität zuordnen²⁹.

Neben der Einteilung in die verschiedenen histologischen Subklassen dient die Definition des Malignitätsgrades (Grading) als wichtigstes Kriterium dem Ziel, das biologische Verhalten eines Tumors möglichst genau voraussagen zu können. Bei der Bestimmung der einzelnen Faktoren zur Ermittlung des Gratings kommt es sowohl bei einfachen als auch bei komplexen Systemen zu individuellen Begutachtungsschwankungen. Die Einteilung von Tumoren in verschiedene Stadien („Staging“) beruht neben dem Grading auch auf der TumorgroÙe, der Tumorlokalisation, dem Verhalten zur Umgebung, dem Lymphknotenbefall sowie dem Vorliegen von Fernmetastasen⁹.

Ein weiteres charakteristisches Merkmal von WTS, das ebenfalls zur besonderen klinischen Problematik dieser Tumorgruppe beiträgt, ist ihre ausgeprägte Lokisationsvielfalt. Dies führt zusammen mit einem oftmals beschwerdefreien Wachstum häufig zu einer späten Diagnosestellung, so dass bis zu 20 % der Patienten zu diesem Zeitpunkt bereits nachweisbare Fernmetastasen haben^{29,60}. Die Prognose der WTS ist vergleichsweise ungünstig. So beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate für alle WTS-Entitäten 55 %, die 10-Jahres-Überlebensrate wird mit 38 % angegeben^{58,109}. Als Hauptgründe für diese schlechte Prognose werden die bereits erwähnte späte Diagnosestellung mit dem daraus folgenden hohen Stadium sowie eine inadäquate Erstbehandlung, aber auch besondere tumorbiologische, nur molekular erfassbaren Eigenschaften genannt. Eine frühe und umfassende Ausnutzung der diagnostischen Möglichkeiten ist daher für eine erfolgreiche Therapieplanung und die Senkung der Mortalitätsrate unerlässlich³⁶.

Die radikale chirurgische Entfernung des Tumors (R0-Resektion) bildet die Hauptsäule der Therapie von WTS¹⁵³, da diese Tumoren oft eine ausgeprägte Resistenz gegenüber Strahlen- und Chemotherapie zeigen. Diese Therapieformen spielen bei der Planung des Gesamttherapiekonzepts deswegen eine untergeordnete Rolle. Die Anwendung der Chemotherapie zeigt daher oftmals nur eine geringe Verbesserung des Gesamtüberlebens¹²⁰.

Für WTS-Patienten eine individualisierte Prognose zu erstellen oder eine prädiktive Aussage über den Effekt einer Therapie zu treffen, gestaltet sich äußerst schwierig. WTS gelten im Vergleich zu anderen Tumorarten wegen ihrer Charakteristika als Sonderfälle der Onkologie und der Chirurgie.

Als Konsequenz der genannten Besonderheiten ist es notwendig, zusätzlich zu den bisherigen klinischen und histomorphologischen Prognosemarkern, WTS intensiv molekulargenetisch zu charakterisieren und Gene bzw. Proteine zu identifizieren, die maßgeblich an der Genese von WTS beteiligt sind und exaktere prognostische Vorhersagen erlauben. Daraus leiten sich schließlich möglicherweise alternative Therapieverfahren ab, die den Tumor für eine Bestrahlung oder Chemotherapie sensibilisieren oder einen für den Tumor essentiellen Signalweg beeinflussen.

1.3 Ovarialkarzinome

Das Ovarialkarzinom ist in vielen westlichen Ländern nach dem Zervix- und dem Endometriumkarzinom das dritthäufigste weibliche Genitalkarzinom. Es weist jedoch von allen gynäkologischen Malignomen die höchste Sterblichkeitsrate auf. In Deutschland erkranken jährlich mehr als 8000 Frauen an einem Ovarialkarzinom. Aufgrund des relativ beschwerdefreien Wachstums befinden sich zum Zeitpunkt der Diagnosestellung etwa 75 % der Tumoren bereits in einem fortgeschrittenen Stadium²². Jährlich versterben mehr als 6000 Patientinnen an einem Ovarialkarzinom. Damit steht es an fünfter Stelle bei den Krebstodesursachen der Frauen. Die Sterberate hat sich seit vielen Jahrzehnten nicht verringert. Das Manifestationsalter liegt meist zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr. Ovarialkarzinome können jedoch auch bei Mädchen und jungen Frauen auftreten. Die Überlebensraten für Patientinnen mit Ovarialkarzinomen sind gering. Sie betragen ein Jahr nach der Diagnose 66 %, 45 % nach drei Jahren sowie 37 %, in spezialisierten Zentren 45 %, fünf Jahre nach Diagnosestellung²¹.

Trotz der Verbesserungen in der Medizin sind die Langzeitüberlebenschancen für Patientinnen mit einem fortgeschrittenen Ovarialkarzinom nach wie vor sehr schlecht. Deswegen wäre es hier von besonders großer Bedeutung, die Tumoren bereits im Frühstadium zu erkennen. Da auch molekulare Ursachen weitestgehend unbekannt sind, ist es wichtig, epidemiologische Risikofaktoren zu kennen und diese in die Prävention und Früherkennung einzu beziehen. Zu diesen Risikofaktoren zählen u.a. das Alter der Frau sowie hormonelle Einflüsse. Eine frühe Menarche, Kinderlosigkeit, fehlende Stillzeiten wirken sich ungünstig aus. Die Einnahme hormoneller Ovulationshemmer, Schwangerschaften sowie Laktation sind hingegen mit einem verminderten Risiko verbunden^{106,126,136,146}. Die Ursache der protektiven Wirkung von oralen Kontrazeptiva oder Schwangerschaften liegt vermutlich darin, dass sie die Reparationsphasen des ovariellen Oberflächenepithels *post ovulationem* reduzieren. Etwa 5-10 % der Ovarialkarzinome sind genetisch bedingt. Bei diesen Patientinnen findet man

Keimbahnmutationen in den Genen BRCA1 und BRCA2, deren Genprodukte an der DNA-Reparatur beteiligt sind¹⁴⁴. Dadurch wird das Risiko, an einem Ovarial- oder Mammakarzinom zu erkranken, stark erhöht. Die Früherkennung des Ovarialkarzinoms beschränkt sich zurzeit auf regelmäßige gynäkologische Untersuchungen. Als weitere Methode ist das Screening des Tumormarkers CA125 hinzugekommen. Bei 25-50 % der Tumoren im Stadium I und 90 % der Tumoren im Stadium II ist der CA125-Wert im Blut erhöht¹⁶⁰. Es gibt jedoch eine Reihe weiterer gynäkologischer und nicht-gynäkologischer Krankheitsbilder, bei denen der CA125-Wert ebenfalls erhöht ist, weswegen sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität dieses Tests ihn nicht als verlässliches Screening qualifizieren.

Histologisch gliedert man das Ovarium in ein Oberflächenepithel (Müller-Epithel), das ovarielle Stroma und die Keimzellen. Aufgrund dieser drei Gewebekomponenten werden laut WHO-Klassifikation drei Hauptgruppen von Tumoren unterschieden: epitheliale, Keimstrang-Stroma- und Keimzelltumoren. 90 % der Ovarialmalignome sind Karzinome. Diese lassen sich in mehrere histologische Gruppen einteilen:

- serös: charakteristisches Merkmal sind tubenähnliche Entdifferenzierung
- muzinös: diese Tumoren sind durch ein hochprismatisches, schleimbildendes Epithel gekennzeichnet
- endometroid: aus konfluenten, atypischen endometroiden Drüsen aufgebaute Tumoren
- klarzellig: ein wichtiges Merkmal ist das wasserhelle Zytoplasma
- transitionalzellig: also dem Urothel ähnelnd
- nicht klassifizierbare Tumoren.

Das seröse Ovarialkarzinom ist der häufigste maligne Tumor des Ovars, gefolgt vom endometroiden und klarzelligem Ovarialkarzinom.

Zum Grading von Ovarialkarzinomen werden verschiedene Systeme verwendet. Oftmals gibt es jedoch Probleme in Bezug auf die Reproduzierbarkeit und die Konsistenz. Von Silverberg wurde ein universelles Grading-System erarbeitet¹²⁵, das praktikabel ist. Es gibt eine signifikante Korrelation zwischen dem histologischen Grad, dem Tumorstadium und dem Überleben. Schlecht differenzierte Karzinome sind häufig in einem fortgeschrittenen Stadium, während die meisten der Grad-1-Tumoren sich in einem frühen Krankheitsstadium befinden. Neben der Aszitesmenge ist das Grading der wichtigste Prognosefaktor für Patientinnen im Stadium I. Eine genaue Bestimmung des Tumorgrades ist gerade für diese Patientinnen außerordentlich wichtig, da sich daraus die weiteren therapeutischen Maßnahmen ableiten. Die

Stadieneinteilung erfolgt nach Vorgaben der *Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique* (FIGO) und des *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) ¹⁴⁸.

Jeder klinisch nachgewiesene Tumor des Ovars muss operativ entfernt und histologisch beurteilt werden. Das Ausmaß des Eingriffs wird vor allem von der Art des Tumors und dessen Ausbreitung bestimmt, aber auch das Alter der Patientin und ihr Allgemeinzustand sind zu berücksichtigen. Während der Operation erfolgen die Exploration des gesamten Bauchraums und seiner Organe sowie eine Peritoneallavage des Beckens und die Bestimmung des Lymphknotenstatus. Die oberste Priorität hat die komplette Tumorentfernung während des Ersteingriffs. Der operativen Entfernung schließt sich außer bei Patientinnen mit Ovarialkarzinomen im FIGO Stadium IA eine adjuvante Chemotherapie an. Die momentane Standardtherapie besteht in einer Kombinationsbehandlung aus einem Platinanalogon und Paclitaxel. Nur etwa die Hälfte der Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom erfährt durch die Primärtherapie mit einer Platin-Taxan-Kombination eine Komplettremission. Bei den meisten Frauen tritt innerhalb der ersten 3 Jahre ein Rezidiv auf. Dabei unterscheidet man zwischen einem primären Progress, einem Früh- bzw. einem Spätrezidiv (innerhalb bzw. 6 Monate nach Primär-OP). Trotz der Fortschritte bei der chirurgischen und chemotherapeutischen Behandlung von Ovarialkarzinomen zählen daher nur etwa 20 % der Patientinnen zu den Langzeitüberlebenden. Aus diesem Grund gehen die Bestrebungen dahin, die Resistenzentwicklung zu beeinflussen bzw. zu prognostizieren, um auf diese Weise die Therapie zu individualisieren.

1.4 MDM2 und MDMX – Gemeinsamkeiten und Unterschiede

1.4.1 MDM2

Das MDM2-Gen wurde als eines von drei amplifizierten Genen „double minute“ Chromosomen (dmin) in der spontan transformierten Mauszelllinie 3T3DM entdeckt ¹⁴. Bei der Analyse der einzelnen Gene stellte sich heraus, dass nur das Produkt des murine double minute Gen 2 (MDM2) in der Lage ist, nach Transfektion in Fibroblasten die Zellen zu transformieren ³². Dies äußerte sich in unkontrolliertem und tumorauslösendem Wachstum der Zellen. Das MDM2-Onkoprotein geriet anschließend sehr schnell in das Blickfeld des Interesses, weil entdeckt wurde, dass es an den Tumorsuppressor p53 binden ⁹⁰ und diesen effizient inaktivieren kann ⁴⁸.

Das humane MDM2-Gen ist auf dem Chromosomenarm 12q13.14 lokalisiert, einer Region, die in nahezu 1/3 aller Sarkome amplifiziert vorliegt⁹⁶ und in der Ovarialkarzinome häufig Zugewinne aufweisen⁴⁹. Es kodiert für ein 90 kDa Protein^{14,32}. Von MDM2 sind verschiedene Isoformen (Abb. 1-1) bekannt, die durch die Nutzung unterschiedlicher Promotoren oder durch alternatives Spleißen entstehen^{45,98,124}. Die wichtigste und bei weitem am besten untersuchte Funktion von MDM2 ist die Bindung und Inaktivierung von p53^{38,90}. Mit der N-terminalen Domäne kann MDM2 an die α -Helix der transaktivierenden Domäne von p53 binden. Die am stärksten konservierte Domäne des MDM2-Proteins ist die C-terminale RING-Finger-Region, die eine Ubiquitin-Ligase-Aktivität gegenüber p53 besitzt, wodurch es p53 für den proteasomalen Abbau markiert. Somit kann MDM2 durch Bindung an p53 nicht nur dessen transaktivierende Domäne blockieren, sondern auch dessen Degradation einleiten^{48,69,97}. Gleichzeitig wird durch wt-p53 die Expression des MDM2-Gens induziert. Dies ge-

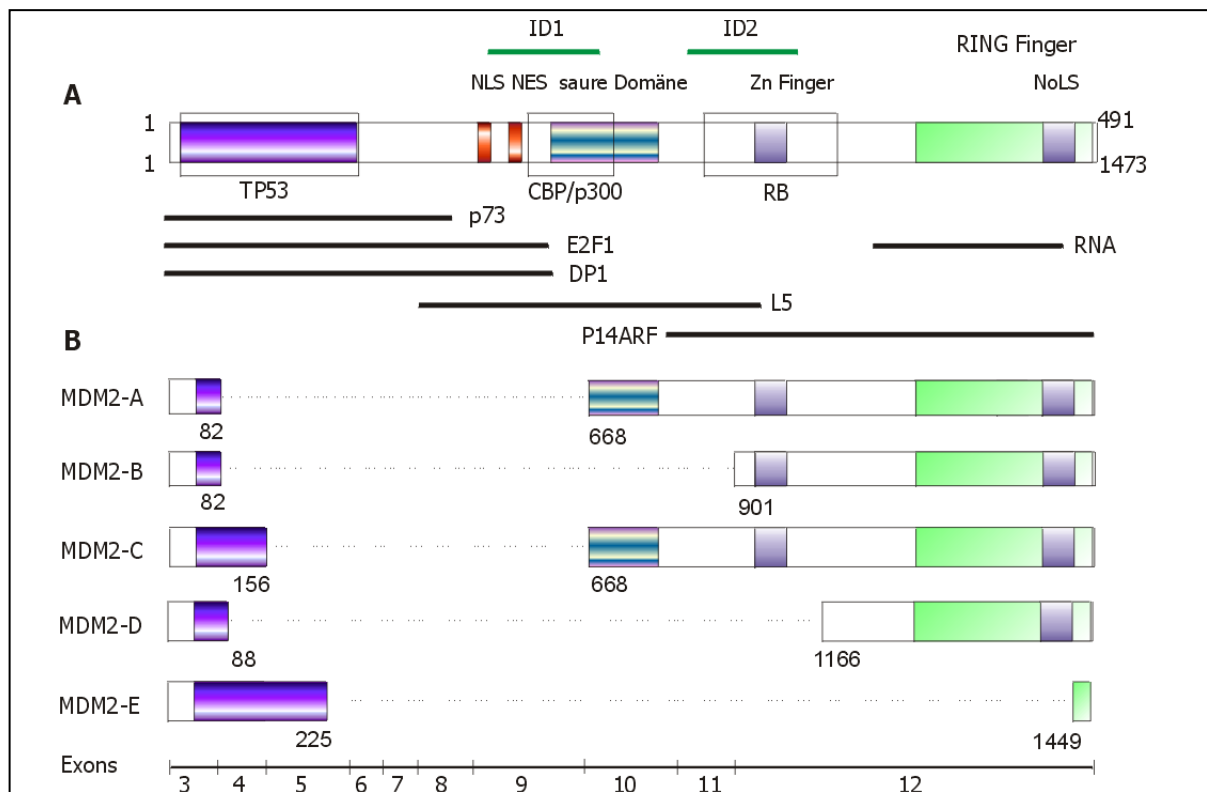
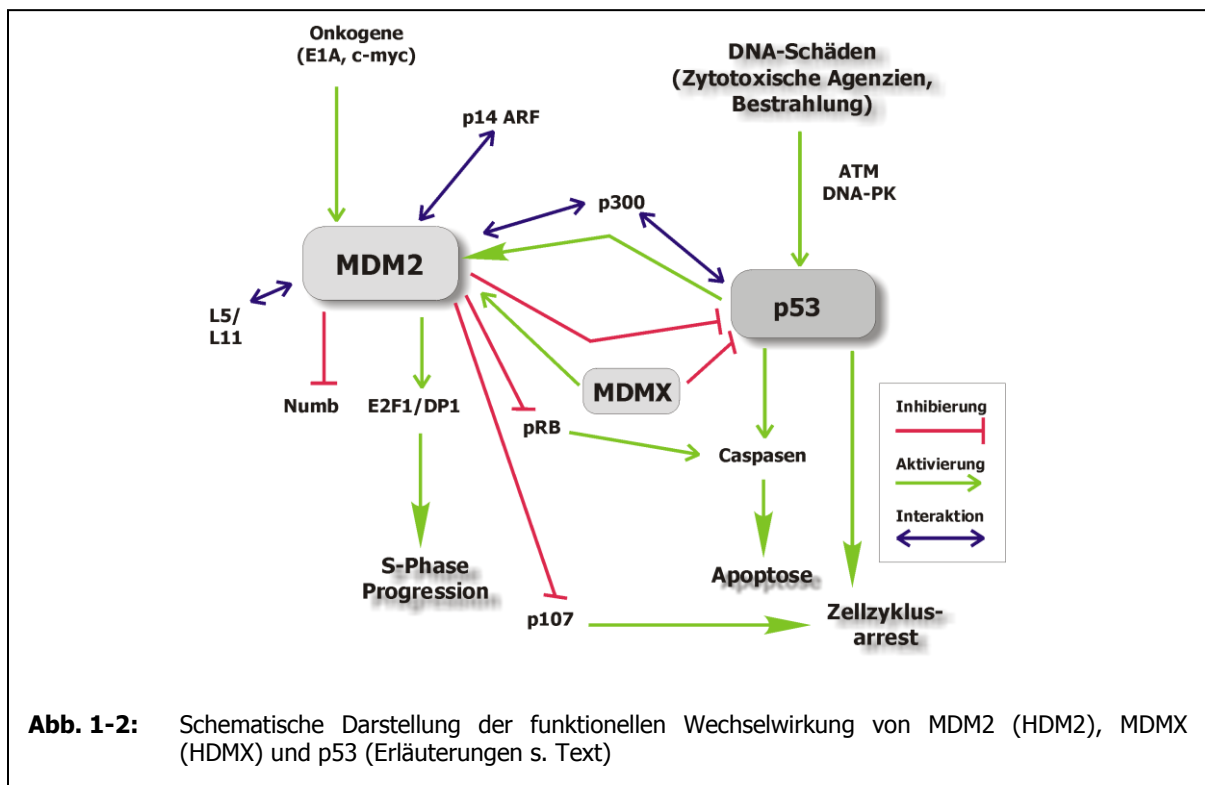


Abb. 1-1: Struktur des Onkogens MDM2 und verschiedener Isoformen

A. Das Produkt des Onkogens MDM2 besteht aus 491 Aminosäuren (die kodierende Region der cDNA aus 1473 Nukleotiden), die funktionellen Domänen sind durch farbige Boxen, die Bindungsstellen mit weiteren Proteinen durch horizontale Linien symbolisiert. ID1 und ID2 repräsentieren die beiden wachstumshemmenden Domänen. **B.** Durch RT-PCR konnten verschiedene alternativ (A, B, C) und aberrant (D, E) gespleißte mRNA-Transkripte detektiert werden¹²⁴. Diesen verkürzten Transkripten fehlen Teile der p53-bindenden Domäne, sowie der NLS und der NES-Sequenz. Die Zahlen repräsentieren jeweils das letzte und das erste in der cDNA der Spleißform enthaltene Nukleotid in Bezug auf die full-length MDM2-cDNA. NLS bzw. NoLS – Kernlokalisierungssequenz, NES – Kernexportsequenz.

schieht über den p53-spezifischen Promotor P2, der im Intron 1 des MDM2-Gens lokalisiert ist¹⁵⁸. Das Produkt des Onkogens MDM2 und der Tumorsuppressor p53 sind somit durch einen so genannten autoregulatorischen „Feedback“-Loop (Abb. 1-2) miteinander verbunden¹⁰⁴. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass das Transkript, das vom P2-Promotor abgelesen wird, einen verkürzten 5'-untranslatierten Bereich aufweist und im Vergleich zum P1-Transkript wesentlich effektiver translatiert wird. Somit trägt die durch p53 induzierte MDM2-Expression zu einem beschleunigten Abbau von p53 bei¹. Es konnte bereits für viele Tumorarten gezeigt werden, dass es zu Veränderungen des MDM2-Gens bzw. -Proteins im Sinne von Genamplifikation bzw. Überexpression kommt (Review in⁹⁹). Sie stellen neben Genmutationen eine zusätzliche Möglichkeit zur Inaktivierung von p53 dar. Diese Mechanismen sind auch mit für die in der Klinik beobachteten Resistenzentwicklungen gegen Therapien mit Chemotherapeutika bzw. Bestrahlungen verantwortlich.



1.4.2 MDMX

MDMX ist ein Protein, das sehr große Ähnlichkeiten zu MDM2 aufweist^{122,123}. Das Gen ist auf dem Chromosom 1 in der Region 1q32 lokalisiert, einer Region, die in Ovarialkarzinomen ebenfalls häufig Veränderungen aufweist^{40,49}. Es konnte gezeigt werden, dass MDMX ebenfalls an p53 binden und so dessen Aktivität inhibieren kann. MDMX besitzt jedoch im

Gegensatz zu MDM2 keine Ligaseaktivität und kann daher p53 nicht für den proteasomalen Abbau markieren⁵⁷. Daten aus *Knock-out*-Experimenten zeigten, dass MDMX-null-Mäuse sehr früh während der Embryonalentwicklung sterben. Dies kann durch die gleichzeitige Inaktivierung des p53-Gens verhindert werden. Somit konnte bewiesen werden, dass neben MDM2 auch MDMX eine wichtige Funktion bei der Regulierung der p53-Aktivität spielt¹⁰⁰, aber auch, dass beide Proteine in voneinander unabhängigen Pathways integriert sind⁸⁷. Bislang gibt es nur sehr wenige Untersuchungen zur Bedeutung von MDMX in Tumoren. Einige Daten weisen darauf hin, dass das MDMX-Gen in besonders aggressiven Glioblastomen amplifiziert vorliegt^{117,118} und in vielen Tumorzelllinien (einschl. Ovarialkarzinomzelllinien) das Protein überexprimiert wird¹¹². Aktuelle Untersuchungen an der Zelllinie MCF-7 (einer Mammakarzinomzelllinie) von Danovi *et al.* zeigen, dass das onkogene Potential von MDMX auf die Amplifikation des MDMX-Gens und die Überexpression des Proteins zurückzuführen ist²⁴. Im Hinblick auf eine klinische und prognostische Relevanz von MDMX-Veränderungen im Ovarialkarzinom gibt es noch keine Daten aus der Literatur.

1.4.3 Spleißvarianten der MDM2- und MDMX-mRNA

Vor Beginn dieser Arbeit sind insgesamt fünf alternativ bzw. aberrant gespleißte mRNA-Transkripte in Blasen- und Ovarialkarzinomen beschrieben worden¹²⁴. Diesen verkürzten Transkripten fehlen unterschiedlich große Teile der p53-bindenden und der sauren Domäne sowie die Kernlokalisierungs- und die Kernexportsequenz (NLS bzw. NES). In einem *in vitro*-Assay zeigte sich, dass alle Isoformen in der Lage sind, Fibroblastenzellen zu transformieren. Sie besitzen demnach tumorigene Eigenschaften. Bemerkenswert ist außerdem eine Korrelation zwischen dem Auftreten von Spleißformen und einem aggressiveren Tumorverhalten (höherer Tumorgrad, Tumorstadium, Invasivität) in verschiedenen Tumorarten¹²⁴. Die Tatsache, dass die bisher beschriebenen Isoformen von MDM2 nicht mehr an p53 binden können, hat u.a. zur Folge, dass der autoregulatorische MDM2-p53-feedback-Loop aus dem Gleichgewicht gerät. Dadurch wird auf diese Weise unter Umständen die Tumorbildung gefördert. Es wird auch vermutet, dass bestimmte onkogene Eigenschaften von MDM2 in der C-terminalen Region (enthält den RING-Finger) lokalisiert sind und diese in den Isoformen verstärkt zur Geltung kommen.

Trotz oder gerade wegen der hier geschilderten Ergebnisse wirft die Existenz von MDM2-Isoformen zahlreiche bislang unbeantwortete Fragen auf, z.B.:

1. Ist die Expression von MDM2-Spleißformen auf Tumoren beschränkt oder findet man sie auch in Normalgewebe?

2. Wenn ja, haben die Produkte der alternativen Spleißformen eine normale physiologische Bedeutung, z.B. bei der Differenzierung?
3. Welche der Aktivitäten (Transformation, Apoptoseinduktion usw.) lassen sich dem „full-length“-MDM2 (FL-MDM2) bzw. den Spleißformen zuordnen?
4. Welchen Einfluss haben die Spleißformen auf die p53-Stabilität und –Aktivität?
5. Gibt es einen Zusammenhang zwischen der Amplifikation des MDM2-Gens und dem Auftreten von Spleißformen?
6. Hat die Expression von MDM2-Spleißvarianten einen Einfluss auf die individuelle Prognose eines Patienten und das Ansprechen auf bestimmte Therapieformen?

Die oben genannten Fragen zeigen, dass die Analyse der Expression und der Funktion von alternativen Spleißformen der MDM2-mRNA in Tumoren im Allgemeinen und bei WTS im Speziellen eine außerordentliche Bedeutung hat. Gleichzeitig wird auch die Notwendigkeit deutlich, Methoden zu entwickeln, die eine schnelle Charakterisierung von Spleißformen ermöglicht, da auch von vielen anderen Genen Spleißvarianten exprimiert werden ⁴⁶.

1999 wurde auch für die MDMX-mRNA eine verkürzte Form identifiziert, welche als MDMX-S (short) bezeichnet wurde (Abb. 1-3). Diese Spleißvariante ist durch eine Deletion von Exon 6 (68 bp) charakterisiert. Diese Deletion führt nach Codon 114 zu einer Verschiebung des Leserahmens. Dadurch entsteht ein Stopcodon bei Aminosäurerest 127 im Maus-

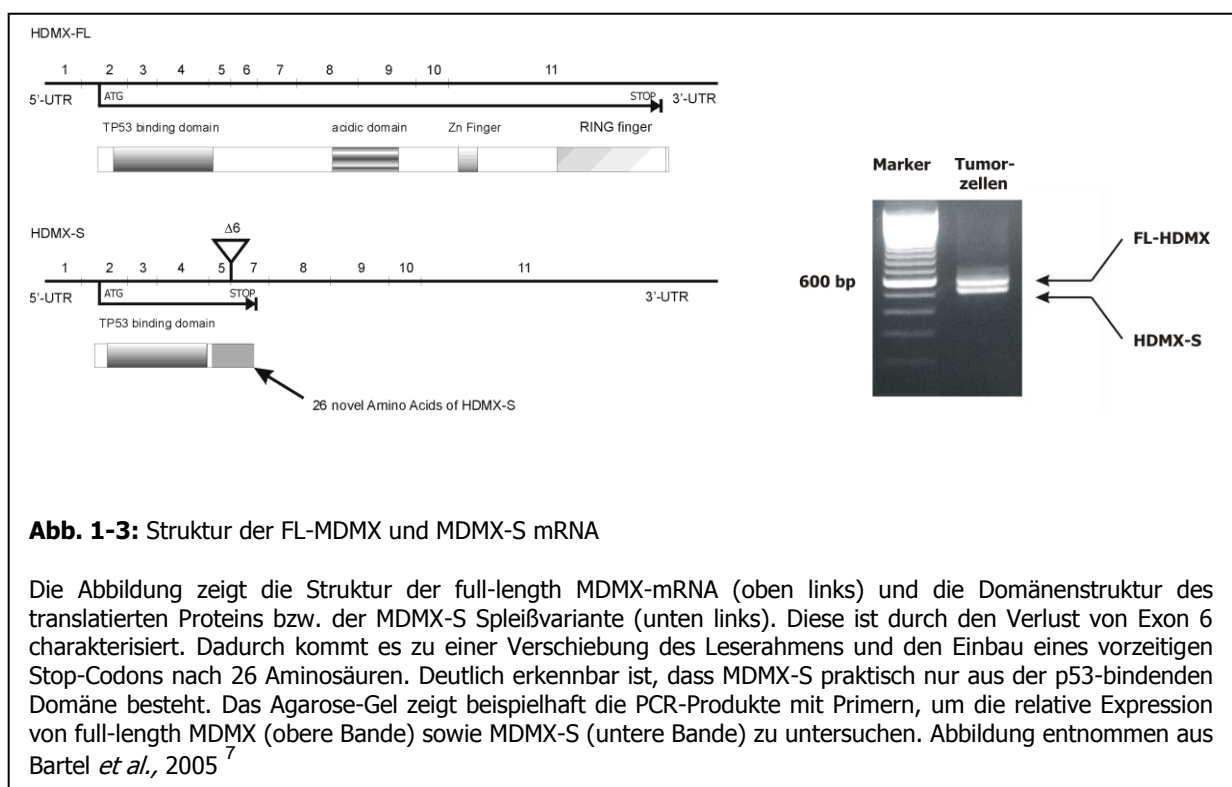


Abb. 1-3: Struktur der FL-MDMX und MDMX-S mRNA

Die Abbildung zeigt die Struktur der full-length MDMX-mRNA (oben links) und die Domänenstruktur des translatierten Proteins bzw. der MDMX-S Spleißvariante (unten links). Diese ist durch den Verlust von Exon 6 charakterisiert. Dadurch kommt es zu einer Verschiebung des Leserahmens und dem Einbau eines vorzeitigen Stop-Codons nach 26 Aminosäuren. Deutlich erkennbar ist, dass MDMX-S praktisch nur aus der p53-bindenden Domäne besteht. Das Agarose-Gel zeigt beispielhaft die PCR-Produkte mit Primern, um die relative Expression von full-length MDMX (obere Bande) sowie MDMX-S (untere Bande) zu untersuchen. Abbildung entnommen aus Bartel *et al.*, 2005 ⁷

protein bzw. ein Stopcodon bei Aminosäurerest 140 im humanen Gewebe¹¹⁰. Diese Isoform enthält die komplette p53-Bindedomäne und einige alternative C-terminale Aminosäuren (Abb. 1-2). Es konnte gezeigt werden, dass MDMX-S mit einer höheren Affinität als full-length MDMX an p53 bindet und effizienter in den Zellkern transportiert wird. MDMX-S unterdrückt die p53-vermittelte Transkription stärker als MDMX. Ursache für diese hohe Affinität sind die durch Verschiebung des Leserahmens neu entstandenen C-terminalen Aminosäuren. Weiterhin ist das MDMX-S Protein stabiler als MDMX, da es aufgrund der fehlenden RING-Fingerdomäne nicht mit HDM2 interagieren kann und so vor dem MDM2-vermittelten Abbau geschützt ist¹¹¹. MDMX-S stellt somit eine weitere Möglichkeit zur Blockierung der p53-Aktivität dar.

1.5 Veränderungen des p53-MDM2-Pathways und deren Bedeutung als molekulare Prognosefaktoren

1.5.1 Weichteilsarkome

Das Onkogen MDM2 und das Tumorsuppressorgen p53 spielen auch in WTS eine Rolle. In einer Studie von Taubert *et al.*¹³¹ wurde in WTS von insgesamt 146 Patienten der p53-Mutationsstatus bestimmt. Dabei konnte in 16 % der Fälle ein mutiertes p53-Gen detektiert werden^{130,131}. Das MDM2-Gen ist in WTS in bis zu 30 % der Fälle amplifiziert⁸⁹, wobei die Amplifikationsfrequenz zwischen den einzelnen WTS-Entitäten stark variiert: während in Leiomyosarkomen kein bisher untersuchter Tumor ein amplifiziertes MDM2-Gen aufweist, lag in ca. 30 % der untersuchten Liposarkome das MDM2-Gen amplifiziert vor. Weiterhin wurde in zahlreichen WTS sowohl eine Überexpression der mRNA³⁷ als auch des Proteins beschrieben^{74,107}. Von zwei Arbeitsgruppen wurde eine Korrelation zwischen der MDM2-Proteinüberexpression und einer schlechten Prognose nachgewiesen^{23,150,152}. In Abhängigkeit vom eingesetzten Antikörper (N-terminales vs. C-terminales Epitop) erwies sich die alleinige MDM2-Überexpression als negativer Prognosemarker (RR=2,6; p=0,0035). Es zeigte sich, dass Patienten, die zusätzlich p53 überexprimieren, ein 4,6-fach erhöhtes Risiko besitzen (p=0,00001), am Tumor zu versterben. Für Patienten mit Extremitätentumoren war die prognostische Relevanz dabei am höchsten (RR=19; p=0,006)¹⁵¹. Diese Daten zeigen, dass die gemeinsame Überexpression von MDM2 und p53 ein unabhängiger negativer Prognosefaktor für WTS ist.

Ein anderes Bild ergibt sich, wenn man den Einfluss der MDM2-mRNA-Expression auf die Prognose betrachtet, denn in diesem Fall besitzen Patienten mit einer sehr niedrigen

(RR=13) bzw. einer sehr hohen mRNA-Menge eine schlechtere Prognose im Vergleich zu Patienten mit einer nur leicht erhöhten MDM2-mRNA-Expression¹³⁵. Demgegenüber weisen Patienten mit einer stark erhöhten MDM2-mRNA-Menge ebenso eine schlechtere Prognose auf. Für diese Patienten ist das Risiko, am Tumor zu versterben, 3,2-fach erhöht¹³⁵. Diese Befunde können dadurch erklärt werden, dass im Tumor die Menge an MDM2-mRNA-Transkripten, die vom p53-sensitiven Promotor P2 stammen, aufgrund einer p53-Fehlfunktion reduziert ist⁸⁸. Eine leicht erhöhte MDM2-mRNA-Menge entspricht daher eher dem physiologischen Normalzustand und MDM2 kann so seine Funktionen, wie z.B. die Regulierung der p53-Menge, erfüllen. Demzufolge kann eine veränderte MDM2-mRNA-Expression (erhöht oder vermindert) als Ausdruck einer biologisch relevanten Fehlregulation aufgefasst werden.

1.5.2 Ovarialkarzinome

Trotz vielfältiger Bemühungen, molekulare Veränderungen als Prognosemarker zu etablieren, sind die Größe des Resttumors und die Aszites nachwievor in der multivariaten Analyse die einzigen signifikanten Marker mit prognostischer Bedeutung für Patientinnen mit einem fortgeschrittenen Ovarialkarzinom. Ein wichtiger Faktor der Zellantwort auf die Wirkung der platin-basierten Chemotherapie ist p53, dessen Funktionalität durch Mutationen der Keimbahn oder durch somatische Mutationen von p53 selbst oder durch Veränderung von regulatorischen Proteinen im p53-Pathway eingeschränkt ist. Ein Grund für die Chemoresistenz könnte demzufolge im Fehlen des funktionell aktiven p53-Proteins liegen. Die Mutationsrate des p53-Gens liegt bei Ovarialkarzinomen zwischen 40-80 %^{33,34,50,116}. Laut vieler Studien ist eher die Überexpression von p53^{47,62,76,119,139} als die Mutation des p53-Gens^{33,66,70,82} mit einer schlechten Prognose verbunden. Andere Autoren konnten jedoch keinen Zusammenhang zwischen der p53-Überexpression und der Prognose für Ovarialkarzinompatientinnen nachweisen^{65,70,93,121,145}. Ein Problem bei der separaten Analyse von p53-Mutationen und der p53-Proteinexpression ist, dass bei immunhistochemischen Studien viele p53-Mutationen nicht erkannt werden; beispielsweise Non-sense-Mutationen oder Insertionen/Deletionen, wodurch ein verkürztes Protein entsteht. Andererseits ist eine Überexpression des p53-Proteins nicht notwendigerweise auf eine Mutation des p53-Gens zurückzuführen. Daher ist es wichtig, sowohl die Proteinexpression als auch den Genstatus von p53 zu analysieren. In einigen Studien wurde zwar neben der p53-Proteinexpression auch der p53-Mutationsstatus untersucht^{50,116}, aber in keiner dieser Arbeiten wurde der kombinierte Sta-

tus der p53-Alterationen mit dem Überleben oder dem Ansprechen auf die Chemotherapie korreliert.

1.6 Die MDM2-MDMX-p53-Interaktion als Ziel einer therapeutischen Intervention

Bei der Suche nach Angriffspunkten für eine Therapie, die auf der Beeinflussung kausaler Regulationsmechanismen basiert, deutet sich für das Onkoprotein MDM2 eine zentrale Rolle an. Da das MDM2-Protein den Abbau des Tumorsuppressors p53 beeinflusst, ist eine MDM2-Überexpression in seiner funktionellen Auswirkung mit einer Alteration des p53-Gens vergleichbar. Durch die Inhibierung der MDM2-Genexpression kann die Menge an MDM2-Protein in der Zelle reduziert werden, was meist zu einer Erhöhung der Menge an funktionellem p53-Protein führt. Hierdurch sollte Apoptose induzierbar und das Ansprechen eines Tumors auf eine Chemo- oder Strahlentherapie verbessert werden können.

In mehreren *in-vitro*-Studien konnte an Glioblastom- und Myelom-Zelllinien die Spezifität verschiedener MDM2-Antisense-Oligonukleotide (AS-ODNs) nachgewiesen werden^{19,67}. Untersuchungen zeigten, dass nach Behandlung von Tumorzellen mit MDM2-AS-ODNs die MDM2-Proteinmenge signifikant reduziert werden konnte. Weitere Effekte der MDM2-AS-ODNs waren u.a. der Wachstumsarrest der Zellen in der G₁-Phase des Zellzyklus und eine deutlich verminderte Zellvitalität. Erste Versuche an WTS-Zelllinien, die von unserer Arbeitsgruppe durchgeführt wurden, ergaben, dass es in der MDM2-überexprimierenden Zelllinie US8-93 zur Reduzierung der Zellkoloniebildungsrate um bis zu 80 % kam⁸⁶.

Aus den bisherigen Studien in Bezug auf die Behandlung von Tumorzellen mit MDM2-AS-ODNs lassen sich die folgenden allgemeinen Schlussfolgerungen ziehen (Übersicht in Chen *et al.*¹⁹):

- MDM2-AS-ODNs stimulieren p53 über eine Reduktion der MDM2-Proteinmenge, der MDM2-p53-Proteinkomplexe und über einen MDM2-mRNA-Abbau,
- eine p53-Reaktivierung und Inhibierung von p53-unabhängigen Onkogen-Aktivitäten des MDM2-Genproduktes ist in Tumoren mit vorherrschender MDM2-Überexpression prinzipiell erreichbar,
- nichtmaligne Zellen sind toleranter gegenüber einer temporären MDM2-Inhibierung, was einer indirekten Selektivität der MDM2-AS-Therapie auf maligne Zellen gleichkommt.

Erste Resultate bestätigen die Wirkung von AS-ODNs als effektive Antitumor-Agenzien auch *in vivo*^{138,141}. In Nacktmausmodellen wurde über eine signifikante Größenreduktion (>50 %) und ein im Vergleich zu Kontrollgruppen stark verzögertes Wachstum von Xenotransplantattumoren berichtet. Zusätzlich konnte ein kooperativer antiproliferativer Effekt durch Kombination mit Cisplatin, Taxol oder Topotecan beobachtet werden¹³⁸. Ähnliche Effekte sind auch bei einer Kombinationstherapie von AS-ODNs und Irinotecan, einem Topoisomerase I-Inhibitor, in Mausmodellen für verschiedene Krebsarten (u.a. das Prostata- und Mammakarzinom) beobachtet worden¹⁴². Für WTS liegen bisher keine vergleichbaren Ergebnisse vor. Die an WTS-Zellkulturen erzielte Reduzierung des klonogenen Überlebens um bis zu 80 % durch eine MDM2-AS-Behandlung⁸⁶ zeigt jedoch deutlich das Ansprechen von WTS auf diese Therapie. Es schien daher dringend erforderlich, die gewonnenen Ergebnisse auf ein klinisch relevantes Tiermodell zu übertragen.

1.7 Zielstellung der Arbeit

Das Hauptziel dieser Arbeit bestand in der umfassenden Aufklärung von Alterationen des p53-MDM2-MDMX-Pathways in Tumoren mesenchymalen Ursprungs, den Weichteilsarkomen, sowie epithelialen Tumoren, hier am Beispiel der Ovarialkarzinome. Dabei stand die Analyse der bedeutsamen Tumorsuppressorproteine p53 und p14^{ARF} sowie der Onkoproteine MDM2 und MDMX in Bezug auf Alterationen der Expression bzw. auf Genebene (Überexpression, Genamplifikation, Mutationen, Mikrosatelliteninstabilitäten, Einzelnukleotidpolymorphismen) im Vordergrund. Durch die Korrelation der molekularen Daten mit klinischen Parametern sollte anschließend ermittelt werden, ob bestimmte Veränderungen prognostische Relevanz besitzen (**Thematik 1** – WTS, **Thematik 2** - Ovarialkarzinome).

Die Detektion und Charakterisierung von alternativ gespleißten Transkripten der MDM2- und MDMX-mRNA in adulten WTS und in juvenilen RMS war ein weiterer Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit. Darüberhinaus sollte untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Spleißformen und dem p53-Mutationsstatus bzw. einer p53-Proteinüberexpression besteht. (**Thematik 3**).

Aufbauend auf den Studien von Meye *et al.*⁸⁶, in denen *in vitro* durch Behandlung mit MDM2-AS-ODNs eine Wachstumsinhibierung von bis zu 80 % erzielt werden konnte, sollten Strategien für eine *in-vivo*-Applikation zur WTS-Therapie entwickelt werden. Das Ziel war zunächst die Etablierung eines Modells zur Behandlung von WTS-Rezidiven im Peritoneum in der Nacktratte, an dem die Wirksamkeit und p53-unabhängige Effekte der MDM2-AS-Konstrukte untersucht werden sollte. Diese Arbeiten sollen auch eine Grundlage für zukünftige Planungen von Kombinationstherapien von konventionellen Therapieformen (Zytostatika, Bestrahlung) mit einer Gentherapie für bestimmte WTS-Patienten sein (**Thematik 4**).

2. Material und Methoden

2.1. Methoden

Die in dieser Arbeit angewandten Methoden und Techniken sind ausführlich in den jeweiligen Publikationen beschrieben oder zitiert worden (s. Übersicht der eigenen Publikationen). Die Experimente wurden unter meiner Leitung bzw. unter meiner maßgeblichen Mitwirkung durchgeführt. Unter anderem handelt es sich um folgende Methoden:

- Isolieren von DNA, RNA und Protein aus Zellkulturen, Blut, Tumorfriechmaterial sowie aus fixiertem Tumormaterial
- reverse Transkription und PCR
- quantitative PCR („real-time PCR“)
- Sequenzierung von DNA
- Klonieren von PCR-Produkten, Isolieren von Plasmid-DNA
- Western Blot zum Nachweis der Proteinexpression
- Immunhistochemie
- Kultivierung von Zelllinien
- Transfektion von Zellkulturen mit Antisense-Oligonukleotiden, Plasmiden sowie siRNA
- Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie
- Xenotransplantation von humanen Tumorzellen auf Nacktratten
- Statistik (u.a. Kreuztabellen, Kaplan-Meier-Analysen, Cox-Regression, t-Test)

2.2. Tumormaterial und Patientenkollektive

2.2.1. Tumorzelllinien

Die verwendeten Zelllinien sind im Institut für Pathologie der Universität Halle-Wittenberg bzw. im Department of Molecular Pharmacology des St. Jude Children's Research Hospital (SJCRH, Memphis, TN, USA) kultiviert worden. Die kommerziell erhältlichen ATCC-Zelllinien (Manassas, VA, USA) wurden über WAK-Chemie (Bad Homburg) oder die „Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH“ (Braunschweig) bezogen. Die Zelllinien Rh18, 28, 30, 36, 41 sind großzügiger Weise von Prof. Peter Houghton vom SJCRH zur Verfügung gestellt worden. Die genannten Linien wurden im Department of Molecular Pharmacology des SJCRH aus Tumorproben als Primärkulturen etabliert.

2.2.2. Patientenkollektive

Weichteilsarkome

Die in dieser Arbeit verwendeten Tumorproben wurden freundlicherweise von der Chirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Leipzig durch PD Dr. Peter Würfl zur Verfügung gestellt, der die betreffenden Patienten operiert hat. Von sämtlichen Patienten wurden zusätzlich zum Tumormaterial auch Normalgewebe (Muskel) und Blutproben entnommen. Sowohl das Tumor- als auch das Normalgewebe sind bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff kryokonserviert worden. Die Verschlüsselung der Proben und die Anonymisierung der klinischen Daten erfolgten gemäß einer am Institut für Pathologie erstellten Datenbank und entsprechend ihres chronologischen Eingangs (LZ6 z.B. entspricht der 6. Tumorprobe aus der Chirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Leipzig). Die Proben wurden durch erfahrene Pathologen histologisch charakterisiert und entsprechend der gültigen WHO-Klassifikation für WTS von 1993 eingeordnet ²⁹.

Ovarialkarzinome

Paraffin-fixierte Proben von 107 invasiven Ovarialkarzinomen wurden nach Verfügbarkeit des Materials ausgewählt. Die Fälle wurden zwischen 1997 und 2005 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 & Steffen Hauptmann) reevaluiert. Die Tumorproben und das Patientenkollektiv wurden in mehreren Publikationen ausführlich beschrieben ^{3,64}. Die histologische Klassifikation erfolgte nach den Richtlinien der WHO, das Grading nach Silverberg ¹²⁵. Klinische Daten wie Patientenalter, Resttumorgröße, FIGO Stadium, adjuvante Chemotherapie und Verlauf sind in Tabelle 2-1 zusammengestellt.

2.3. Versuchstiere

Alle Nacktratten (RH-nu/nu) stammten aus dem Zuchtbetrieb Harlan-Winkelmann (Borchen). Jeweils 3 - 4 Tiere wurden semisteril in Käfigen mit Einzelbelüftung im Tierstall der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig mit einem 12/12 h Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Den Tieren standen steriles handelsübliches Trockenfutter und Wasser ad libitum zur Verfügung. Es wurde darauf geachtet, dass die Tiere für eine Versuchsreihe jeweils aus der gleichen Lieferung stammten und etwa das gleiche Alter und Gewicht hatten (Alter bei Versuchsbeginn ca. 8-10 Wochen, Gewicht 80-110 g).

Tabelle 2-1: Zusammenfassung klinischer Daten der Ovarialkarzinompatientinnen

Klinische Parameter	Patientinnen (107)	
	No.	%
Tumortyp		
serös	62	57.9
endometroid	14	13.1
gemischt	11	10.3
klarzellig	9	8.4
transitionalzellig	1	0.9
undifferenziert	8	7.5
muzinös	2	1.9
Tumorstadium		
FIGO I	30	28.0
FIGO II	9	8.4
FIGO III	63	58.8
FIGO IV	5	4.7
Alter der Patientinnen		
Durchschnitt		63.5
Median		64.0
Therapie		
Cisplatin+Taxol	62	57.9
Platin-haltig, ohne Taxol	21	29.7
andere	2	1.9
keine (FIGO Ia)	5	4.7
abgelehnt, gestorben	13	12.1
keine Daten	4	3.7
Resttumor		
kein	39	41.0
< 1 cm	22	23.1
> 1 cm	34	35.8

3. Ergebnisse

3.1 Thematik 1 – Genetische Veränderungen von MDM2, MDMX, p53 bei WTS und Ovarialkarzinomen

3.1.1 Nachweis der Amplifikation des MDM2-Gens im WTS und Korrelation mit dem Überleben ⁴

Von insgesamt 75 Tumorproben wurde der MDM2-Genstatus mittels einer semiquantitativen Multiplex-PCR ⁶⁸ untersucht, von 63 Patienten stand auch Referenz-DNA von Lymphozyten aus dem peripheren Blut zur Verfügung. Insgesamt konnte in 28 % (21 von 75) der untersuchten WTS-Proben eine Amplifikation des MDM2-Gens detektiert werden ⁴. Einzelne Proben wiesen ein bis zu 12-fach amplifiziertes MDM2-Gen auf (Abb. 3-1). Die MDM2-Genamplifikationen korrelierte mit einem geringeren Tumorstadium ($p=0,022$; χ^2 -Test). Es war weiterhin von Interesse, ob die Amplifikation des MDM2-Gens eine erhöhte MDM2-mRNA-Expression zur Folge hat. Wir fanden heraus, dass die Amplifikation des MDM2-Gens signifikant mit einer erhöhten Expressionsrate der mRNA des MDM2-Gens korreliert ($p=0,007$, χ^2 -Test). In allen Tumoren mit einer Amplifikation wurde gleichzeitig eine erhöhte mRNA-Expression detektiert, wohingegen keine Probe mit einer geringen Menge an MDM2-mRNA ein amplifiziertes MDM2-Gen aufwies. Mit Hilfe der Kaplan-Meier-Analyse wurde der Einfluss der Amplifikation des MDM2-Gens auf das Überleben von WTS-Patienten ermittelt (Tab. 3-1). Bemerkenswert war, dass die durchschnittliche Überlebenszeit für Patienten, in deren Tumor keine Amplifikation des MDM2-Gens nachweisbar war, 36 Monate betrug, während Patienten mit nachgewiesener MDM2-Genamplifikation im Durchschnitt 98 Monate überlebten ($p=0,077$, log-Rank-Test).

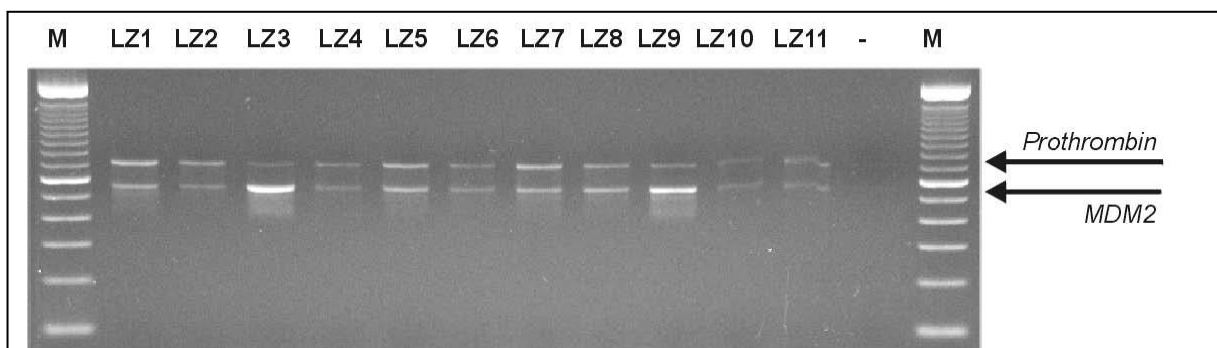


Abb. 3-1: Nachweis der Amplifikation des MDM2-Gens in WTS

Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Agarosegel zum Nachweis von MDM2-Genamplifikationen. In einer Multiplex-PCR wird genomische DNA mit Primern für das MDM2 und das Prothrombin-Gen (Pro) zusammen amplifiziert. Anschließend erfolgten die Auftrennung der Produkte im Agarosegel und die densitometrische Analyse der Banden. Abbildung entnommen aus Bartel *et al.*, 2001 ⁴

In der Cox-Regression zeigte sich, dass Patienten ohne MDM2-Amplifikation eine schlechtere Prognose im Vergleich zu WTS-Patienten haben, deren Tumor ein amplifiziertes MDM2-Gen trägt ($p=0,04$, relatives Risiko [RR] 4,5). Wird die Cox-Regression nach dem Tumorgrad adjustiert, ergibt sich für Patienten ohne Amplifikation ein vergleichbares Risiko am Tumor zu versterben ($p=0,17$, $RR=4,4$). Die Ergebnisse zeigen, dass der Nachweis einer Amplifikation des MDM2-Gens ein unabhängiger Prognosefaktor für WTS ist, und dass das Auftreten einer Amplifikation mit einer besseren Prognose für WTS-Patienten korreliert.

3.1.2 Mikrosatellitenanalyse für die MDM2-Marker D12S80b und D12S83a bei WTS ¹³²

Im Rahmen einer Analyse auf Mikrosatelliteninstabilitäten wurden WTS auch die beiden MDM2-Marker D12S80b (distal von kodierender Sequenz von MDM2) und D12S83a (proximal der kodierenden Sequenz von MDM2) auf Veränderungen hin untersucht. Von den 66 untersuchten Patientenproben wies nur ein geringer Anteil einen Verlust der Heterozygotie im MDM2-Marker D12S83a auf, d.h. in 8 % (5/66) der Tumoren konnte ein LOH („loss of heterozygosity“) nachgewiesen werden. In einer dieser Proben wurde zusätzlich auch eine

Tab. 3-1 Kaplan-Meyer-Analyse des Einflusses molekularer und klinischer Faktoren auf die Überlebenszeit von WTS-Patienten. log-Rank – log-Rank-Test, WB – Western Blot.

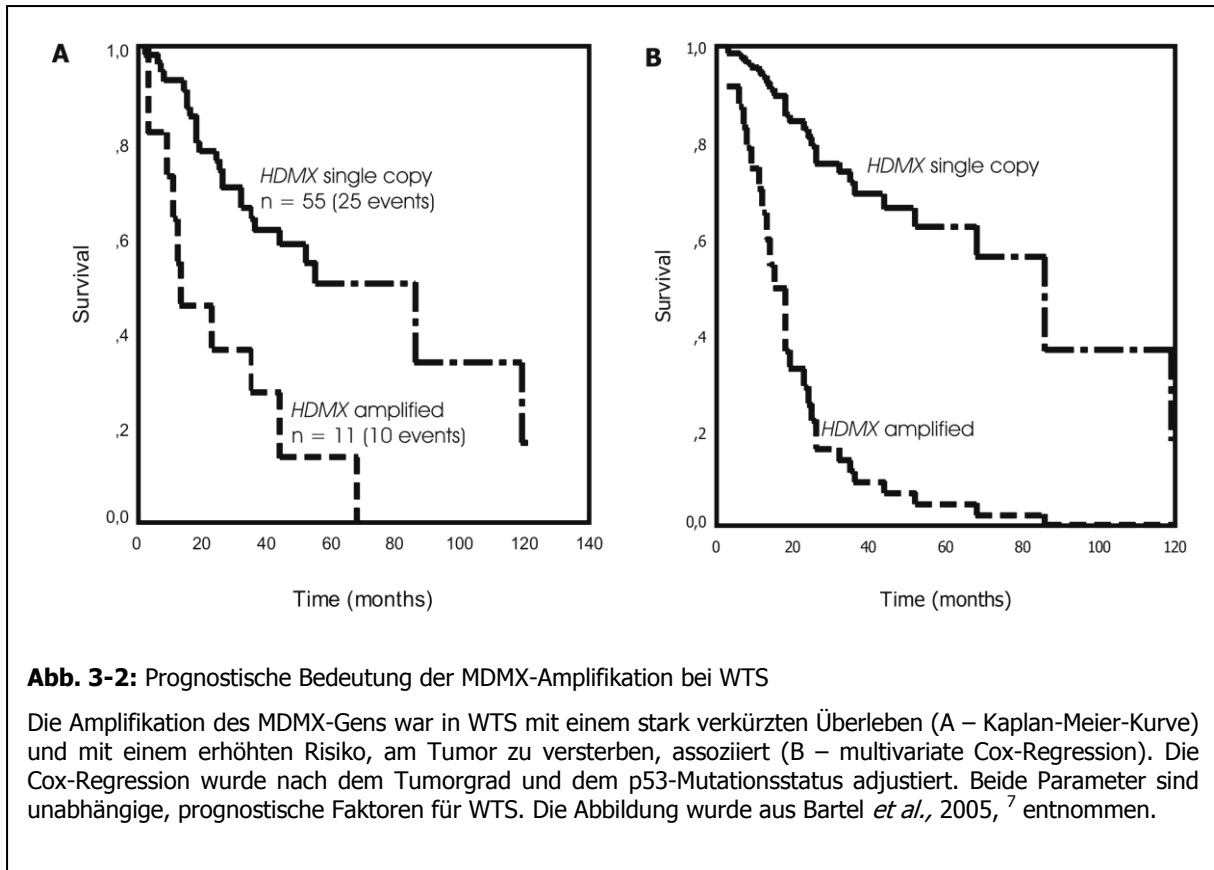
Merkmal	Anzahl der Patienten	Überlebenszeit in Monaten (Median)	3-Jahres-Überlebensrate (%)	p (log-Rank)
MDM2 Spleißvarianten				
nein	34	68	60	0,39
ja	43	57	56	
MDM2 Amplifikation				
Nein	47	38	50	0,077
ja	18	96	80	
MDM2 Expression (WB)				
Keine	17	38	47	0,94
Gering	17	35	49	
Erhöht	17	37	51	
Stark erhöht	8	68	71	
p53 Expression (WB)				
Keine	15	68	85	0,19
Gering	9	35	31	
Erhöht	11	25	36	
Stark erhöht	24	57	55	
Tumorstadium				
1				0,00001
2	22	96	94	
3	27	68	61	
4	25	24	34	
	18	5	0	

Instabilität des Mikrosatellitenlocus festgestellt. Dem gegenüber wiesen 18 % (12/66) der WTS Veränderungen im MDM2-Marker D12S80b auf. Dabei wurde in jeweils 6 Tumoren ein LOH bzw. eine MSI (Mikrosatelliteninstabilität) detektiert.

Betrachtet man die Häufigkeiten des Auftretens von Veränderungen für die beiden MDM2-Mikrosatelliten D12S80b und D12S83a, so zeigt sich, dass der Verlust der Heterozygotie im Locus D12S80b signifikant mit der Amplifikation des MDM2-Gens korreliert ($p = 0,003$; χ^2 -Test). Patienten, deren Tumoren für diesen Mikrosatellitenmarker einen LOH aufweisen, tragen in 4 von 5 Fällen (80 %) auch ein amplifiziertes MDM2-Gen. Demgegenüber wiesen 83 % der Tumorproben ohne Alteration auch keine Amplifikation des MDM2-Gens auf. Bei Patienten mit Mikrosatelliteninstabilitäten in den untersuchten Markern D12S80b und D12S83a konnte keine MDM2-Genamplifikation beobachtet werden.

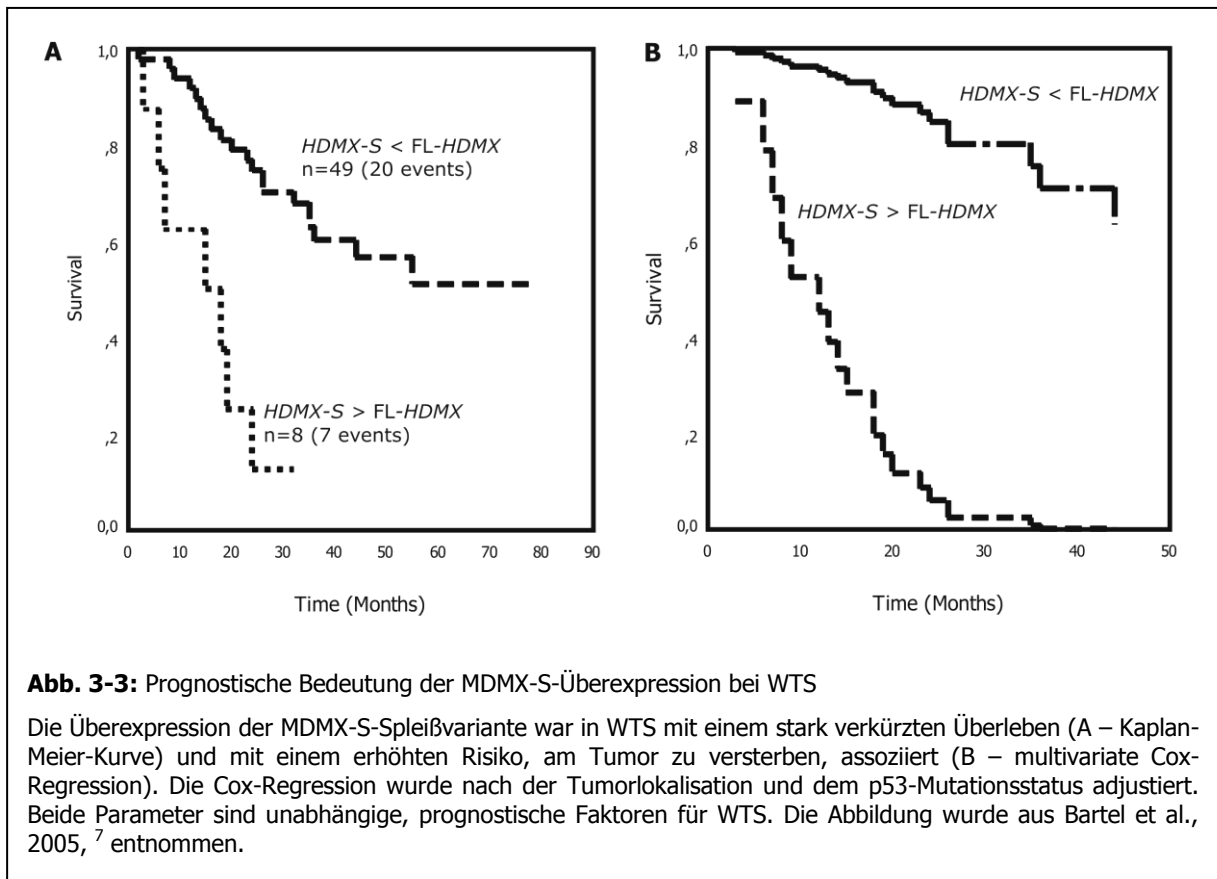
3.1.3 MDMX-Genamplifikation in WTS^{6,7}

Im Laufe der Arbeiten erschienen mehrere Publikationen, die auf eine Bedeutung von MDMX in Tumoren hindeuteten. Daher gingen wir der Frage nach, ob das MDMX-Gen ähnliche Alterationen aufweist wie MDM2. Die Amplifikation des MDMX-Gens wurde in insgesamt 66 WTS-Proben untersucht. Wir konnten nachweisen, dass das MDMX-Gen in 27 % (18 von 66) der untersuchten WTS amplifiziert vorlag. Die Bandenintensität der MDMX-Bande war in den einzelnen Tumorproben zwischen 3- bis 9-fach stärker als in den Lymphozyten der jeweiligen Patienten. Das Auftreten der MDMX-Genamplifikation korrelierte aber weder mit dem Tumorgrad (χ^2 -Test, $p=0,074$) noch mit dem Tumorstadium (χ^2 -Test, $p=0,549$). In der Kaplan-Meier-Analyse zeigte sich, dass Patienten, deren Tumor ein amplifiziertes MDMX-Gen aufweist, eine mittlere Überlebenszeit von 44 Monaten im Vergleich zu 66 Monaten für Patienten ohne MDMX-Genamplifikation (Abb. 3-2A). Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant (log-Rank-Test, $p=0,27$). In einer multivariaten Cox-Regressions-Analyse (Abb. 3-2B), adjustiert nach Tumorgrad und Art der Tumorresektion, konnten wir zeigen, dass das relative Risiko (RR), am Tumor zu versterben, für Patienten mit nachgewiesener MDMX-Genamplifikation signifikant erhöht war ($RR=2,8$; $p=0,03$). Zusammengefasst lässt sich sagen, dass das MDMX-Gen in einem Teil der WTS amplifiziert ist und dass dies mit einer schlechten Prognose für diese Patienten verbunden ist. Dies steht im Gegensatz zu dem Befund, dass das Vorhandensein einer MDM2-Genamplifikation ein positiver Prognosefaktor für WTS ist.



3.1.4 MDMX-mRNA-Expression in WTS^{6,7}

Neben der MDMX-Genamplifikation wurde auch die MDMX-mRNA-Expression in 57 der 66 WTS-Proben untersucht. Insbesondere waren wir an der Analyse der MDMX-S-Spleißvariante interessiert. Diese Spleißvariante ist durch den Verlust von Exon 6 (68 bp) charakterisiert und wurde erstmals von Rallapalli *et al.* beschrieben¹¹⁰. Durch die Auswahl geeigneter PCR-Primer war es uns möglich, die PCR-Produkte, die von der cDNA der „full-length“-MDMX-mRNA (FL-MDMX) bzw. von der MDMX-S-Spleißvariante abstammen, zu unterscheiden. Wir konnten die FL-MDMX-mRNA in 54 der 57 (95 %) WTS-Proben nachweisen. In 12 von 54 Proben (22 %), die die MDMX-mRNA exprimierten, war nur die FL-MDMX-mRNA nachweisbar. In 42 von 54 WTS (78 %) wurden die Transkripte der MDMX-mRNA sowie der Spleißvariante MDMX-S exprimiert. Eine genauere Analyse ergab, dass in 48 % der Fälle (20 von 42) das FL-MDMX-Transkript und in 19 % (8 von 42) die MDMX-S-Spleißvariante wesentlich stärker im Vergleich zum FL-Transkript exprimiert wurde. In 33 % (14 von 42) der Fälle waren beide Transkripte nahezu gleich stark vorhanden. Als Vergleich haben wir die MDMX-mRNA-Expression in verschiedenen Normalgeweben untersucht und konnten feststellen, dass die MDMX-mRNA erst nach insgesamt 70 PCR-Zyklen nachweisbar war. Dabei dominierte in allen Normalgewebeproben das FL-MDMX-Transkript. In unserer



Studie gab es einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Tumorgrad und der Überexpression der MDMX-S-Spleißvariante (χ^2 -Test, $p=0,0005$).

Berechnungen zur Überlebenszeit zeigten, dass Patienten mit einer deutlichen MDMX-S-Überexpression durchschnittlich 13 Monate nach Diagnosestellung verstarben, wohingegen Patienten, bei denen FL-MDMX-Menge größer oder gleich war im Verhältnis zu MDMX-S, durchschnittlich 53 Monate überlebten ($p=0,0001$). Die Cox-RegreSSIONsanalyse, adjustiert nach Tumorgrad und Art der Tumorresektion, ergab zudem, dass Patienten mit MDMX-S-Überexpression eine deutlich schlechtere Prognose aufweisen als Patienten mit geringer MDMX-S-Expression (RR=9, $p=0.0001$). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Überexpression der MDMX-S-Spleißvariante ein unabhängiger prognostischer Faktor für WTS ist und mit einer signifikant kürzeren Überlebenszeit korreliert (Abb. 3-3).

3.1.5 Polymorphismen im MDM2-Gen^{11,12,134}

Die Funktionalität von p53 spielt eine wichtige Rolle bei der Verhinderung der Entstehung von Tumoren. p53 selbst ist in mehr als 50 % der Tumoren durch Mutationen inaktiviert. Unsere Hypothese lautete, dass auch Sequenzvariationen von anderen Genen im p53-Pathway die Wahrscheinlichkeit einer Tumorentstehung erhöhen. Wir haben daraufhin

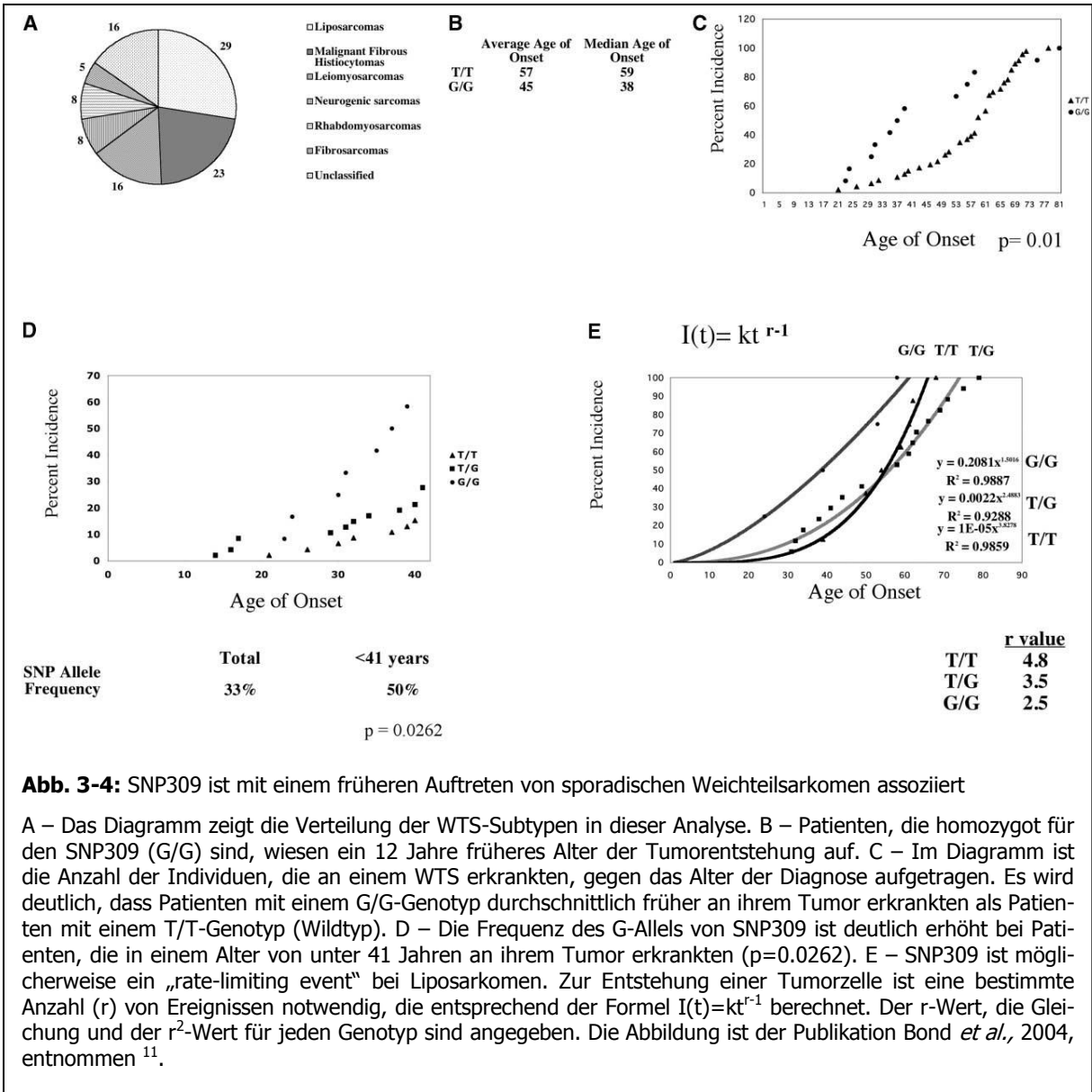


Abb. 3-4: SNP309 ist mit einem früheren Auftreten von sporadischen Weichteilsarkomen assoziiert

A – Das Diagramm zeigt die Verteilung der WTS-Subtypen in dieser Analyse. B – Patienten, die homozygot für den SNP309 (G/G) sind, wiesen ein 12 Jahre früheres Alter der Tumorentstehung auf. C – Im Diagramm ist die Anzahl der Individuen, die an einem WTS erkrankten, gegen das Alter der Diagnose aufgetragen. Es wird deutlich, dass Patienten mit einem G/G-Genotyp durchschnittlich früher an ihrem Tumor erkrankten als Patienten mit einem T/T-Genotyp (Wildtyp). D – Die Frequenz des G-Allels von SNP309 ist deutlich erhöht bei Patienten, die in einem Alter von unter 41 Jahren an ihrem Tumor erkrankten ($p=0.0262$). E – SNP309 ist möglicherweise ein „rate-limiting event“ bei Liposarkomen. Zur Entstehung einer Tumorzelle ist eine bestimmte Anzahl (r) von Ereignissen notwendig, die entsprechend der Formel $I(t)=kt^{-1}$ berechnet. Der r -Wert, die Gleichung und der r^2 -Wert für jeden Genotyp sind angegeben. Die Abbildung ist der Publikation Bond *et al.*, 2004, entnommen ¹¹.

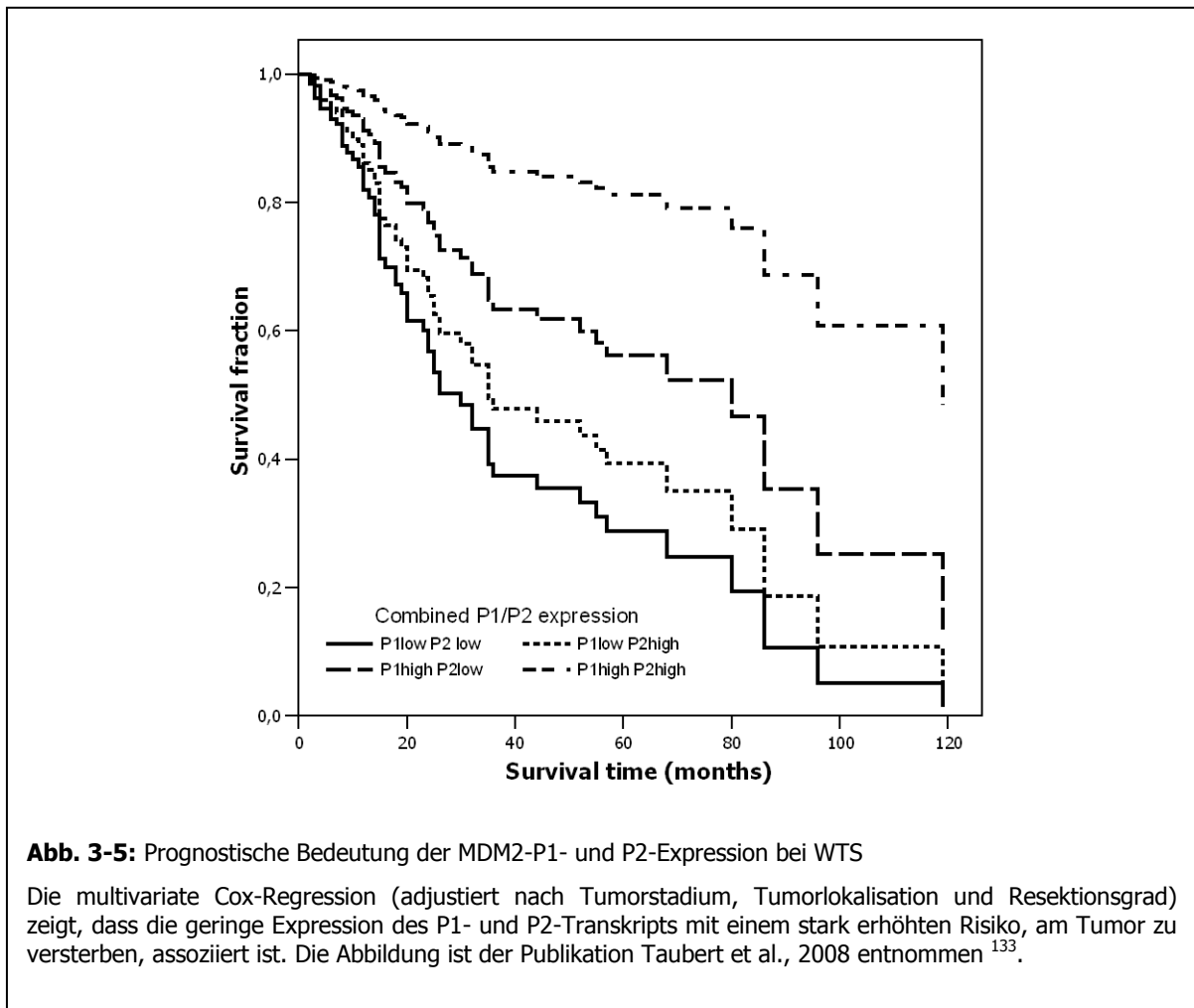
untersucht, ob in Tumoren Mutationen und/oder Polymorphismen des MDM2-Gens auftreten. Dazu wurde von 82 WTS-Patienten und 100 gesunden Probanden das Exons 12 des MDM2-Gens sequenziert. Es konnte weder in den Patienten noch in den gesunden Blutspendern eine Mutation detektiert werden. In den Untersuchungen fanden wir jedoch einen Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) im Kodon 354 (GAA > GAG), der in 8 % der Blutspender (8 von 100) und in 13 % der Tumorpatienten (11 von 82) auftrat. Der heterozygote Status des SNP korrelierte mit einer verminderten MDM2-mRNA-Expression ($p=0.0032$). Daraus lässt sich ableiten, dass das G-Allel möglicherweise zu einer verminderten mRNA-Stabilität führt. In einer Kaplan-Meier-Analyse konnten wir zeigen, dass Patienten, die einen homozygoten Wildtyp-Status aufwiesen, im Durchschnitt 88 Monate nach Diagnosestellung verstarben, während dies bei Patienten die heterozygot bzw. homozygot für den SNP waren, bereits nach durchschnittlich 45 Monaten der Fall war. Dies und der höhere Anteil an Tumorpatienten-

ten mit dem SNP lassen den Schluss zu, dass dieser SNP mit einer erhöhten Tumorsuszeptibilität assoziiert ist.

Nach der Analyse der Zinkfinger-Region haben wir zusammen mit Arnold Levine (Institute of Advanced Studies, Princeton, USA) und Gareth Bond (Ludwig Institute for Cancer Research, Oxford, England) das Intron 1 des MDM2-Gens sequenziert. In dieser Region befindet sich der p53-sensitive P2-Promotor des MDM2-Gens¹⁵⁸. Da die MDM2-Menge entscheidend für die p53-vermittelte Stressantwort ist, kann man davon ausgehen, dass natürlich vorkommende Sequenzvariationen (SNPs) die MDM2-Expression und die Funktionalität von p53 und somit die Fähigkeit von p53, die Entstehung von Tumoren zu verhindern, beeinflussen können. Es konnte an der 309. Position des Introns 1 ein T > G-Austausch identifiziert werden (SNP309). Dies führt zu einer verstärkten Bindung des Transkriptionsfaktors Sp1 an den Promotor und zu einer erhöhten MDM2-mRNA und -Proteinexpression¹¹. Das Vorhandensein des G-Allels von SNP309 ist demnach mit einer Schwächung des p53-Pathways assoziiert. An unserem WTS-Patientenkollektiv konnten wir zeigen, dass der SNP309 mit einem früheren Auftreten von sporadischen WTS korreliert (Abb. 3-4). So entwickelten Patienten, die homozygot für SNP309 (G/G) waren, durchschnittlich 12 Jahre früher den Tumor als Patienten ohne SNP309 (T/T; $p=0,01$). Wir fanden weiterhin heraus, dass das G-Allel bei jüngeren Patienten deutlich häufiger auftrat. Die Allelfrequenz betrug bei Patienten unter 41 Jahren 50 % im Vergleich zu 33 % bei Patienten, die älter als 41 Jahre waren ($p=0,026$; Abb. 3-4D). Des Weiteren zeigen unsere Berechnungen, dass das G-Allel von SNP309 ein so genanntes „rate-limiting event“ bei Liposarkomen ist (Abb. 3-4E). Das bedeutet, dass die Anzahl der notwendigen Ereignisse zur Tumorentstehung (z.B. Mutationen, Überexpression von Genen) herabgesetzt ist. Während bei Patienten, die homozygot für das T-Allel sind (Wildtyp), durchschnittlich 4,8 Ereignisse zur Tumorentstehung nötig sind, so sind es bei Patienten, die homozygot für das G-Allel sind, nur noch 2,5 Ereignisse¹¹. Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass das G-Allel von SNP309 mit einer Schwächung des p53-Pathways assoziiert ist, so dass die Entstehung von Tumoren in diesen Individuen beschleunigt wird.

Das untersuchte Patientenkollektiv besteht aus 58 Frauen und 47 Männern. Betrachtet man die geschlechtsspezifische Verteilung von SNP309, so fällt auf, dass nur 3 der 47 Männer einen G/G-Genotyp aufweisen. Das bedeutet, dass der Effekt einer frühen Tumorentstehung bei WTS nur bei Frauen mit einem G/G-Genotyp assoziiert ist. Bei weiblichen Patienten mit einem G/G-Genotyp trat der Tumor durchschnittlich 14 Jahre früher auf als bei Patientinnen mit einem T/T-Genotyp (T/T-Frauen: 59 Jahre; G/G-Frauen: 45 Jahre, $p=0,028$). Man kann daher vermuten, dass Östrogen eine wichtige Rolle in diesem Zusammenhang spielt.

Dies zeigt sich auch daran, dass bei 67 % der GG-Patientinnen der Tumor vor dem 51. Lebensjahr diagnostiziert wurde, bei den TT-Patientinnen war dies nur bei 27 % der Fall ($p=0,05$, exakter Test nach Fisher). Der Anteil der GG-Patientinnen betrug bei Frauen, deren Tumor vor dem 51. Lebensjahr auftrat, 27 %, bei Patientinnen über 51 Jahren nur 8% und bei männlichen Patienten 6 % ($p=0,017$, exakter Test nach Fisher). Diese Daten stützen die Hypothese, dass Geschlechtshormone, wie z.B. Östrogen, die Entstehung von Tumoren bei Individuen mit einem G/G-Genotyp weiter beschleunigen können.



3.1.6 MDM2-P1- und P2-Transkriptlevel bei WTS-Patienten¹³³

Wir konnten in vorangegangenen Arbeiten nachweisen, dass sowohl die MDM2-Genamplifikation⁴ als auch eine erhöhte MDM2-mRNA-Expression¹³⁵ mit einer guten Prognose für WTS-Patienten verbunden sind. Des Weiteren zeigen unsere Daten, dass Patienten, die homozygot für den SNP309 sind, im Durchschnitt 12 Jahre früher einen Tumor entwickeln¹¹ als Patienten mit dem Wildtyp. Daher war es naheliegend zu fragen, ob auch das

Expressionsniveau der mRNA-Transkripte, die von den beiden MDM2-Promotoren abgelesen werden, mit dem Alter bei Tumorentstehung bzw. der Prognose assoziiert sind. Die Transkriptmengen wurden mittels transkriptspezifischer Real-Time-PCR-Assays bestimmt. Wir nutzten den Median der Transkriptmengen, um die Werte in „geringe Expression“ bzw. „hohe Expression“ einzuteilen, wenn die Werte der Patienten unter bzw. über dem jeweiligen Median lagen.

Das durchschnittliche Alter bei Tumordiagnose betrug bei Patienten mit einer hohen P1-Expression 50,5 Jahre im Vergleich zu 61,5 Jahren bei Patienten mit einer geringen P1-Expression ($p < 0,0001$; t-Test). Überraschenderweise konnten wir bei Patienten mit einer hohen bzw. geringen P2-Expression keinen Unterschied bezüglich des Alters bei Diagnosestellung ermitteln (56 vs. 55 Jahre; $p = 0,72$; t-Test). Bei Patienten, die homozygot für den SNP309 waren (G/G) und geringe Mengen P2 exprimierten, wurde der Tumor durchschnittlich 29 Jahre früher diagnostiziert als bei Patienten, die homozygot für das T-Allel des SNP309 waren (31,4 vs. 59,8 Jahre; $p < 0,0001$, t-Test). Dies war nicht der Fall bei Patienten mit hohen P2-Mengen und unterschiedlichem SNP309-Status. Demgegenüber zeigte sich, dass Patienten mit geringer als auch mit hoher P1-Expression und dem G-Allel des SNP309 durchschnittlich früher an ihrem Tumor erkrankten. Der Altersunterschied war jedoch nur für Patienten mit geringer P1-Expression signifikant (GG + P1 niedrig: 45,1 Jahre vs. TT + P1 niedrig: 60,5 Jahre; $p = 0,015$). Um den Effekt der MDM2-mRNA-Expression unabhängig vom Geschlecht und dem MDM2-Amplifikationsstatus zu untersuchen, haben wir das Alter der Diagnose bei Frauen berechnet, deren Tumor kein amplifiziertes MDM2-Gen aufwies. Es stellte sich heraus, dass der Tumor bei Frauen mit einem „single-copy“ MDM2-Gen und einer hohen P1-Expression durchschnittlich 10 Jahre früher im Vergleich zu Frauen mit einer geringen P1-Expression diagnostiziert wurde (51 Jahre vs. 61 Jahre; $p = 0,086$). Diese Ergebnisse zeigen, dass die MDM2-Genamplifikation zwar mit einer erhöhten MDM2-Expression korreliert, jedoch nicht den Effekt der P1- und P2-Transkriptlevel auf das Alter der Tumorentstehung bei WTS-Patienten maskiert.

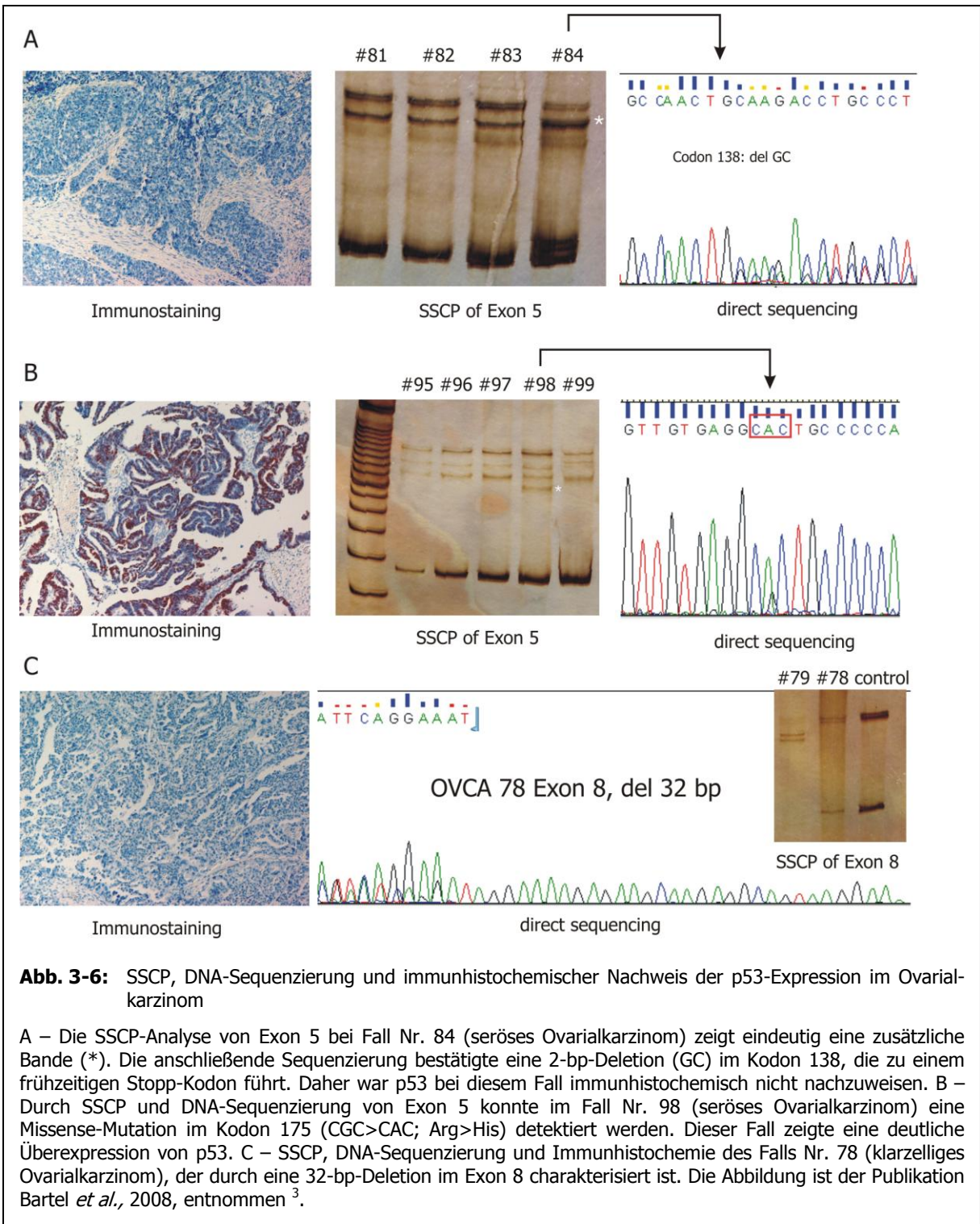
Während eine hohe P1-Expression mit einem früheren Auftreten eines Weichteilsarkoms assoziiert ist, so zeigte sich in der Kaplan-Meier-Analyse, dass Patienten mit einer hohen P1-Expression eine signifikant längere Überlebenszeit (Median: 119 Monate) als Patienten mit einer geringen P1-Expression (26 Monate, $p = 0,0001$, log-Rank-Test) aufwiesen (Abb. 3-5). Bezüglich des Gesamtüberlebens zeigten sich auch deutliche Unterschiede zwischen Patienten mit geringer bzw. hoher P2-Expression (26 vs. 96 Monate, $p = 0,0023$, log-Rank-Test). Der Effekt, dass eine hohe P1-Expression mit einer längeren Überlebenszeit assoziiert ist, war unabhängig vom Status der MDM2-Genamplifikation (MDM2 single-copy:

$p=0,043$; MDM2 amplifiziert: $p=0,035$; log-Rank-Test). In einer multivariaten Cox-Regressions-Analyse (adjustiert nach Tumorstadium, Lokalisation und Resektionsgrad) konnten wir geringe P1- und P2-Expressionslevel als unabhängige, negative Prognosefaktoren für Weichteilsarkompatienten identifizieren (relatives Risiko [RR] P1 gering = 3,7, $p<0,0001$; RR P2 gering = 2,5, $p=0,001$). Das Risiko, am Tumor zu versterben, war für Patienten, deren Tumor vor dem 51. Lebensjahr diagnostiziert wurde und durch eine geringe P1- bzw. P2-Expression charakterisiert war, um das 7,7-fache (P1; $p=0,002$) bzw. um das 13,1-fache (P2; $p<0,0001$) erhöht. Wir konnten diese Daten auch für Patientinnen mit einem „single-copy“ MDM2-Gen bestätigen, um Einflüsse der MDM2-Amplifikation auszuschließen.

3.2 Thematik 2 - Genetische Veränderungen von p53, MDM2 und MDMX bei Ovarialkarzinomen³

3.2.1 p53-Mutationen und p53 Proteinexpression

Für die Analysen zu molekularen Veränderungen des p53-Pathways stand uns Material von 107 Ovarialkarzinomen zur Verfügung, das wir zunächst auf p53-Sequenzalterationen hin analysiert haben (Abb. 3-6). Wir konnten insgesamt 111 Sequenzveränderungen nachweisen. Dabei handelte es sich in 44 Fällen um Mutationen in den Exonen 4 – 8 (einschließlich 2 Mutationen in einem Intron), in den weiteren Fällen um bekannte Polymorphismen in Intron 3 bzw. im Kodon 72. Die p53-Proteinexpression wurde von uns mittels Immunhistochemie an Paraffinschnitten untersucht (Abb. 3-6). In 51,4 % der Fälle (55 von 107) detektierten wir eine p53-Überexpression. 20 Fälle (18,7 %) wiesen nur eine geringe Färbung auf, und 32 Fälle (30,2 %) zeigten keine p53-Expression. Es zeigte sich, dass die p53-Proteinexpression nicht mit dem p53-Mutationsstatus korrelierte ($p=0,59$; χ^2 -test). Der Anteil an Fällen mit einer p53-Überexpression und einem mutierten p53-Gen betrug 54 % (24 von 44). In 49 % der Fälle (31 von 63) konnte jedoch trotz eines p53-Wildtyp-Gens eine verstärkte p53-Expression detektiert werden. Wir haben daher die Tumoren entsprechend ihres kombinierten p53-Mutations/-Proteinexpressionsstatus in vier Gruppen eingeteilt. Fälle mit einem p53-Wildtyp-Gen und ohne immunhistochemisch nachweisbare p53-Expression wurden als „p53 normal“ bezeichnet (29,9 %; 32 von 107). Hier gehen wir davon aus, dass p53 funktionell aktiv ist. Die anderen Gruppen enthielten Fälle mit einer p53-Alteration und setzten sich folgendermaßen zusammen: (i) p53-Überexpression, jedoch p53-Wildtyp-Gen (29 %; 31/107), (ii) p53-Mutation und p53-Überexpression (22,4 %; 24/107) sowie (iii) p53-Mutation, aber keine p53-Expression (18,7 %; 20/107).



3.2.2 p53-Status und Ansprechen auf die Chemotherapie

Patientinnen, deren Tumor eine p53-Veränderung (Mutation und/oder Überexpression) aufwies, waren resistenter gegenüber einer Chemotherapie als Patientinnen mit normalem p53-Status (78 % vs. 52 %; $p=0,027$). Bei diesen Patientinnen war auch die Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs kürzer als bei Patientinnen ohne p53-Alteration (28 vs. 51 Monate,

$p=0,075$). In Bezug auf den Mutationsstatus wiesen Tumoren mit einem mutierten p53-Gen eine höhere Resistenz auf (79 %) als Tumoren mit einem p53-Wildtyp-Gen (64 %, $p=0,148$).

3.2.3 Status des SNP309 im MDM2-P2-Promotor bei Ovarialkarzinomen

Der Anteil an Patientinnen, die einen heterozygoten Genotyp (T/G) aufwiesen, war höher (52.4 %) und der Anteil mit einem homozygoten Genotyp (G/G) war etwas niedriger (7.8 %) als in gesunden Kontrollpersonen (T/G: 40 %; G/G: 12 %, ¹¹). Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant ($p=0,53$). Am Beispiel der Weichteilsarkome konnten wir zeigen, dass der SNP309 vor allem in Frauen mit einem aktiven Östrogen-Signalpathway einen Effekt hat ¹². Wir haben daher auch bei den Ovarialkarzinompatientinnen den Einfluss des Östrogenrezeptor (ER)-Status untersucht. In unserem Patientenkollektiv wiesen 40 % (43 von 107) eine sehr hohe und 17 % (18 von 107) eine geringe ER-Expression auf, während 43 % (46 von 107) keinen ER exprimierten. In Patientinnen im FIGO III-Stadium mit ER-positiven Tumoren war das G-Allel von SNP309 mit einem 6 Jahre früheren (T/T: 70,6 Jahre; T/G+G/G: 64,4 Jahre, $p=0,101$) und bei Patientinnen mit einer sehr starken ER-Expression mit einem 8,5 Jahre früheren Auftreten des Tumors assoziiert ($p=0,048$). In ER-negativen Patientinnen fanden wir keine Unterschiede beim Alter der Tumorentstehung ($p=0,44$). Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass das G-Allel von SNP309 einen intakten Östrogen-Signalpathway benötigt, um die Tumorentstehung zu beschleunigen ¹².

3.2.4 p53- und SNP309-Status und der Einfluss auf das Gesamtüberleben.

Die kürzeste Überlebenszeit (42,8 Monate) wiesen Patientinnen auf, deren Tumor durch eine Überexpression von Wildtyp-p53 charakterisiert war. Besonders deutlich war der Unterschied im Vergleich zu Patientinnen mit einem p53-Wildtyp, jedoch ohne nachweisbare p53-Proteinexpression ($p=0,019$, log-Rank-Test). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Patientinnen mit einem „normalen“ p53 (Wildtyp-Gen, keine Proteinexpression) eine längere Überlebenszeit aufweisen als Patientinnen mit einer p53-Genmutation und/oder p53-Überexpression. Interessanterweise überlebten Patientinnen im FIGO III-Stadium und einem mutierten p53-Gen länger als Patientinnen mit einem p53-Wildtyp-Gen (59 vs. 41 Monate, $p=0,058$). Ein ähnliches Ergebnis - dass, ein geschwächter p53-Pathway mit einem längeren Überleben assoziiert war - fanden wir auch, als wir den Einfluss von SP309 auf das Gesamtüberleben der Ovarialkarzinompatientinnen untersuchten. Die durchschnittliche Überlebenszeit betrug für Patientinnen mit einem T/T-Genotyp (wt) 59 Monate und für Patientinnen mit dem G-Allel (T/G+G/G) 62 Monate ($p=0,994$). Im FIGO III-Stadium jedoch korrelierte das

G-Allel - also ein geschwächter p53-Pathway - mit einem längeren Überleben im Vergleich zum SNP309 Wildtyp-Status (57,5 Monate vs. 35,3 Monate, $p=0.045$, log-Rank-Test). Der Effekt des G-Allels auf das Gesamtüberleben war, wie schon beim Alter der Tumorentstehung, vom ER-Status des Tumors abhängig. Während bei Patientinnen ohne ER-Expression ein noch deutlicherer Unterschied in Bezug auf die Gesamtüberlebenszeit zu finden war ($p=0,024$, log-Rank-Test), so konnte bei Patientinnen mit ER-Expression kein signifikanter Unterschied der Überlebenszeiten detektiert werden (geringe ER-Expression: $p=0,424$; starke ER-Expression: $p=0,828$). Aus diesen Daten lässt sich ein Modell ableiten, nachdem ein geschwächter p53-Pathway—d.h. durch eine p53-Mutation oder das G-Allel von SNP309—mit einer besseren Prognose für Ovarialkarzinompatientinnen assoziiert ist.

3.2.5 MDMX-Alterationen in Ovarialkarzinomen (unveröffentlichte Daten)

Neben Veränderungen des MDM2-Gens haben wir auch den Status von MDMX in Ovarialkarzinomen untersucht. Während die klinische Bedeutung von MDM2-Veränderungen in Tumoren, u.a. in Ovarialkarzinomen²⁶, gut dokumentiert ist, existieren zum Einfluss von MDMX-Veränderungen auf den Tumorprozess nur sehr wenige Daten. Wir haben daher Sequenzveränderungen (Mutationen und SNPs) des MDMX-Gens in Ovarialkarzinomen untersucht. Dabei haben wir uns zunächst auf die RING-Finger-Domäne (Exon 11) konzentriert, da diese Region mit dem RING-Finger von MDM2 interagiert. Sequenzveränderungen in diesem Bereich könnten aus diesem Grund die Stabilität von MDMX und auch von MDM2 erhöhen und so den p53-Pathway weiter abschwächen. In nur zwei Fällen detektierten wir im Tumormaterial eine heterozygote Punktmutation im Kodon 421 (AGA → CGA). Dies führt zu einem Austausch von Arginin zu Glycin. Damit ist eine wesentliche Änderung der Proteinstruktur verbunden. Darüberhinaus konnten wir einen SNP im 3'-untranslatierten Bereich des MDMX-Gens identifizieren. Es handelt sich um einen A/C-Austausch an der Position 34091 des MDMX-Gens (SNP34091), 31 bp nach dem Stop-Kodon. Der Anteil an Individuen mit einem A/A-Genotyp von SNP34091 (wt) war bei „low-grade“ Ovarialkarzinomen mit 48 % niedriger als bei gesunden Kontrollpersonen (55 %), bei „high-grade“ Ovarialkarzinomen dagegen höher (62 %). Das A-Allel des SNP34091 war in den untersuchten Ovarialkarzinomen mit einer gesteigerten MDMX-mRNA- und Proteinexpression assoziiert ($p=0,056$; $p=0,096$). Dies könnte auf eine erhöhte mRNA-Stabilität zurückzuführen sein. Durch Datenbankrecherchen haben wir gefunden, dass der 3'-UTR bei Vorhandensein des C-Allels eine Bindungsstelle für die die microRNA miR-191 und miR191* darstellt. Durch die Bindung dieser microRNAs an die MDMX-mRNA werden möglicherweise deren Stabilität und Translation negativ beeinflusst. Im Falle des A-Allels entsteht keine Bindungsstelle für diese microRNAs.

Die mögliche Regulation der MDMX-Expression durch microRNA und deren Einfluss auf die Aktivität des p53-Pathways wird zurzeit in einem Kooperationsprojekt mit der Arbeitsgruppe um Jean-Christophe Marine vom IMB in Gent, Belgien, untersucht. In multivariaten Cox-Regressionsanalysen (adjustiert nach der Größe des Resttumors) konnten wir zeigen, dass das A-Allel des SNP34091 mit einem erhöhten Rezidivrisiko als auch mit einem erhöhten Risiko, am Tumor zu versterben, assoziiert war. Dieser Effekt war auch vom ER-Status der Patientinnen abhängig. Bei Patientinnen mit einem A/A-Genotyp und einem ER-negativen Karzinom war das Rezidivrisiko um das 8,2-fache ($p=0,009$) und das Risiko, am Tumor zu versterben, um das 5,5-fache ($p=0,01$) erhöht. Unsere Daten zeigen erstmalig, dass Veränderungen von MDMX, insbesondere der SNP34091, eine wichtige Rolle bei Ovarialkarzinomen spielen.

3.3 Thematik 3 - Spleißvarianten von MDM2 und MDMX - Auftreten, Prognose

3.3.1 Detektion verkürzter Transkripte der MDM2-mRNA in WTS^{4,8}

Von Sigalas *et al.* konnten 1996¹²⁴ u.a. in Blasentumoren insgesamt 5 verschiedene Transkripte der MDM2-mRNA nachgewiesen werden. Vorarbeiten aus unserer Arbeitsgruppe zeigten an ausgewählten WTS-Zelllinien, dass ebenfalls Transkripte verschiedener Größe im Northern Blot detektierbar waren⁸⁵. Es sollte daher die Frage geklärt werden, ob auch in WTS-Tumorproben Spleißvarianten der MDM2-mRNA nachweisbar sind. Für die Analyse stand von 87 Patienten Tumorgewebe zur Verfügung.

Neben der Bande, die das FL-Transkript repräsentiert, waren in 51 von 85 Proben (60 %) zusätzlich kürzere Banden unterschiedlicher Länge nachweisbar. Die Anzahl der zusätzlichen Banden variierte zwischen den einzelnen Tumorproben. Während in einigen Proben nur eine weitere Bande mit stärkerer Intensität als die FL-Bande auftrat, war in anderen Proben eine Vielzahl von Banden mit geringerer Intensität detektierbar (Abb. 3-7). Es gelang, von 47 der 51 Proben einzelne Banden zu charakterisieren und eindeutig Spleißformen der MDM2-mRNA zuzuordnen, d.h. 55 % aller von uns untersuchten WTS-Proben exprimierten MDM2-mRNA-Spleißvarianten. In den untersuchten WTS-Proben konnten insgesamt 13 verschiedene Transkripte der MDM2-mRNA, einschließlich der FL-Form, nachgewiesen werden. Davon sind zwei Formen (MDM2-A und MDM2-B) bereits beschrieben worden¹²⁴. Die anderen 10 Formen wurden im Rahmen dieser Studie erstmalig detektiert, charakterisiert und bezeichnet. Eine Übersicht über alle detektierten Spleißvarianten findet sich in Bartel *et al.*⁸.

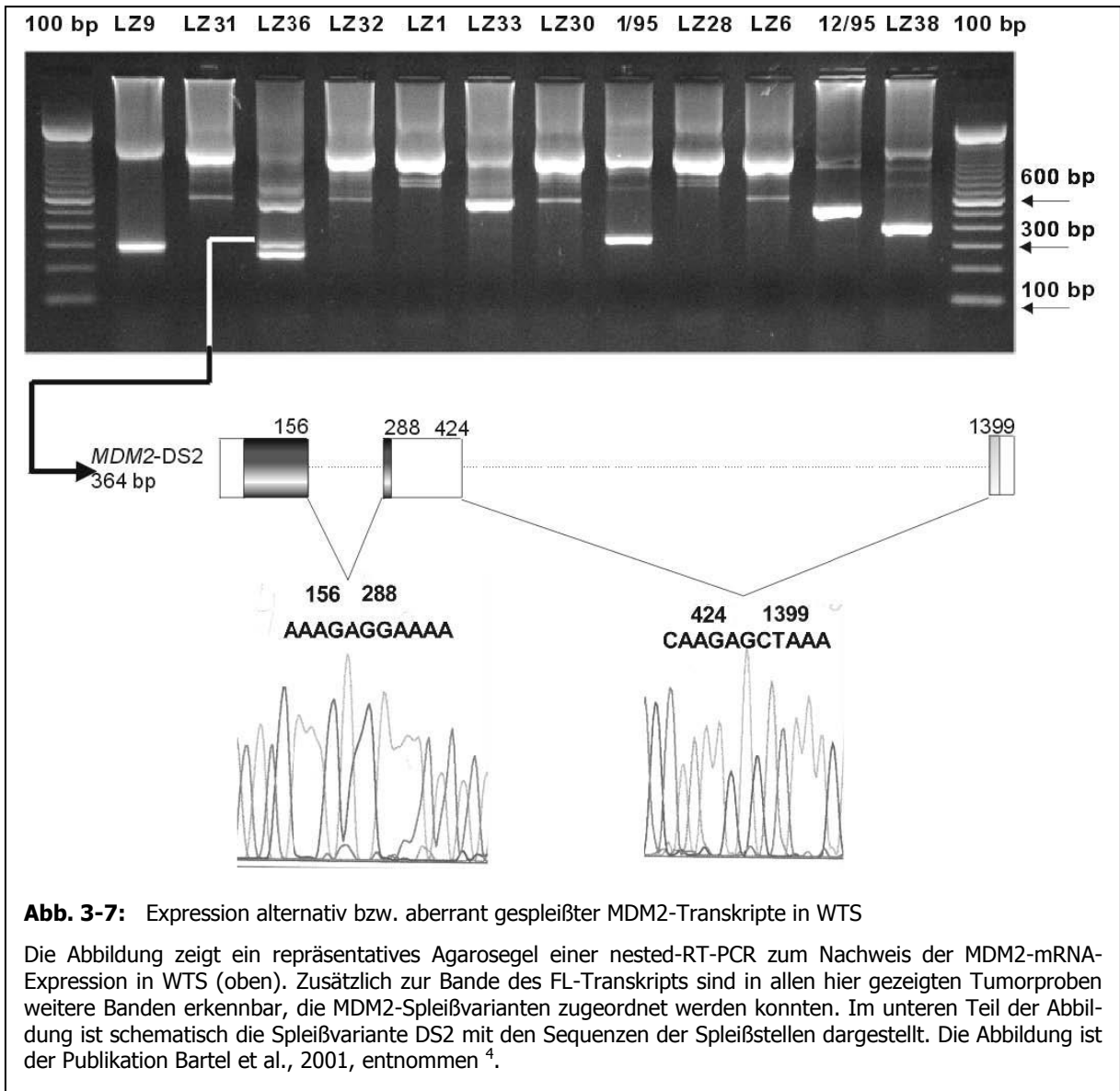


Abb. 3-7: Expression alternativ bzw. aberrant gespleißter MDM2-Transkripte in WTS

Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Agarosegel einer nested-RT-PCR zum Nachweis der MDM2-mRNA-Expression in WTS (oben). Zusätzlich zur Bande des FL-Transkripts sind in allen hier gezeigten Tumorproben weitere Banden erkennbar, die MDM2-Spleißvarianten zugeordnet werden konnten. Im unteren Teil der Abbildung ist schematisch die Spleißvariante DS2 mit den Sequenzen der Spleißstellen dargestellt. Die Abbildung ist der Publikation Bartel et al., 2001, entnommen ⁴.

In Zusammenarbeit mit Linda Harris vom St. Jude Children's Research Hospital (Memphis, USA) wurden RMS-Zelllinien und –gewebeproben analysiert. Insgesamt wurden 11 verschiedene Spleißvarianten der MDM2-mRNA detektiert. Fünf dieser Spleißformen wurden bereits in anderen Tumoren beschrieben ^{4,124}, während weitere sechs Spleißformen (MDM2-FB25 [Genbank-Eintrag: AF385322], -FB26 [AF385323], -FB28 [AF385324], -FB29 [AF385325], -FB30 [AF385326], -FB55 [AF385327]) von uns erstmals beschrieben wurden. Sieben der gefundenen Spleißformen waren alternativ gespleißt, d.h. an Exon/Intron-Grenzen. Der Leserahmen wurde dadurch nicht verschoben. Die Spleißvarianten FB25, FB26, F28 und FB29 dagegen sind Produkte eines aberranten Spleißprozesses. Durch die daraus resultierende Verschiebung des Leserahmens der mRNA weisen die abgeleiteten Proteinsequenzen eine veränderte Aminosäuresequenz am C-Terminus auf. Häufig sind die Proteine durch die Bildung eines frühen Stopp-Kodons weiter verkürzt. Mit der Ausnahme der Spleißform FB26 weisen alle hier gefundenen Varianten teilweise Verluste von Sequenzen der

p53-bindenden Domäne auf. Mit der Spleißvariante FB26 wurde von uns zum ersten Mal eine MDM2-Spleißvariante beschrieben, die eine vollständige, intakte p53-bindende Domäne aufweist. Es ist jedoch noch unklar, ob diese Isoform auch an p53 binden kann.

3.3.2 Detektion von MDM2-Spleißformen in Normalgewebe und Lymphozyten ⁵

Von einigen Patienten konnte auch an den Tumor grenzendes Normalgewebe (Muskel) mit in die Untersuchungen einbezogen werden. Als weitere Kontrolle stand Gesamt-RNA aus Blutlymphozyten gesunder Spender sowie eine Knochenmarksprobe zur Verfügung. Von den 7 Normalgewebeproben wurde in 4 Fällen das FL-Transkript der MDM2-mRNA nachgewiesen. Davon wiesen 3 zusätzliche verkürzte Banden im Agarosegel auf. In nur einem Fall konnte lediglich die Expression des FL-Transkripts gezeigt werden. Überraschenderweise exprimierten 3 der untersuchten Normalgewebeproben kürzere Varianten der MDM2-mRNA, jedoch nicht das FL-Transkript. Einige der Banden konnten nach der Reinigung aus dem Gel reamplifiziert und anschließend sequenziert werden. Dabei konnte eine neue MDM2-Spleißform (MDM2-N) identifiziert werden.

In den untersuchten Blut- und Knochenmarkproben konnten zusätzlich zum FL-Transkript jeweils eine kürzere Bande detektiert werden. Die Sequenzanalyse ergab, dass es sich in beiden Fällen um bislang noch nicht beschriebene Spleißvarianten der MDM2-mRNA handelt. Wir konnten somit zeigen, dass die Expression von MDM2-Spleißvarianten nicht auf das Tumorgewebe beschränkt ist. Dies spricht für eine normale physiologische Funktion der MDM2-Isoformen. In weiterführenden Arbeiten wäre daher die Frage zu klären, ob es spezifische, tumorassoziierte MDM2-Isoformen gibt und wie das Spleißen der MDM2-mRNA reguliert wird.

3.3.3 Charakterisierung der Spleißvarianten der MDM2-mRNA

Die Banden, die vermutlich verkürzte Transkripte der MDM2-mRNA repräsentierten, wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und gereinigt. Es gelang in nahezu allen Fällen, die gereinigten Fragmente mit dem Primerpaar MDM2-1/MDM2-8 zu reamplifizieren. Die so erhaltenen PCR-Produkte wurden direkt sequenziert. Die Sequenzen der PCR-Produkte sind mit der Sequenz der FL-MDM2-cDNA (Genbank-Eintrag NM002392) verglichen worden, um zu ermitteln, welche Domänen in den Spleißformen noch vorhanden sind. Einzelheiten zu den Varianten sind den Publikationen zu entnehmen, in denen die Transkripte ausführlich beschrieben wurden ^{2,4,5,8}.

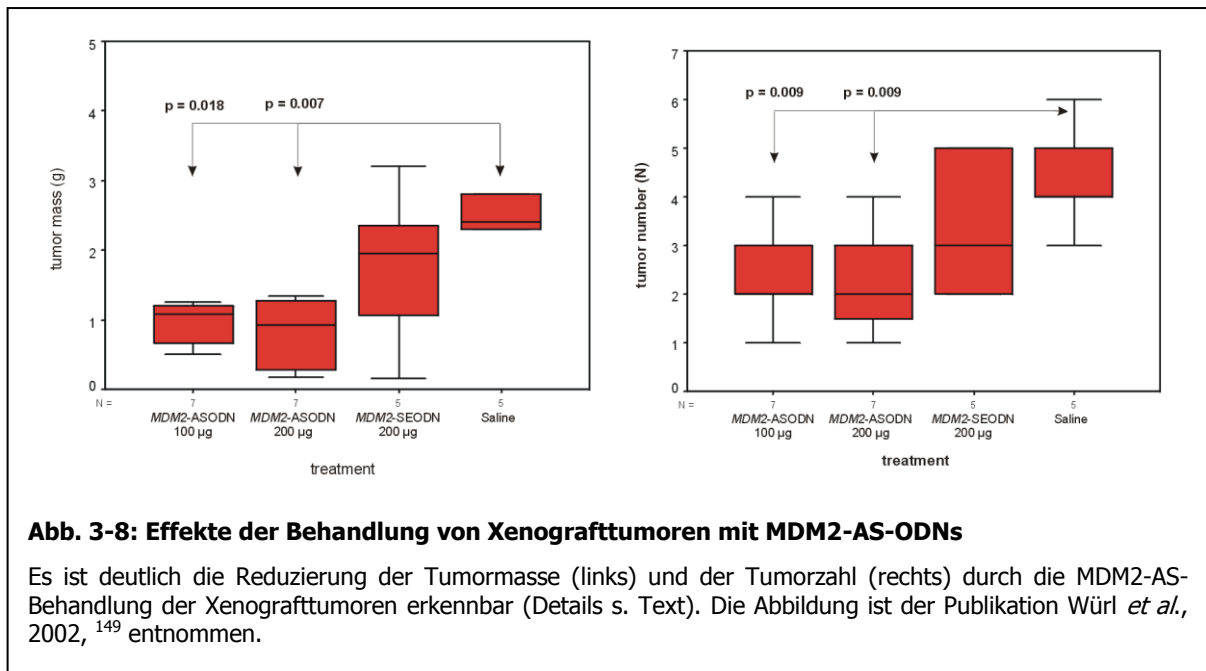
3.4 Thematik 4 - MDM2 als ein therapeutisches Target für WTS ^{2,149}

3.4.1 Etablierung eines WTS-Xenotransplantationsmodells in nu/nu-Ratten

Im Rahmen eines experimentellen *in-vivo*-Therapieansatzes sollten die Effekte einer MDM2-Antisense-Therapie studiert werden. Für die Etablierung eines Xenotransplantationsmodells für WTS in nu/nu-Ratten wurde die ATCC-Zelllinie RD verwendet. Zum Einen, weil diese Zelllinie nur ein mutiertes p53-Allel aufweist (das zweite Allel ist deletiert) und dadurch die Effekte einer MDM2-AS Therapie unabhängig von wt-p53-Protein untersucht werden konnten. Zum Anderen war durch Arbeiten aus unserer Arbeitsgruppe bekannt, dass diese Linie im Maus- und Rattenmodell reproduzierbar Tumoren bilden kann ⁸⁵. Diese Versuche wurden unter meiner maßgeblichen Mitarbeit an der Klinik für Allgemeinchirurgie der Universität Leipzig durchgeführt.

3.4.2 Behandlung von Xenotransplantattumoren mittels MDM2-AS Oligonukleotiden

In den Versuchsreihen wurde die Behandlung der Xenotransplantattumoren der STS-Zelllinie RD in den nachfolgenden Studien wie folgt durchgeführt: (i) es wurden verschiedene Konzentrationen des MDM2-AS2-ODNs eingesetzt und (ii) die Implantation der osmotischen Minipumpen erfolgte eine Woche nach der Xenotransplantation des Tumorgewebes. Es wurden insgesamt 24 Ratten behandelt, davon je 7 Tiere mit 100 µg bzw. 200 µg des MDM2-AS-ODN ⁶⁷ und jeweils 5 Tiere als Kontrolle mit entweder 100 µg MDM2-SE-ODN oder physiologischer Kochsalzlösung. Die Behandlung der Tumoren mit MDM2-AS2-ODNs (100 bzw. 200 µg) führte zu einer signifikanten Reduzierung der Gesamttumormasse im Vergleich zu den mit Kochsalzlösung behandelten Tieren ($p = 0,016$ bzw. $p = 0,007$, Student t-Test). Nach 7 Tagen Behandlung mit 200 µg MDM2-AS-ODNs lag die durchschnittliche Tumormasse in dieser Gruppe bei $0,78 \text{ g} \pm 0,53 \text{ g}$ (Abb. 3-8), dies entspricht etwa einer 71 %igen Verminderung im Vergleich zu der Kontrollgruppe, die mit physiologischer Kochsalzlösung behandelt worden ist ($2,64 \pm 1,33 \text{ g}$), und einer 56 %igen Reduzierung der Tumormasse im Vergleich zu der Gruppe, die mit MDM2-SE-ODNs behandelt wurde ($1,74 \pm 1,17 \text{ g}$). Die kontinuierliche intraperitoneale MDM2-AS-Behandlung inhibierte nicht nur die MDM2-Proteinexpression, sondern bewirkte auch einen Rückgang der mt-p53-Proteinmenge. Die erzielten Ergebnisse in dieser *in-vivo*-Studie zeigen somit das Potenzial einer Therapie mit MDM2-AS-ODNs unabhängig vom p53-Status des Tumors auf. Damit könnte MDM2 von allgemeiner Bedeutung für die Behandlung von Tumoren sein.



4. Diskussion

Das MDM2-Onkogen wurde ursprünglich in einer transformierten BALB/c-Mauszelllinie entdeckt, in der das Gen vielfach amplifiziert vorlag und das Protein überexprimiert wurde^{14,32}. Das MDM2-Protein ist in der Lage, mit p53 Komplexe zu bilden und dadurch dessen Funktion als Transaktivator zu hemmen^{56,90,97}. Andererseits wird die Expression von MDM2 durch p53 positiv reguliert. Damit sind das Onkogen MDM2 und der Tumorsuppressor p53 durch einen so genannten „autoregulatorischen“ Feedback-Loop miteinander verbunden¹⁰⁵. Ein weiterer negativer Regulator der p53-Aktivität ist das MDM2-Homologe MDMX^{122,123}. MDMX kann sowohl an p53 als auch MDM2 binden. In einer Vielzahl von Tumorarten kommt es zu Störungen des Gleichgewichts zwischen MDM2, MDMX und p53¹³⁷. Eine Ursache können Mutationen des p53-Gens sein, wie dies in bis zu 50 % der Tumore der Fall ist⁵². Dies führt vielfach zur Expression eines funktionell inaktiven oder dominant negativen p53-Proteins. Andererseits ist das MDM2-Onkoprotein in vielen Tumorarten (u.a. in WTS) überexprimiert³⁸. Dies ist bei einem Tumor mit wt-p53 einer Mutation des p53-Gens vergleichbar. Eine verstärkte Expression von MDM2 ist oftmals mit einer schlechten Prognose, insbesondere für WTS-Patienten, verbunden^{23,150}. Die Ursache für die MDM2-Überexpression kann eine Amplifikation des MDM2-Gens sein. Oftmals kann dies aber auch auf verstärkte Transkription und/oder auf Transkripte mit einer unterschiedlichen Translationseffizienz zurückgeführt werden^{1,72,73}. Ein weiterer Mechanismus, der zu einer veränderten MDM2-Expression in Tumoren beitragen kann, ist das Vorkommen von Spleißvarianten der MDM2-mRNA und verschiedener MDM2-Isoformen, wie es für verschiedene Tumorzelllinien aus Mausmodellen beschrieben worden ist^{44,90,94,96}. Es war daher von Interesse zu prüfen, ob es in WTS (mesenchymalen Ursprungs) und Ovarialkarzinomen (epithelialen Ursprungs) zu Veränderungen im p53-MDM2-MDMX-Pathway kommt und ob diese eine prognostische Aussagekraft besitzen.

4.1 Molekulare Veränderungen des p53-MDM2-MDMX-Pathways und deren prognostische Bedeutung

Die Charakterisierung der Veränderungen des p53 –Pathways in WTS umfasste u.a. die Analyse des Amplifikationsstatus des MDM2- und des MDMX-Gens sowie die MDM2-Proteinexpression. Anschließend wurden die molekularen mit klinischen Daten korreliert, um zu prüfen, ob diese Einfluss auf den Krankheitsverlauf haben und eventuell als neue unabhängige Prognosefaktoren für WTS dienen können.

In unseren Untersuchungen konnte in 28 % (21 von 75) der untersuchten WTS-Proben eine Amplifikation des MDM2-Gens detektiert werden⁴, wobei die meisten Proben eine 3 –

10-fache Amplifikation aufwiesen. Dieser Anteil ist etwas höher als die für WTS in einer MDM2-Amplifikationsdatenbank publizierten Werte⁸⁹. Dort wird eine durchschnittliche Amplifikationsfrequenz von 20 % für WTS angegeben^{23,37,71,91,92,96,101,102,107,113,140}. Cordon-Cardo *et al.*, die ein Kollektiv von 73 WTS-Patienten auf eine MDM2-Genamplifikation hin untersucht haben, fanden eine Rate von 15 % positiven Fällen²³, Florenes *et al.*, die insgesamt 97 WTS verschiedener Subtypen analysiert haben, berichten über eine Rate von 10 %³⁷. Diese Unterschiede lassen sich möglicherweise auf die histologische Heterogenität und den differierenden Anteil der Tumoren in den einzelnen Malignitätsgraden der untersuchten WTS-Patientenkollektive zurückführen. Interessanterweise war die Amplifikation des MDM2-Gens mit einem geringen Tumorgrad verbunden. Während 58 % der Grad I Tumoren eine Amplifikation aufwiesen, so waren dies nur 15 % der WTS mit dem Tumorgrad II und III ($p = 0,001$, χ^2 -Test). Ähnliche Befunde wurden Nakayama *et al.*⁹¹ sowie von Nilbert *et al.*⁹² beschrieben. Die beiden Arbeitsgruppen konnten in benignen Lipomen eine Amplifikationsfrequenz von 30 % nachweisen. In einer multivariaten Cox-Regression erwies sich die Amplifikation des MDM2-Gen als unabhängiger prognostischer Faktor für WTS (RR = 4,4, $p = 0,17$)⁴.

Die Amplifikation des MDM2-Gens war in unseren Untersuchungen sehr stark mit einer hohen MDM2-mRNA-Expression verbunden ($p = 0,005$, χ^2 -Test). In den von Florenes *et al.* untersuchten WTS wiesen alle Tumoren mit einem amplifizierten MDM2-Gen auch eine stark erhöhte MDM2-mRNA-Menge auf³⁷. Da jedoch ebenfalls in Proben ohne Genamplifikation hohe mRNA-Level detektiert wurden, ist anzunehmen, dass noch weitere Mechanismen zu einer verstärkten MDM2-mRNA-Expression beitragen. In weiteren Arbeiten konnten wir zeigen, dass moderat erhöhte MDM2-mRNA-Mengen ebenfalls mit einer guten Prognose für WTS-Patienten korrelieren¹³⁵. Der Befund, dass nachweisbare MDM2-mRNA-Mengen mit einer guten Prognose für die Patienten verbunden sind, konnte durch andere Arbeitsgruppen unabhängig voneinander an Ovarialkarzinomen¹²⁹ und Lungenkarzinomen⁶³ bestätigt werden. In diesen Arbeiten wurden jedoch keine Angaben zum Amplifikationsstatus des MDM2-Gens gemacht.

Im Gegensatz zu p53- und MDM2-Veränderungen gibt es bislang nur sehr wenige Daten in Bezug auf die MDMX-Genamplifikation und MDMX-mRNA-Expression in Tumoren^{112,117,118}. Wir konnten erstmals zeigen, dass die MDMX-Genamplifikation und die MDMX-S-Überexpression unabhängige prognostische Bedeutung für WTS besitzen und mit einer schlechten Prognose für WTS-Patienten korrelieren. Unsere Daten deuten darauf hin, dass neben p53 und MDM2 auch MDMX einen Einfluss auf die Progression von WTS haben dürfte.

In dem von uns untersuchten WTS-Kollektiv war das MDMX-Gen in 27 % der Fälle amplifiziert. Riemenschneider *et al.* beschrieben, dass die MDMX-Genamplifikation und die

mRNA-Überexpression überwiegend in Glioblastomen gefunden wurde, die keine p53-Mutationen aufwiesen¹¹⁷ und schlussfolgern daraus, dass die MDMX-Amplifikation ein neuer Mechanismus für die Entstehung maligner Gliome sein könnte, um sich der p53-kontrollierten Wachstumskontrolle zu entziehen. Dies konnte auch für unsere Patientenkollektive bestätigt werden: nur ein Tumor von 16 mit einer MDMX-Amplifikation wies auch eine p53-Mutation auf (eine intronische Mutation, F. Bartel, unveröffentlichte Daten). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die MDMX-Genamplifikation und/oder MDMX-Überexpression und p53-Mutationen unabhängige Mechanismen repräsentieren, um das p53-Protein in Tumoren zu inaktivieren.

Neben der MDMX-Genamplifikation haben wir auch die MDMX-mRNA-Expression in WTS untersucht. Wir konnten zeigen, dass ein Teil der Tumoren durch eine Überexpression der Spleißvariante MDMX-S charakterisiert ist, und dass dies mit einem 9-fach erhöhten Risiko, am Tumor zu versterben, korreliert. Weiterhin ist dies mit einer drastisch verkürzten Überlebenszeit für diese Patienten verbunden. Dies ist in Übereinstimmung mit Befunden von Riemenschneider und Mitarbeitern, die berichten, dass besonders hohe Mengen an MDMX-S im Vergleich zu FL-MDMX vor allem in Glioblastomen, jedoch nicht in anaplastischen Gliomen bzw. niedriggradigen Gliomen gefunden wurden¹¹⁷. Daten von Rallapalli *et al.*¹¹⁰ und de Graaf *et al.*²⁵ zeigen, dass das verkürzte Protein MDMX-S sehr viel effektiver die p53-vermittelte Transaktivierung und die Apoptoseinduktion inhibieren kann als FL-MDMX. Es ist daher denkbar, dass die Aktivierung von MDMX-S zur Transformierung von Zellen beiträgt, indem es Wildtyp-p53 inaktiviert.

In Zusammenarbeit mit der Gruppe um Arnold J. Levine und Gareth Bond vom Institute of Advanced Studies, Princeton, USA, haben wir den Einfluss von SNPs im p53-Pathway auf die Tumorentstehung und den Krankheitsverlauf untersucht. Ein SNP im p53-sensitiven MDM2-P2-Promotor könnte das Gleichgewicht zwischen p53 und MDM2 stören und eine Schwächung der p53-Aktivität bewirken. Der identifizierte SNP309 (T>G) erhöht die Affinität des Transkriptionsfaktors Sp1 zum MDM2-Promotor, was eine erhöhte MDM2-Expression in Zellen mit einem G/G-Genotyp zur Folge hat¹¹. Sowohl transformierte als auch nicht-transformierte Zellen, die homozygot für SNP309 (G/G) waren, zeigten eine deutlich abgeschwächte Antwort (Apoptose, Zellzyklusarrest) nach Behandlung mit DNA-schädigenden Agenzien im Vergleich zu SNP309-Wildtyp Zellen (T/T). Anschließend haben wir in unserem WTS-Kollektiv den Einfluss des SNP309 auf die Tumorentstehung und den Krankheitsverlauf untersucht. Es zeigte sich, dass Patienten mit dem G/G-Genotyp 12 Jahre früher an einem WTS erkrankten als Patienten mit dem T/T-Genotyp (Wildtyp). Die Allelverteilung in den Tumorproben entsprach der Verteilung wie sie auch in der Kontrollgruppe (gesunde Blutspender) gefunden wurde. Es scheint also keine Anreicherung des G-Allels in den Tumorproben zu geben. Neben der Korrelation mit einer früheren Tumorentstehung gab es

keine weitere Assoziation mit anderen klinischen Daten. Um die Frage zu klären, warum der SNP309 mit dem Alter bei Tumorentstehung korreliert, nicht jedoch mit einem generell erhöhten Risiko, am Tumor zu erkranken, sind vergleichende Studien mit höheren Fallzahlen notwendig. In Liposarkomen wiesen wir nach, dass das G-Allel ein so genanntes „rate-limiting event“ ist, d.h. dass die Zahl der zur Tumorentstehung notwendigen Alterationen (z.B. Mutationen) stark herabgesetzt ist ¹¹. Andererseits könnte es gewebespezifische Unterschiede in der Expression des Transkriptionsfaktors Sp1 geben, so dass der Effekt von SNP309 nicht in allen Geweben bzw. Tumorarten zum Tragen kommt.

Seit der erstmaligen Beschreibung des SNP309 konnte in zahlreichen anderen Tumorarten ein Zusammenhang mit einem früheren Auftreten des Tumors und auch mit einem erhöhten Risiko, am Tumor zu erkranken, gezeigt werden, u.a. bei B-Zell CLL ⁴³, Mammakarzinom ¹⁵⁶, Kolorektalkarzinom ⁸⁴ und dem Magenkarzinom ⁹⁵. Demgegenüber konnte bei Basalzellkarzinomen ¹⁴⁷, Lungenkarzinomen ¹⁰⁸ sowie dem Prostatakarzinom ¹²⁷ kein Einfluss des SNP309 auf die Tumorentstehung nachgewiesen werden. Die Ursache dafür könnte darin liegen, dass es neben dem SNP309 noch andere Polymorphismen gibt, die die Funktionalität von p53 beeinflussen. Ein weiterer Aspekt ist die Geschlechtsspezifität von SNP309. Bei WTS und dem Kolonkarzinom kommt es insbesondere bei Frauen, nicht jedoch bei Männern, zu einer beschleunigten Tumorentstehung bei Patienten mit dem G/G-Genotyp im Vergleich zum T/T-Genotyp ¹². Dies lässt den Schluss zu, dass das G-Allel bei einem intakten Östrogenrezeptor-Signalweg den p53-Pathway negativ beeinflusst.

In weiteren Arbeiten haben wir die Expression der promotorspezifischen Transkripte (P1, P2) der MDM2-mRNA und deren Einfluss auf die Tumorentstehung und Prognose von WTS-Patienten untersucht. Wir konnten erstmalig zeigen, dass eine hohe Expression des P1-Transkripts, nicht jedoch des P2-Transkripts, mit einem früheren Auftreten eines WTS verbunden ist, und dass eine geringe Expression von P1 und P2 mit einem stark verkürzten Gesamtüberleben assoziiert ist ¹³³. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass MDM2 in Bezug auf Tumorenstehung und Krankheitsverlauf unterschiedlich wirken kann. Die Expression von p53 und MDM2 oszilliert bei der zellulären Stressantwort, wobei die der Anstieg bzw. Abfall der MDM2-Menge der von p53 zeitverzögert folgt ⁷⁵. Hu *et al.* fanden, dass geringste Änderungen der MDM2-Expression (erhöhte oder verminderte Expression) zu Störungen der Oszillation und somit zu einer Inaktivierung des p53-Pathways führen ⁵⁴. Des Weiteren gibt es Unterschiede in der Translationseffizienz der beiden Transkripte ^{13,20}. Laut Cheng und Cohen wird vom P2-Transkript hauptsächlich das p90^{MDM2} translatiert, während vom P1-Transkript sowohl das p90^{MDM2}- als auch das verkürzte p75^{MDM2}-Protein gebildet wird. Die Autoren zeigten, dass p90^{MDM2} am p53-MDM2-Feedback-Loop beteiligt ist, nicht jedoch p75^{MDM2}. Aktuelle Daten von Mendrysa *et al.* deuten darauf hin, dass bereits kleine Änderungen der MDM2-Expression einen starken Effekt auf die Bildung von Tumoren haben können.

Es wurde in APC^{min/+}-Mäusen (diese Mäuse weisen einen Defekt im *adenomus polyposis coli*-Gen auf und entwickeln spontan Adenome im Darm) untersucht, ob die erhöhte p53-Aktivität infolge einer verminderten MDM2-Expression die Bildung solider Tumoren verhindern kann. Während Mäuse mit einer normalen MDM2-Expression nach 5 Monaten 48 Adenome aufwiesen, so waren dies bei Mäusen mit einer um 20 % reduzierten MDM2-Expression nur 16 Adenome. Bei Mäusen mit ~30 % der normalen MDM2-Expression entwickelten noch weniger Tumoren⁸³. Dies bestätigt die Daten aus unseren Studien, wonach eine erhöhte MDM2-Expression mit einer beschleunigten Tumorentstehung assoziiert ist¹³³.

Neben den Weichteilsarkomen untersuchten wir in unserer Arbeiten auch Veränderungen des p53-Pathways in Ovarialkarzinomen, u.a. den p53-Mutationsstatus, dessen Proteinexpression sowie den im p53-sensitiven MDM2-P2-Promotor liegenden SNP309 in einer Gruppe von 107 Ovarialkarzinomen. In 39 % (42 von 107) der Tumoren fanden wir p53-Mutationen, die eine Veränderung der Aminosäuresequenz bewirken. Dieser Prozentsatz ist nahe dem Bereich von 40-80 %, welcher in der Literatur für Ovarialkarzinome beschrieben wird³⁴. Eine positive p53-Immunfärbung von 51 % liegt in dem publizierten Bereich von 29-62 % für FIGO I-IV Patientinnen^{28,41,47,51,62,76,119,139}.

Unsere Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Immunhistochemie kein sicherer Marker für den p53-Genstatus ist. Wir fanden, dass die Hälfte der Fälle mit einem Wildtyp p53-Gen auch positiv für die p53-Immunfärbung waren, ein Prozentsatz der über dem liegt, was bisher von anderen Arbeitsgruppen veröffentlicht wurde^{50,116}. Havrilesky *et al.* fanden in 28 %⁵⁰ und Reles *et al.*¹¹⁶ in 38 % der von ihnen untersuchten Tumore eine Überexpression des p53-Proteins bei Vorhandenseins eines Wildtyp-Gens. Wildtyp-p53 ist normalerweise sehr instabil und ist in der Zelle mittels Immunhistochemie nicht nachweisbar⁷⁷. Unter diesem Gesichtspunkt ist es überraschend, dass es sich bei 90% der Wildtyp-p53 überexprimierenden Tumore um high-grade Karzinome handelt. Die Ursache für diese unnormale Stabilität ist bisher unbekannt. Es ist möglich, dass es Veränderungen in der Funktionalität von p53-interagierenden Proteinen, wie MDM2 oder MDMX, gibt¹⁵⁵. Weitere Studien sind nötig, um die Gründe für diesen Befund zu klären, besonders unter dem Aspekt, dass in unserer Studie 82 % dieser Tumoren ein Rezidiv bildeten, während dies nur 52 % der Patientinnen mit normalem p53 (Wildtyp-Gen, keine Expression) der Fall war.

In der Literatur gibt es Hinweise, dass eher die Überexpression von p53^{119,139} als Mutationen^{33,70} mit einem verkürzten Gesamtüberleben korrelieren. Es muss jedoch hinzugefügt werden, dass in diesen Studien der p53-Mutations- und Proteinexpressionsstatus separat betrachtet wurden. Unsere Ergebnisse zeigen, dass eine 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 dagegen 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^{17,50,116} sowohl den p53-Genstatus als auch die Proteinexpression untersucht haben, wurde der prognostische Wert einer Überexpression von Wildtyp-p53 bisher unterschätzt. Weitere Studien sind notwendig um die Mechanismen der Wildtyp-p53-Überexpression zu klären, weil dies Einblicke in die Mechanismen der Resistenzentwicklung verspricht. Zusätzlich unterstreicht diese Studie die Bedeutung der p53-Funktionalität. Dies erscheint wichtiger als die getrennte Untersuchung von p53-Mutation oder Proteinexpression.

Zusätzlich zum p53-Status haben wir auch den SNP309 im p53-sensitiven P2-Promotor des MDM2-Gens untersucht und dabei gefunden, dass das G-Allel des SNP309 mit einem niedrigen Erkrankungsalter bei Frauen, aber nicht bei Männern, mit Weichteilsarkomen verbunden ist¹². In unseren Studien an Ovarialkarzinomen konnten wir nachweisen, dass das G-Allel des SNP309 nur bei Tumoren mit einer sehr starken ER-Expression mit einem niedrigen Diagnosealter (8 Jahre früher; $p = 0,048$) verbunden ist³. 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 wurde¹⁵. 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 Komplexität der Wechselwirkung und den unterschiedlichen Einfluss von p53 und MDM2 auf die Entstehung und die Progression von Tumoren im Allgemeinen und Ovarialkarzinomen im Speziellen.

Alterationen des MDMX-Gens und deren Einfluss auf die Tumorentstehung und -progression sind in Ovarialkarzinomen bislang nicht untersucht worden. In einer kürzlich publizierten Studie von Reincke *et al.* über Sequenzveränderungen von MDMX in 43 Fällen von familiärem Brustkrebs zeigte deutlich, dass aktivierende Mutationen von MDMX sehr selten auftreten¹¹⁵. Nur 3 der 43 Patientinnen wiesen MDMX-Mutationen auf. Dies bestätigen auch erste Daten zum Mutationsstatus des MDMX-Gens bei Ovarialkarzinompatientinnen. Bei 3 von 102 untersuchten Patientinnen wurde eine Mutation detektiert (Bartel *et al.*, unveröffentlichte Daten). Wir konnten im Rahmen dieser Arbeit erstmals zeigen, dass der SNP im 3'-untranslatierten Bereich des MDMX-Gens (SNP34091) mit einem stark verkürzten Gesamtüberleben und einem kürzeren rezidivfreien Überleben korreliert. Das A-Allel von SNP34091 ist mit einer erhöhten MDMX-mRNA- und -Proteinexpression assoziiert, und dies führt in der Folge zu einer Inaktivierung des p53-Pathways. Der negative Effekt des A/A-

Genotyps auf das rezidivfreie und das Gesamtüberleben wurde von uns nur in den ER-negativen Fällen beobachtet. Der SNP im MDMX-Gen war jedoch nicht mit dem Alter der Tumorentstehung verknüpft. Daraus lässt sich ableiten, dass MDMX eher mit dem klinischen Verlauf und der Chemotherapieresistenz assoziiert ist als mit der Tumorentstehung. Im Gegensatz zum MDM2-Gen weist das MDMX-Gen keine Bindungsstellen für den Östrogen-Rezeptor auf. Daher kann die MDMX-Expression auch nicht durch den ER werden, wie dies für MDM2 in MCF-7-Zellen nachgewiesen werden konnte¹⁰³. In unserem WTS-Kollektiv konnten wir eindrucksvoll zeigen, dass der Effekt des G-Allel von SNP309 durch einen intakten ER-Signalweg verstärkt wird^{3,12}. Wir vermuten daher, dass der Effekt des SNP309 (also erhöhte MDM2-Mengen) vor allem in ER-positiven Tumoren (Gewebe) eine Rolle spielt, und so den Effekt von SNP34091 (d.h. die Inaktivierung des p53-Pathways durch erhöhte MDMX-Mengen) in diesen Tumoren "überlagert", während in ER-negativen Tumoren (Gewebe) der Effekt des SNP34091 stärker ist.

Der ER-Status und das Risiko an einem Ovarialkarzinom zu erkranken ist auch im Zusammenhang mit der menopausalen Hormontherapie (MHT) von Bedeutung. Frauen in den Wechseljahren werden entweder mit Östrogen allein oder einer Kombination aus Östrogen und Progestin behandelt, um die Beschwerden wie beispielsweise Hitzewallungen zu mindern. Ob durch die MHT das Risiko steigt, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, ist bislang jedoch nur unzureichend untersucht worden. Eine aktuelle Meta-Analyse nach Auswertung von 42 Studien von Greiser *et al.*⁴² kommt zu dem Schluss, dass das Risiko bei einer Behandlung mit Östrogen um das 1,28-fache ansteigt, wohingegen das Risiko, an einem Mammakarzinom infolge der MHT zu erkranken, nicht erhöht ist⁵⁵. Unsere Daten belegen eindeutig einen Zusammenhang zwischen einer hohen ER-Expression, dem SNP309 und einem früheren Auftreten eines Ovarialkarzinoms. Es ist denkbar, dass bei Patientinnen, die eine MHT erhalten und heterozygot bzw. homozygot für den SNP309 sind (T/G bzw. G/G-Genotyp), ein höheres Risiko besitzen, infolge der MHT ein Ovarialkarzinom zu entwickeln. Es wäre daher interessant, in den im Review von Greiser *et al.*⁴² beschriebenen Patientenkollektiven retrospektiv die Allelfrequenz des SNP309 zu bestimmen, um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Gabe von Östrogen und dem SNP309-Status zu ermitteln.

Eine mögliche Erklärung für die erhöhten MDMX-mRNA und -Proteinmengen bei Patientinnen mit dem A/A-Genotyp könnte die unterschiedliche Bindung von Faktoren sein, die die mRNA-Stabilität und /oder die Translationseffizienz regulieren. Bei der Analyse des 3'-UTR der MDMX-mRNA (<http://mirna.imbb.forth.gr/microinspector/>) stellte sich heraus, dass durch das C-Allel eine Bindungsstelle für die microRNAs hsa-miR191 und hsa-miR191* entsteht. Diese microRNAs binden jedoch nicht an das A-Allel von SNP34091. Daraus lässt sich ein Modell ableiten, in dem die MDMX-Expression in Individuen mit dem A/C und C/C-Genotyp von SNP34091 durch microRNAs beeinflusst wird. In aktuellen Arbeiten in Koope-

ration mit der Arbeitsgruppe um Jean-Christoph Marine vom IMB in Gent (Belgien) untersuchen wir den genauen Mechanismus der Regulation der MDMX-Expression durch hsa-miR191 und hsa-miR191* und den Einfluss auf die Funktionalität des p53-Pathways. Erste Ergebnisse zeigen, dass die Überexpression von hsa-miR191 in Zellen mit dem C/C-Genotyp (Efo-21) nicht jedoch in Zellen mit dem A/A-Genotyp (OAW-42) zu einer Reduzierung der MDMX-Proteinmenge kommt. Da die mRNA-Menge unverändert bleibt, beruht die Wirkung der microRNA hsa-miR191 auf einer Blockierung der Translation und nicht auf der Destabilisierung der mRNA.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der A/A-Genotyp von SNP34091 ein unabhängiger Prognosefaktor für Ovarialkarzinome ist und mit einem stark verkürzten rezidivfreien und Gesamtüberleben assoziiert ist. Das A-Allel korreliert mit einer erhöhten MDMX-Expression, was zu einer Inaktivierung des p53-Pathways in den betroffenen Tumoren führt. Obwohl der genaue Mechanismus noch nicht geklärt ist, deuten unsere Daten auf allelspezifische Unterschiede bei der Chemoresistenz bei Ovarialkarzinomen hin. Damit könnte MDMX ein vielversprechendes Zielprotein sein, um die Tumoren gegenüber einer Chemotherapie zu sensitivieren.

4.2 Expression von Spleißvarianten der MDM2-mRNA

Zu Beginn der Arbeiten wurden von Sigalas *et al.* insgesamt fünf verkürzte MDM2-mRNA-Transkripte in Blasen- und Ovarialkarzinomen nachgewiesen¹²⁴. In 50 % der Ovarialkarzinomproben wurden alternativ gespleißte Transkripte detektiert. Für die von uns untersuchten WTS konnte ein ähnlich hoher Anteil ermittelt werden.

In unseren Studien korrelierte die Expression der Spleißformen mit dem Tumorgrad. Während nur 30 % der WTS mit Grad I verkürzte MDM2-Transkripte exprimierten, so betrug der Anteil bei den Malignitätsgrade II und III über 60 %⁴. Obwohl das Vorkommen der Spleißformen mit einem höheren Malignitätsgrad einhergeht, zeigte sich jedoch kein Einfluss auf das Überleben der Patienten. Vergleicht man unsere Ergebnisse mit Daten aus der Literatur, so bestätigt sich, dass MDM2-Spleißformen bevorzugt in Tumoren mit einem aggressiveren Phänotyp exprimiert werden. So wurden in 80 % der „high-grade“ Ovarialkarzinome verkürzte Transkripte gefunden, während nur 37 % der „low-grade“ Ovarialkarzinome davon betroffen waren¹²⁴. Des Weiteren sind in 58 % der Tumoren im Stadium III und IV, aber nur in 22 % der Tumoren im Stadium I und II Spleißformen der MDM2-mRNA detektiert worden¹²⁴. Von den ebenfalls von Sigalas *et al.* untersuchten Blasenkarzinomen exprimierten 57 % der invasiv wachsenden Tumoren, aber nur 6 % der oberflächlichen Tumoren Spleißformen. In der Untersuchung von Lukas *et al.* exprimierten von 38 Mammakarzinomen

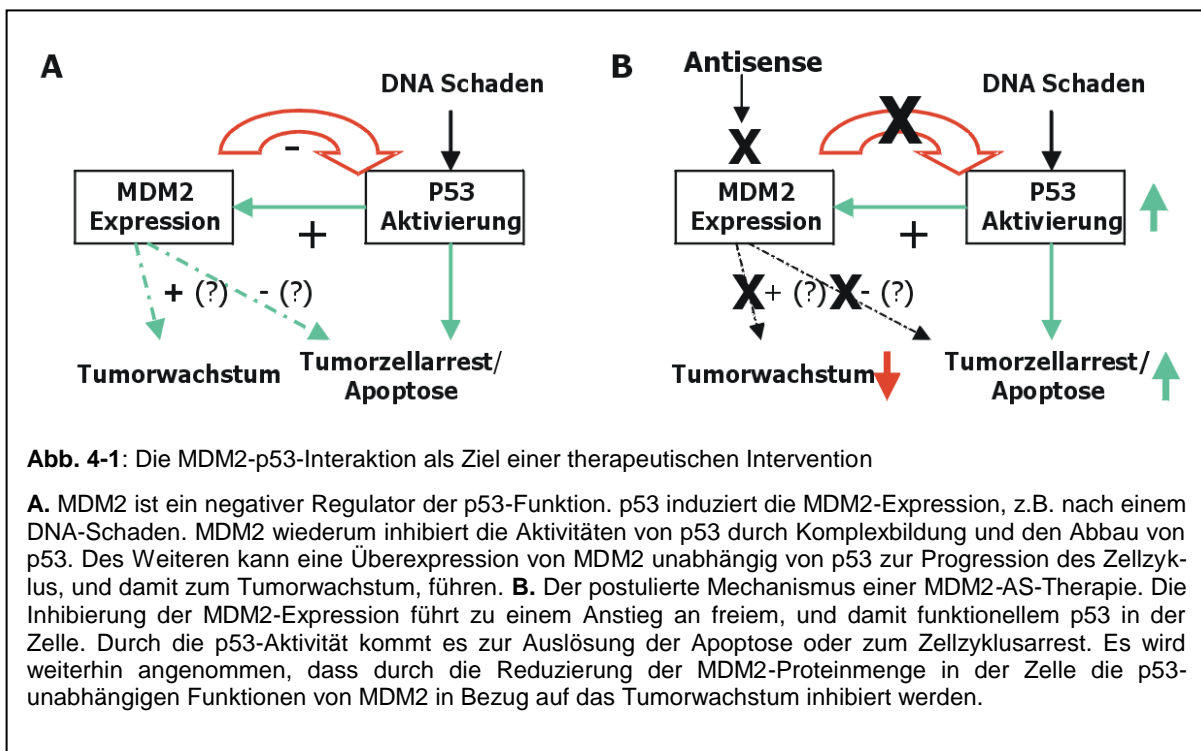
13 Proben verkürzte Transkripte zusätzlich zur FL-Form⁷⁸. Es zeigte sich kein Einfluss auf das Überleben der Patienten. Weitere Studien befassten sich mit Alterationen der MDM2-mRNA-Expression u.a. in Liposarkomen¹²⁸, Glioblastomen⁸¹, nicht kleinzelligen Lungenkarzinomen³⁰ sowie Riesenzelltumoren des Knochens³¹. Übereinstimmend wurde ein Zusammenhang zwischen der Expression von MDM2-Spleißvarianten und einem erhöhten Malignitätsgrad gefunden^{30,31,81,128}. Unsere Ergebnisse zeigen hingegen keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen alternativem bzw. aberrantem Spleißen und einem aggressiverem Phänotyp. Sie deuten vielmehr darauf hin, dass auch die Expression von mRNA-Transkripten, die nicht an regulären Donor-/Akzeptorstellen gespleißt werden, der „normalen“ physiologischen Situation entsprechen. Die von uns in Normalgewebe von Patienten und in peripheren Blutlymphozyten gesunder Spender nachgewiesenen Spleißvarianten MDM2-N sowie MDM2-BL sind beispielsweise an Sequenzen gespleißt worden, die innerhalb bekannter Exone lokalisiert sind⁵.

Unsere Ergebnisse und die Analyse der Sequenzmotive zeigten, dass das aberrante Spleißen möglicherweise auf Alterationen des Spleißapparates zurückzuführen ist. Die von uns identifizierten Sequenzmotive (z.B. 5'-TGCCCAGTAT-3') beinhalten potenzielle Donor- und Akzeptorstellen. In einer Reihe von Genen (z.B. BRCA1, RB1, NF1) befinden sich in den Introns, aber auch in den Exons, eine Vielzahl von potenziellen Spleißstellen und Bindungsstellen für das heterogene nukleäre Ribonukleoprotein A1 (hnRNP A1), einer Komponente des Spleißapparates¹⁰. Es konnte gezeigt werden, dass schon geringe Änderungen der Affinität von hnRNP A1 zu den regulären Bindungsstellen zu einem fehlerhaften Ausschneiden von Exons führen können¹⁰. So kann beispielsweise durch Mutationen die Sekundärstruktur der mRNA beeinflusst werden, wodurch dann das hnRNP A1-Protein an alternative Sequenzen bindet. Die Folge könnte das alternative und/oder aberrante Spleißen der unreifen mRNA sein. Ein weiterer Aspekt ist der Einfluss von DNA-Schäden auf das Spleißverhalten von MDM2 (und MDMX). Chandler *et al.* zeigten, dass es nach Behandlung von Zellen mit ionisierender Strahlung nicht zu einer Änderung der Expression von MDM2-Spleißvarianten kommt. Werden die Zellen jedoch mit Cisplatin behandelt, so geht der Anteil des FL-MDM2 zurück, und es werden verstärkt verkürzte Transkripte der MDM2-mRNA expremiert¹⁸. Interessant sind in diesem Zusammenhang Arbeiten von Filipov *et al.*, wonach das Spleißverhalten der CD44-mRNA durch den ATM/ATR-Pathway reguliert wird³⁵. Dies ließ sich auf die veränderte Expression von wichtigen Spleißfaktoren zurückführen. Aktuelle Arbeiten unserer Arbeitsgruppe beschäftigen sich u.a. mit der Fragestellung, wie das Spleißverhalten der MDM2/-X-mRNA in Ovarialkarzinomzelllinien reguliert wird und ob es einen Zusammenhang zwischen der Expression bestimmter Varianten (z.B. MDMX-S) und der Chemoresistenz gibt. In Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe stellte sich heraus, dass es in den untersuchten Zelllinien (OAW-42, ES-2) unabhängig vom p53-Status zu einer Ände-

zung des Verhältnisses FL-MDMX/MDMX-S zugunsten von MDMX-S kommt (Wolf *et al.*, unveröffentlichte Daten). Da die MDMX-S-Isoform die p53-Aktivität wesentlich stärker inhibieren kann als MDMX selbst¹¹⁰, könnte die in p53-wt-Zelllinien zu einem schlechteren Ansprechen der Zellen auf die Chemotherapie führen und somit zur Resistenz beitragen.

4.3 MDM2 als Ziel einer Gentherapie für WTS

In dieser Arbeit wurde erstmalig die Wirkung von MDM2-AS-ODNs auf WTS *in vivo* untersucht. Die Grundlage unseres Modells sind abdominale und intraperitoneale WTS, die durch konventionelle Therapieformen (chirurgische Eingriffe, Strahlen- und Chemotherapie) schwierig zu behandeln sind. Die peritoneale Tumoraussaat hat einen limitierenden Einfluss auf die Prognose. Daher ist es notwendig, alternative Therapiekonzepte, wie z.B. Antisense-Therapien gegen das MDM2-Onkogen, für diese WTS zu entwickeln. Unsere Ergebnisse



zeigen die prinzipielle Eignung von MDM2 als Ziel einer molekular-basierten Therapie mittels Hemmung durch AS-ODNs auch in Tumoren mit mutiertem p53-Gen. Alle bisher in der Literatur beschriebenen *in vivo* Studien mit MDM2-AS-ODNs wurden mit Xenotransplantaten von Zelllinien durchgeführt, die ein wt-p53-Gen trugen. In unserer Arbeit ist erstmalig eine Zelllinie (RD) mit einem mutierten p53-Genstatus für die Untersuchungen verwendet worden.

Erste Studien zur Behandlung von WTS mittels MDM2-AS-ODNs wurden von Meye *et al.* an der MDM2-überexprimierenden Zelllinie US8-93 durchgeführt⁸⁶. Es konnte gezeigt werden, dass die als Lipidkomplexe applizierten MDM2-AS-ODNs sowohl die MDM2-

Proteinexpression reduzieren als auch das klonogene Überleben der WTS-Zelllinie stark hemmen. In unseren Untersuchungen konnten wir in den Tieren, die mit verschiedenen Dosen an MDM2-AS-ONDs behandelt wurden, eine signifikante Reduzierung der Tumormasse und erstmals auch der Tumorzahl nachweisen. Dies stimmt mit Ergebnissen anderer Autoren überein, die ebenfalls über eine Verringerung der Tumorgroße, ein verzögertes Tumorstadium und eine längere Lebensdauer von Mäusen berichten, die mit MDM2-AS-ONDs behandelt wurden^{138,141}.

Der Mechanismus für die antitumorale Wirkung der MDM2-AS-ODNs in Folge der Reduzierung der MDM2-Proteinmenge konnte ist in Abb. 4-1 dargestellt. In vielen Tumoren mit einem wt-p53-Gen führt die Verringerung von MDM2 zu einer Erhöhung der p53-Proteinmenge und anschließend zu Wachstumsarrest und Apoptose¹⁹. Die Annahme, dass MDM2-AS-ODNs nur in Zellen mit wt-p53 wirksam sind, konnte bislang nur für B-Zell-Lymphom-Zelllinien¹⁶, jedoch nicht für andere Zellen¹⁵⁹, bestätigt werden. Studien von Chen *et al.*¹⁹ an drei Zelllinien mit wt-p53-Genstatus zeigen wiederum, dass es nach Behandlung MDM2-AS-ODNs neben einer deutlichen, dosisabhängigen Reduzierung der MDM2-Proteinmenge zusätzlich zu einer 6-fachen Steigerung der p21-Expression kommt (jedoch nicht in einer als Kontrolle mitgeführten p53-defizienten Zelllinie). Dies deutet eindeutig auf eine durch die MDM2-AS-Behandlung hervorgerufene p53-Transaktivierung hin. Auf Grund der Reduzierung der MDM2-Proteinmenge steigt der Anteil an freiem (und somit funktionellem) p53-Protein, da dieses nicht mehr durch MDM2 komplexiert und zur Ubiquitylierung markiert werden kann. Chen *et al.*¹⁹ beobachteten in den behandelten Zellen auch eine Steigerung der Apoptoserate auf bis zu 80 % nach 24 h, die durch die Aktivierung von p53 erklärt werden kann.

Es ist jedoch auch denkbar, dass die Behandlung von Tumorzellen mit MDM2-AS-ONDs nicht nur den p53-MDM2-Feedback-Loop stört (Abb. 4-1), sondern auch die p53-unabhängigen, wachstumsfördernden Aktivitäten von MDM2 *in vivo* inhibiert. Aus der Literatur ist bekannt, dass MDM2 auch unabhängig vom p53-Genstatus onkogene Eigenschaften besitzt^{23,27,59,79,80,114,124,143,150,154}. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass durch die Behandlung von WTS-Xenotransplantattumoren mit MDM2-AS-ONDs auch ohne funktionelles p53 die Tumormasse und die Anzahl der gebildeten Tumoren reduziert werden kann.

Überraschend war der Befund, dass es zu einer signifikanten Reduzierung der p53-Proteinexpression in den mit AS-ONDs behandelten Tieren kam. Es ist bekannt, dass MDM2 an wt- und mt-p53 binden kann³⁸, d.h. dass eine Reduzierung der MDM2-Proteinmenge in Folge einer Behandlung mit MDM2-AS-ONDs zu einer Stabilisierung von p53 führen könnte. Eine dieser beschriebenen Zelllinien trägt die gleiche Mutation im p53-Gen wie die Zelllinie RD, die in unseren *in vivo* Therapiestudien verwendet worden ist. In den von uns beschrie-

benen Experimenten wurde erstmalig eine Reduzierung der mt-p53-Proteinmenge auf Grund einer verringerten MDM2-Expression nachgewiesen¹⁴⁹. Dies deutet darauf hin, dass mt-p53 durch MDM2 stabilisiert wird; d.h. MDM2 kann zwar an p53 binden, es jedoch nicht für den proteasomalen Abbau markieren. Für die Therapie von Tumorpatienten wäre die Reduzierung der mt-p53-Proteinmenge von großer Bedeutung, da etwa 50 % der Tumoren Mutationen im p53-Gen tragen⁵², und Mutationen zu einer Stabilisierung von p53 beitragen können¹⁵⁷. Unsere Ergebnisse zeigen in einem WTS-Xenotransplantatmodell, dass eine Reduzierung der Tumormasse und der Tumorzahl durch MDM2-AS-ODNs unabhängig vom p53-Genstatus möglich ist. Dadurch wird die Hypothese unterstützt, dass eine MDM2-AS-ODN-Therapie in allen Tumoren, die durch eine MDM2-Überexpression charakterisiert sind, erfolgreich ist¹⁵⁹.

4.4 Zusammenfassung und Ausblick

Den Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bildete die Aufklärung der Mechanismen, die zur Fehlregulation des p53-MDM2-MDMX-Pathways in zwei völlig unterschiedlichen Tumorarten, den Weichteilsarkomen und den Ovarialkarzinomen, führen. Dies umfasste die Analyse von Alterationen wie z.B. Mutationen und Polymorphismen, Genamplifikationen, Überexpression der mRNA bzw. des Proteins sowie die Expression von Spleißvarianten und die Frage, ob diese Veränderungen können mit dem Krankheitsverlauf bzw. dem individuellen Todesrisiko betroffener Patienten korrelieren.

In 28 % der von uns untersuchten Weichteilsarkomproben konnte ein amplifiziertes MDM2-Gen nachgewiesen werden. Dies war mit einer erhöhten Expression der MDM2-mRNA assoziiert. Interessanterweise korrelierten sowohl die MDM2-Genamplifikation als auch eine leicht erhöhte MDM2-mRNA-Expression mit einer guten Prognose bei Weichteilsarkompatienten. Patienten ohne MDM2-Genamplifikation wiesen ein 4,5-fach erhöhtes Risiko auf, am Tumor zu versterben. Demgegenüber war jedoch für Patienten, deren Tumor durch eine MDMX-Genamplifikation charakterisiert war, das relative Risiko um das 2,8-Fache erhöht. Das MDMX-Gen war in 27 % der Weichteilsarkome amplifiziert. Neben dem MDMX-Genamplifikationsstatus wurde auch die Expression der „full-length“-MDMX-mRNA und der MDMX-S-Spleißvariante untersucht. Es stellte sich heraus, dass das Verhältnis „full-length“ MDMX/MDMX-S einen unabhängigen Prognosefaktor für Weichteilsarkome darstellt. Patienten, deren Tumor eine Überexpression der MDMX-S-Spleißvariante aufwies, verstarben durchschnittlich 13 Monate nach Diagnosestellung, während Patienten, bei denen das Verhältnis zu Gunsten der FL-MDMX-mRNA verschoben war, 53 Monate überlebten.

Bei der Sequenzanalyse des p53-sensitiven MDM2-P2-Promotors, die in Zusammenarbeit mit A.J. Levine und G.L. Bond (Princeton, USA) durchgeführt wurde, konnte ein Einzelnukleotidpolymorphismus (T>G; SNP309) identifiziert werden. Das G-Allel war in Weichteilsarkompatienten mit einem 12 Jahre früheren Tumoraufreten assoziiert. Weitere Untersuchungen zeigten, dass das G-Allel die Tumorentwicklung vor allem in premenopausalen Frauen, nicht jedoch bei Männern, beschleunigen konnte. Bei den Ovarialkarzinomen konnte die Assoziation des G-Allels mit einem früheren Alter der Tumorentstehung nur bei einer Überexpression des Östrogen-Rezeptors beobachtet werden. Diese Daten stützen die Hypothese, dass Geschlechtshormone (hier: Östrogen), die Entwicklung von Tumoren bei Individuen mit einem G/G-Genotyp beschleunigen können. Bei einem SNP im 3'-UTR des MDMX-Gens zeigte sich ebenfalls eine Abhängigkeit von Östrogen-Rezeptor. Ausgehend von diesen Daten sollten sich prospektive Studien anschließen, in denen die hier beschriebenen Prognosefaktoren evaluiert werden. Dazu zählen der Status des SNP309, die Expression der MDMX-S-Spleißvariante sowie der Transkripte des MDM2-P1- bzw. -P2-Promotors.

Bei den von uns untersuchten Ovarialkarzinomen konnten wir ebenfalls zahlreiche Veränderungen des p53-MDM2-MDMX-Pathways detektieren, die einen Einfluss auf das rezidiv-freie und Gesamtüberleben der Patientinnen haben. Interessant war der Befund, dass Patientinnen, deren Tumor das Wildtyp-p53-Protein überexprimierte, die kürzeste Überlebenszeit aufwiesen. Dies zeigt deutlich, dass die isolierte Betrachtung des p53-Gen- bzw. Proteinexpressionsstatus nicht aussagekräftig ist. Somit lässt sich auch erklären, warum speziell beim Ovarialkarzinom sehr widersprüchliche Daten zur prognostischen Bedeutung des p53-Genstatus in der Literatur zu finden sind. Es sollten daher in Zukunft—wie in dieser Arbeit geschehen—der kombinierte p53-Gen- und Proteinexpressionsstatus ermittelt werden, um die Gruppe der Patientinnen zu identifizieren, die durch eine Überexpression von wt-p53 charakterisiert sind. Des Weiteren zeigen unsere Arbeiten die Bedeutung der Östrogenrezeptorexpression beim Ovarialkarzinom. Obwohl der ER-Status selbst keine prognostische Aussagekraft besitzt, jedoch war das G-Allel des SNP309 bei Patientinnen mit einem ER-positiven Tumor mit einem signifikant früheren Auftreten des Ovarialkarzinoms verbunden. Wie bereits für die WTS beschrieben, müssen sich auch beim Ovarialkarzinom prospektive Studien anschließen, um die Aussagekraft der genannten Prognosefaktoren zu untersuchen. Dabei sollten folgende Faktoren bestimmt werden: Genotyp des SNP309 im MDM2-Gens und des SNP34091 im MDMX-Gen, der p53-Gen- und Expressionstatus sowie der ER-Status der Ovarialkarzinome.

In weiterführenden Arbeiten werden wir die Regulation des Spleißmusters der MDM2/MDMX-mRNA nach Behandlung mit Carboplatin und einen möglichen Zusammenhang der Expression bestimmter Spleißvarianten mit der Chemoresistenz beim Ovarialkarzi-

nom untersuchen. Des Weiteren konnten wir in ersten Versuchen zeigen, dass das C-Allel des SNP34091 im MDMX-Gen eine Bindungsstelle für die microRNA hsa-miR191 bildet und dass die Überexpression von miR191 in Zellen mit einem C/C-Genotyp zu einer Verminderung der MDMX-Proteinmenge führt. Ziel der Versuche ist es daher nun zu untersuchen, welche Bedeutung microRNAs bei der Regulation des p53-MDM2-MDMX-Pathways spielen. Genaue Kenntnisse über die Alterationen und die Regulation dieses zentralen Pathways können in Zukunft dazu beitragen, die Chemoresistenz von Tumoren sowie den Verlauf von Tumorerkrankungen besser vorherzusagen und somit die Resistenz überwinden zu können.

5. Literaturverzeichnis

- ¹ Y. Barak, et al., "Regulation of mdm2 expression by p53: alternative promoters produce transcripts with nonidentical translation potential," *Genes Dev.* **8**(15), 1739 (1994).
- ² F. Bartel, et al., "MDM2 and its splice variant messenger RNAs: expression in tumors and down-regulation using antisense oligonucleotides," *Mol Cancer Res* **2**(1), 29 (2004).
- ³ F. Bartel, et al., "Both germ line and somatic genetics of the p53 pathway affect ovarian cancer incidence and survival," *Clin. Cancer Res.* **14**(1), 89 (2008).
- ⁴ F. Bartel, et al., "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**(3), 168 (2001).
- ⁵ F. Bartel, et al., "Expression of alternatively and aberrantly spliced transcripts of the MDM2 mRNA is not tumor-specific," *Int. J. Oncol.* **24**(1), 143 (2003).
- ⁶ F. Bartel, et al., "[HDMX amplification and high levels of HDMX-S splice variant are correlated with a poor prognosis in soft tissue sarcomas]," *Verh. Dtsch. Ges. Pathol* **88**, 199 (2004).
- ⁷ F. Bartel, et al., "Significance of HDMX-S (or MDM4) mRNA splice variant overexpression and HDMX gene amplification on primary soft tissue sarcoma prognosis," *Int. J Cancer* **117**(3), 469 (2005).
- ⁸ F. Bartel, H. Taubert, and L. C. Harris, "Alternative and aberrant splicing of MDM2 mRNA in human cancer," *Cancer Cell* **2**(1), 9 (2002).
- ⁹ O. H. Beahrs, D. E. Henson, and R. V. P. Hutter, manual for staging of cancer, 3rd ed. (Lippincott Company, Philadelphia, 2001).
- ¹⁰ M. Blanchette and B. Chabot, "Modulation of exon skipping by high-affinity hnRNP A1-binding sites and by intron elements that repress splice site utilization," *EMBO J* **18**(7), 1939 (1999).
- ¹¹ G. Bond, et al., "A Single Nucleotide Polymorphism in the Mdm2 Promoter Attenuates the P53 Tumor Suppressor Pathway and Accelerates Tumor Formation in Humans," in 119 ed. 2004, pp.591-602.
- ¹² G. L. Bond, et al., "MDM2 SNP309 accelerates tumor formation in a gender-specific and hormone-dependent manner," *Cancer Res.* **66**(10), 5104 (2006).
- ¹³ C. Y. Brown, et al., "Role of two upstream open reading frames in the translational control of oncogene mdm2," *Oncogene* **18**(41), 5631 (1999).
- ¹⁴ L. Cahilly-Snyder, et al., "Molecular analysis and chromosomal mapping of amplified genes isolated from a transformed mouse 3T3 cell line," *Somat. Cell Mol. Genet.* **13**(3), 235 (1987).
- ¹⁵ I. G. Campbell, D. M. Eccles, and D. Y. Choong, "No association of the MDM2 SNP309 polymorphism with risk of breast or ovarian cancer," *Cancer Lett.* **240**(2), 195 (2006).

- ¹⁶C. Capoulade, et al., "Apoptosis of tumoral and nontumoral lymphoid cells is induced by both mdm2 and p53 antisense oligodeoxynucleotides," *Blood* **97**(4), 1043 (2001).
- ¹⁷G. Casey, et al., "DNA sequence analysis of exons 2 through 11 and immunohistochemical staining are required to detect all known p53 alterations in human malignancies," *Oncogene* **13**(9), 1971 (1996).
- ¹⁸D. S. Chandler, et al., "Genotoxic Stress Induces Coordinately Regulated Alternative Splicing of the p53 Modulators MDM2 and MDM4," *Cancer Res* **66**(19), 9502 (2006).
- ¹⁹L. Chen, et al., "Synergistic activation of p53 by inhibition of MDM2 expression and DNA damage," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**(1), 195 (1998).
- ²⁰T. H. Cheng and S. N. Cohen, "Human MDM2 isoforms translated differentially on constitutive versus p53-regulated transcripts have distinct functions in the p53/MDM2 and TSG101/MDM2 feedback control loops," *Mol. Cell Biol.* **27**(1), 111 (2007).
- ²¹M. P. Coleman, et al., "EUROCORE-3 summary: cancer survival in Europe at the end of the 20th century," *Ann. Oncol.* **14 Suppl 5**, v128-v149 (2003).
- ²²N. Colombo, et al., "Ovarian cancer," *Crit Rev. Oncol. Hematol.* **60**(2), 159 (2006).
- ²³C. Cordon-Cardo, et al., "Molecular abnormalities of mdm2 and p53 genes in adult soft tissue sarcomas," *Cancer Res.* **54**(3), 794 (1994).
- ²⁴D. Danovi, et al., "Amplification of Mdmx (or Mdm4) directly contributes to tumor formation by inhibiting p53 tumor suppressor activity," *Mol. Cell Biol.* **24**(13), 5835 (2004).
- ²⁵P. de Graaf, et al., "Hdmx protein stability is regulated by the ubiquitin ligase activity of Mdm2," **278**(40), 38315 (2003).
- ²⁶E. Dogan, et al., "p53 and mdm2 as prognostic indicators in patients with epithelial ovarian cancer: A multivariate analysis," *Gynecol. Oncol.* **97**(1), 46 (2005).
- ²⁷M. C. Dubs-Poterszman, B. Tocque, and B. Wasyluk, "MDM2 transformation in the absence of p53 and abrogation of the p107 G1 cell-cycle arrest," *Oncogene* **11**(11), 2445 (1995).
- ²⁸J. D. Emery, et al., "Plasmacytoma of the ovary: a case report and literature review," *Gynecol. Oncol.* **73**(1), 151 (1999).
- ²⁹FM Enzinger and SW Weiss, *soft tissue tumors*, 3rd ed. (Mosby, St. Louis, MO, 1995).
- ³⁰S. C. Evans, et al., "An alternatively spliced HDM2 product increases p53 activity by inhibiting HDM2," *Oncogene* **20**(30), 4041 (2001).
- ³¹A. Evdokiou, et al., "Expression of alternatively-spliced MDM2 transcripts in giant cell tumours of bone," *Int. J. Oncol.* **19**(3), 625 (2001).
- ³²S. S. Fakharzadeh, S. P. Trusko, and D. L. George, "Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumor cell line," *EMBO J.* **10**(6), 1565 (1991).
- ³³S. Fallows, et al., "P53 mutation does not affect prognosis in ovarian epithelial malignancies," *J Pathol* **194**(1), 68 (2001).

- ³⁴A. Feki and I. Irminger-Finger, "Mutational spectrum of p53 mutations in primary breast and ovarian tumors," *Crit Rev. Oncol. Hematol.* **52**(2), 103 (2004).
- ³⁵V. Filippov, M. Filippova, and P. J. Duerksen-Hughes, "The early response to DNA damage can lead to activation of alternative splicing activity resulting in CD44 splice pattern changes," *Cancer Res* **67**(16), 7621 (2007).
- ³⁶CDM Fletcher, RL Kempson, and S. W. Weiss, "Recommendations for the reporting of soft tissue sarcomas.," *Virchows Arch.* **434**, 187 (1999).
- ³⁷V. A. Florenes, et al., "MDM2 gene amplification and transcript levels in human sarcomas: relationship to TP53 gene status," *J. Natl. Cancer Inst.* **86**(17), 1297 (1994).
- ³⁸D. A. Freedman, L. Wu, and A. J. Levine, "Functions of the MDM2 oncoprotein," *Cell Mol Life Sci.* **55**(1), 96 (1999).
- ³⁹F. P. Gall, J. Goehl, and W. Hohenberger, in *Weichteilsarkome*, (Zuckschwerdt, München, 1990).
- ⁴⁰H. H. Gallion, et al., "Chromosome abnormalities in human epithelial ovarian malignancies," *Gynecol. Oncol.* **38**(3), 473 (1990).
- ⁴¹J. P. Geisler, et al., "Quantification of p53 in epithelial ovarian cancer," *Gynecol. Oncol.* **66**(3), 435 (1997).
- ⁴²C. M. Greiser, E. M. Greiser, and M. Doren, "Menopausal hormone therapy and risk of ovarian cancer: systematic review and meta-analysis," *Hum. Reprod. Update.* **13**(5), 453 (2007).
- ⁴³I. Gryshchenko, et al., "MDM2 SNP309 is associated with poor outcome in B-cell chronic lymphocytic leukemia," *J. Clin. Oncol.* **26**(14), 2252 (2008).
- ⁴⁴JM Gudas, et al., "Differential expression of multiple MDM2 messenger RNAs and proteins in normal and tumorigenic breast epithelial cells.," *Clin. Cancer Res* **1**, 71 (1995).
- ⁴⁵D. S. Haines, et al., "Physical and functional interaction between wild-type p53 and mdm2 proteins," *Mol. Cell Biol.* **14**(2), 1171 (1994).
- ⁴⁶J. Hanke, et al., "Alternative splicing of human genes: more the rule than the exception?," *Trends Genet.* **15**(10), 389 (1999).
- ⁴⁷L. C. Hartmann, et al., "Prognostic significance of p53 immunostaining in epithelial ovarian cancer," *J Clin. Oncol.* **12**(1), 64 (1994).
- ⁴⁸Y. Haupt, et al., "Mdm2 promotes the rapid degradation of p53," *Nature* **387**(6630), 296 (1997).
- ⁴⁹S. Hauptmann, et al., "Genetic alterations in epithelial ovarian tumors analyzed by comparative genomic hybridization," *Hum. Pathol.* **33**(6), 632 (2002).
- ⁵⁰L. Havrilesky, et al., "Prognostic significance of p53 mutation and p53 overexpression in advanced epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group Study," *J Clin. Oncol.* **21**(20), 3814 (2003).

- ⁵¹R. Henriksen, et al., "p53 expression in epithelial ovarian neoplasms: relationship to clinical and pathological parameters, Ki-67 expression and flow cytometry," *Gynecol. Oncol.* **53**(3), 301 (1994).
- ⁵²M. Hollstein, et al., "p53 mutations in human cancers," *Science* **253**(5015), 49 (1991).
- ⁵³H. J. Holzhausen and D. Stiller, "Cellular differentiation in storiform-pleomorphic malignant fibrous histiocytomas. An electron microscopic study.," *Zbl. Allg. Path. Pathol. Anat.* **134**, 363 (1988).
- ⁵⁴W. Hu, et al., "A Single Nucleotide Polymorphism in the MDM2 Gene Disrupts the Oscillation of P53 and Mdm2 Levels in Cells," in 67 ed.2006), pp.2757-2765.
- ⁵⁵K. Ito, "Hormone replacement therapy and cancers: the biological roles of estrogen and progestin in tumorigenesis are different between the endometrium and breast," *Tohoku J. Exp. Med.* **212**(1), 1 (2007).
- ⁵⁶T. Iwakuma and G. Lozano, "MDM2, an introduction," *Mol. Cancer Res.* **1**(14), 993 (2003).
- ⁵⁷M. W. Jackson and S. J. Berberich, "MdmX protects p53 from Mdm2-mediated degradation," *Mol. Cell Biol.* **20**(3), 1001 (2000).
- ⁵⁸O. M. Jensen, et al., "Histopathological grading of soft tissue tumours. Prognostic significance in a prospective study of 278 consecutive cases," *J. Pathol.* **163**(1), 19 (1991).
- ⁵⁹S. N. Jones, et al., "The tumorigenic potential and cell growth characteristics of p53-deficient cells are equivalent in the presence or absence of Mdm2," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**(24), 14106 (1996).
- ⁶⁰D. Katenkamp and H. Kosmehl, "Heterogeneity in malignant soft tissue tumors.," *Curr. Top. Path* **89**, 125 (1995).
- ⁶¹D. Katenkamp and D. Stiller, *Weichgewebstumoren*, 1. Aufl. ed. (J.A. Barth, Leipzig, 1990).
- ⁶²P. J. Klemi, et al., "p53 protein detected by immunohistochemistry as a prognostic factor in patients with epithelial ovarian carcinoma," *Cancer* **76**(7), 1201 (1995).
- ⁶³J. L. Ko, et al., "MDM2 mRNA expression is a favorable prognostic factor in non-small-cell lung cancer," *Int. J Cancer* **89**(3), 265 (2000).
- ⁶⁴M. Kobel, et al., "Ezrin promotes ovarian carcinoma cell invasion and its retained expression predicts poor prognosis in ovarian carcinoma," *Int. J Gynecol. Pathol* **25**(2), 121 (2006).
- ⁶⁵M. F. Kohler, et al., "Mutation and overexpression of p53 in early-stage epithelial ovarian cancer," *Obstet. Gynecol.* **81**(5 (Pt 1)), 643 (1993).
- ⁶⁶M. F. Kohler, et al., "Spectrum of mutation and frequency of allelic deletion of the p53 gene in ovarian cancer," *J. Natl. Cancer Inst.* **85**(18), 1513 (1993).
- ⁶⁷S. Kondo, et al., "MDM2 protein confers the resistance of a human glioblastoma cell line to cisplatin-induced apoptosis," *Oncogene* **10**(10), 2001 (1995).

- ⁶⁸A. Kraus, et al., "Expression of alternatively spliced mdm2 transcripts correlates with stabilized wild-type p53 protein in human glioblastoma cells," *Int. J Cancer* **80**(6), 930 (1999).
- ⁶⁹M. H. Kubbutat, S. N. Jones, and K. H. Vousden, "Regulation of p53 stability by Mdm2," *Nature* **387**(6630), 299 (1997).
- ⁷⁰J. Kupryjanczyk, et al., "p53 gene mutations and protein accumulation in human ovarian cancer," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**(11), 4961 (1993).
- ⁷¹M. Ladanyi, et al., "MDM2 gene amplification in metastatic osteosarcoma," *Cancer Res.* **53**(1), 16 (1993).
- ⁷²J. E. Landers, S. L. Cassel, and D. L. George, "Translational enhancement of mdm2 oncogene expression in human tumor cells containing a stabilized wild-type p53 protein," *Cancer Res* **57**(16), 3562 (1997).
- ⁷³J. E. Landers, et al., "Enhanced translation: a novel mechanism of mdm2 oncogene overexpression identified in human tumor cells," *Oncogene* **9**(9), 2745 (1994).
- ⁷⁴F. S. Leach, et al., "p53 Mutation and MDM2 amplification in human soft tissue sarcomas," *Cancer Res* **53**(10 Suppl), 2231 (1993).
- ⁷⁵R. Lev Bar-Or, et al., "Generation of oscillations by the p53-Mdm2 feedback loop: a theoretical and experimental study," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**(21), 11250 (2000).
- ⁷⁶M. A. Levesque, et al., "Mutant p53 protein overexpression is associated with poor outcome in patients with well or moderately differentiated ovarian carcinoma," *Cancer* **75**(6), 1327 (1995).
- ⁷⁷M. Ljungman, "Dial 9-1-1 for p53: mechanisms of p53 activation by cellular stress," *Neoplasia*. **2**(3), 208 (2000).
- ⁷⁸J. Lukas, et al., "Alternative and aberrant messenger RNA splicing of the mdm2 oncogene in invasive breast cancer," *Cancer Res* **61**(7), 3212 (2001).
- ⁷⁹K. Lundgren, et al., "Targeted expression of MDM2 uncouples S phase from mitosis and inhibits mammary gland development independent of p53," *Genes Dev.* **11**(6), 714 (1997).
- ⁸⁰K. Martin, et al., "Stimulation of E2F1/DP1 transcriptional activity by MDM2 oncoprotein," *Nature* **375**(6533), 691 (1995).
- ⁸¹R. Matsumoto, et al., "Short alternative splice transcripts of the mdm2 oncogene correlate to malignancy in human astrocytic neoplasms," *Cancer Res* **58**(4), 609 (1998).
- ⁸²R. Mazars, et al., "p53 mutations in ovarian cancer: a late event?," *Oncogene* **6**(9), 1685 (1991).
- ⁸³S. M. Mendrysa, et al., "Tumor suppression and normal aging in mice with constitutively high p53 activity," *Genes Dev.* **20**(1), 16 (2006).
- ⁸⁴C. Menin, et al., "Association between MDM2-SNP309 and age at colorectal cancer diagnosis according to p53 mutation status," *J. Natl. Cancer Inst.* **98**(4), 285 (2006).

- ⁸⁵A. Meye, Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 1999.
- ⁸⁶A. Meye, et al., "Colony formation of soft tissue sarcoma cells is inhibited by lipid-mediated antisense oligodeoxynucleotides targeting the human mdm2 oncogene," *Cancer Lett.* **149**(1-2), 181 (2000).
- ⁸⁷D. Michael and M. Oren, "The p53 and Mdm2 families in cancer," *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**(1), 53 (2002).
- ⁸⁸R. Millon, et al., "Loss of MDM2 expression in human head and neck squamous cell carcinomas and clinical significance," *Oral Oncol.* **37**(8), 620 (2001).
- ⁸⁹J. Momand, et al., "The MDM2 gene amplification database," **26**(15), 3453 (1998).
- ⁹⁰J. Momand, et al., "The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation," *Cell* **69**(7), 1237 (1992).
- ⁹¹T. Nakayama, et al., "MDM2 gene amplification in bone and soft-tissue tumors: association with tumor progression in differentiated adipose-tissue tumors," *Int. J Cancer* **64**(5), 342 (1995).
- ⁹²M. Nilbert, et al., "MDM2 gene amplification correlates with ring chromosome in soft tissue tumors," *Genes Chromosomes. Cancer* **9**(4), 261 (1994).
- ⁹³K. Niwa, et al., "Alteration of p53 gene in ovarian carcinoma: clinicopathological correlation and prognostic significance," *Br. J Cancer* **70**(6), 1191 (1994).
- ⁹⁴R. M. Oca Luna, et al., "The organization and expression of the mdm2 gene," *Genomics* **33**(3), 352 (1996).
- ⁹⁵N. Ohmiya, et al., "MDM2 promoter polymorphism is associated with both an increased susceptibility to gastric carcinoma and poor prognosis," *J. Clin. Oncol.* **24**(27), 4434 (2006).
- ⁹⁶J. D. Oliner, et al., "Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas," *Nature* **358**(6381), 80 (1992).
- ⁹⁷J. D. Oliner, et al., "Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53," *Nature* **362**(6423), 857 (1993).
- ⁹⁸D. C. Olson, et al., "Identification and characterization of multiple mdm-2 proteins and mdm-2-p53 protein complexes," *Oncogene* **8**(9), 2353 (1993).
- ⁹⁹K. Onel and C. Cordon-Cardo, "MDM2 and prognosis," *Mol Cancer Res* **2**(1), 1 (2004).
- ¹⁰⁰J. Parant, et al., "Rescue of embryonic lethality in Mdm4-null mice by loss of Trp53 suggests a nonoverlapping pathway with MDM2 to regulate p53," *Nat. Genet.* **29**(1), 92 (2001).
- ¹⁰¹H. Patterson, et al., "Abnormalities of the p53 MDM2 and DCC genes in human leiomyosarcomas," *Br. J Cancer* **69**(6), 1052 (1994).
- ¹⁰²F. Pedoutour, et al., "Complex composition and co-amplification of SAS and MDM2 in ring and giant rod marker chromosomes in well-differentiated liposarcoma," *Genes Chromosomes. Cancer* **10**(2), 85 (1994).

- ¹⁰³M. Phelps, et al., "p53-independent activation of the hdm2-P2 promoter through multiple transcription factor response elements results in elevated hdm2 expression in estrogen receptor alpha-positive breast cancer cells," *Cancer Res* **63**(10), 2616 (2003).
- ¹⁰⁴S. M. Picksley and D. P. Lane, "The p53-mdm2 autoregulatory feedback loop: a paradigm for the regulation of growth control by p53?," *Bioessays* **15**(10), 689 (1993).
- ¹⁰⁵J. Piette, H. Neel, and V. Marechal, "Mdm2: keeping p53 under control," *Oncogene* **15**(9), 1001 (1997).
- ¹⁰⁶S. Pignata and J. B. Vermorken, "Ovarian cancer in the elderly," *Crit Rev. Oncol. Hematol.* **49**(1), 77 (2004).
- ¹⁰⁷S. Pilotti, et al., "Distinct mdm2/p53 expression patterns in liposarcoma subgroups: implications for different pathogenetic mechanisms," *J. Pathol.* **181**(1), 14 (1997).
- ¹⁰⁸S. R. Pine, et al., "MDM2 SNP309 and SNP354 are not associated with lung cancer risk," *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **15**(8), 1559 (2006).
- ¹⁰⁹R. E. Pollock, et al., "The National Cancer Data Base report on soft tissue sarcoma," *Cancer* **78**(10), 2247 (1996).
- ¹¹⁰R. Rallapalli, et al., "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**(12), 8299 (1999).
- ¹¹¹R. Rallapalli, et al., "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**(3), 563 (2003).
- ¹¹²Y. F. Ramos, et al., "Aberrant expression of HDMX proteins in tumor cells correlates with wild-type p53," *Cancer Res* **61**(5), 1839 (2001).
- ¹¹³A. H. Reid, et al., "MDM2 amplification, P53 mutation, and accumulation of the P53 gene product in malignant fibrous histiocytoma," *Diagn. Mol. Pathol.* **5**(1), 65 (1996).
- ¹¹⁴G. Reifenberger, et al., "Amplification and overexpression of the MDM2 gene in a subset of human malignant gliomas without p53 mutations," *Cancer Res.* **53**(12), 2736 (1993).
- ¹¹⁵S. Reincke, et al., "Mutation analysis of the MDM4 gene in German breast cancer patients," *BMC. Cancer* **8**, 52 (2008).
- ¹¹⁶A. Reles, et al., "Correlation of p53 mutations with resistance to platinum-based chemotherapy and shortened survival in ovarian cancer," *Clin. Cancer Res.* **7**(10), 2984 (2001).
- ¹¹⁷M. J. Riemenschneider, et al., "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**(24), 6091 (1999).
- ¹¹⁸M. J. Riemenschneider, C. B. Knobbe, and G. Reifenberger, "Refined mapping of 1q32 amplicons in malignant gliomas confirms MDM4 as the main amplification target," *Int. J Cancer* **104**(6), 752 (2003).

- ¹¹⁹P. Rohlke, et al., "p53 is a persistent and predictive marker in advanced ovarian carcinomas: multivariate analysis including comparison with Ki67 immunoreactivity," *J Cancer Res. Clin. Oncol.* **123**(9), 496 (1997).
- ¹²⁰J. Schütte, "Chemotherapie der Weichteilsarkome," **1**, 119 (1995).
- ¹²¹E. Sheridan, et al., "P53 mutation in a series of epithelial ovarian cancers from the U.K., and its prognostic significance," *Eur. J Cancer* **30A**(11), 1701 (1994).
- ¹²²A. Shvarts, et al., "Isolation and identification of the human homolog of a new p53-binding protein, Mdmx," *Genomics* **43**(1), 34 (1997).
- ¹²³A. Shvarts, et al., "MDMX: a novel p53-binding protein with some functional properties of MDM2," *EMBO J* **15**(19), 5349 (1996).
- ¹²⁴I. Sigalas, et al., "Alternatively spliced mdm2 transcripts with loss of p53 binding domain sequences: transforming ability and frequent detection in human cancer," *Nat Med.* **2**(8), 912 (1996).
- ¹²⁵S. G. Silverberg, "Histopathologic grading of ovarian carcinoma: a review and proposal," *Int. J Gynecol. Pathol* **19**(1), 7 (2000).
- ¹²⁶B. V. Stadel, "Letter: The etiology and prevention of ovarian cancer," *Am. J. Obstet. Gynecol.* **123**(7), 772 (1975).
- ¹²⁷R. Stoehr, et al., "Mdm2-SNP309 polymorphism in prostate cancer: no evidence for association with increased risk or histopathological tumour characteristics," *Br. J. Cancer* **99**(1), 78 (2008).
- ¹²⁸E. Tamborini, et al., "Analysis of the molecular species generated by MDM2 gene amplification in liposarcomas," *Int. J Cancer* **92**(6), 790 (2001).
- ¹²⁹B. Tanner, et al., "mdm 2 mRNA expression is associated with survival in ovarian cancer," *Int. J Cancer* **74**(4), 438 (1997).
- ¹³⁰H Taubert, Meye A, and P Würfl, "Prognosis is correlated with p53 mutation type for soft tissue sarcoma patients.," *Cancer Res* **56**, 4134 (1996).
- ¹³¹H Taubert, A Meye, and P Würfl, "Soft tissue sarcomas and p53 mutations," **4**, 365 (1998).
- ¹³²H Taubert, et al., "Loss of Heterozygosity Occurs More Frequently in Stage I Soft Tissue Sarcomas and Is Associated to With an Amplification of Mdm2 Gene in Various Tumor Stages.," *Mod. Pathol.* **16**, 1109 (2003).
- ¹³³H. Taubert, et al., "Association of HDM2 transcript levels with age of onset and prognosis in soft tissue sarcomas," *Mol. Cancer Res.* **6**(10), 1575 (2008).
- ¹³⁴H. Taubert, et al., "A MboII 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**(1-2), 39 (2000).
- ¹³⁵H. Taubert, et al., "mdm2 mRNA level is a prognostic factor in soft tissue sarcoma," *Mol Med.* **6**(1), 50 (2000).

- ¹³⁶A. Tavani, et al., "Risk factors for epithelial ovarian cancer in women under age 45," *Eur. J. Cancer* **29A**(9), 1297 (1993).
- ¹³⁷F. Toledo and G. M. Wahl, "Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas," *Nat Rev. Cancer* **6**(12), 909 (2006).
- ¹³⁸G. Tortora, et al., "A novel MDM2 anti-sense oligonucleotide has anti-tumor activity and potentiates cytotoxic drugs acting by different mechanisms in human colon cancer," *Int. J Cancer* **88**(5), 804 (2000).
- ¹³⁹G. Viale, et al., "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**(5), 469 (1997).
- ¹⁴⁰P. G. Waber, J. Chen, and P. D. Nisen, "Infrequency of MDM2 gene amplification in pediatric solid tumors and lack of association with p53 mutations in adult squamous cell carcinomas," *Cancer Res.* **53**(24), 6028 (1993).
- ¹⁴¹H. Wang, et al., "MDM2 oncogene as a target for cancer therapy: An antisense approach," *Int. J Oncol.* **15**(4), 653 (1999).
- ¹⁴²X. Q. Wang, et al., "A possible role of p73 on the modulation of p53 level through MDM2," *Cancer Res* **61**(4), 1598 (2001).
- ¹⁴³T. Watanabe, et al., "The MDM2 oncogene overexpression in chronic lymphocytic leukemia and low-grade lymphoma of B-cell origin," *Blood* **84**(9), 3158 (1994).
- ¹⁴⁴P. L. Welch and M. C. King, "BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer," *Hum. Mol. Genet.* **10**(7), 705 (2001).
- ¹⁴⁵W. H. Wen, et al., "p53 mutations and expression in ovarian cancers: correlation with overall survival," *Int. J Gynecol. Pathol* **18**(1), 29 (1999).
- ¹⁴⁶A. S. Whittemore, et al., "Personal and environmental characteristics related to epithelial ovarian cancer. II. Exposures to talcum powder, tobacco, alcohol, and coffee," *Am. J. Epidemiol.* **128**(6), 1228 (1988).
- ¹⁴⁷S. Wilkening, et al., "No association between MDM2 SNP309 promoter polymorphism and basal cell carcinoma of the skin," *Br. J. Dermatol.* **157**(2), 375 (2007).
- ¹⁴⁸C. Wittekind and G. Wagner, *uicc - tnm-klassifikation maligner tumoren*, 5th ed. (Springer, Berlin, 1997).
- ¹⁴⁹P. Würfl, et al., "Growth reduction of a xenotransplanted human soft tissue sarcoma by MDM2 antisense therapy via implanted osmotic minipumps," *Int. J. Oncol.* **20**, 1087 (2002).
- ¹⁵⁰P. Würfl, et al., "Significance of RB and Mdm2 expression as prognostic markers for soft tissue sarcoma.," **383**, 99 (1998).
- ¹⁵¹P. Würfl, et al., "High prognostic significance of Mdm2/p53 co-overexpression in soft tissue sarcomas of the extremities," *Oncogene* **16**(9), 1183 (1998).
- ¹⁵²P. Würfl, et al., "Prognostic relevance of C-terminal Mdm2 detection is enhanced by p53 positivity in soft tissue sarcomas," **6**(5), 249 (1997).

- ¹⁵³P. Würfl and M. Schonfelder, "Therapie Der Weichteilsarkome," in Diagnostik und Therapie der Weichteilsarkome - Stand und Perspektiven, 1 Aufl. ed. edited by F. W. Rath and M. Schonfelder (Karger, Leipzig, 2001).
- ¹⁵⁴Z. X. Xiao, et al., "Interaction between the retinoblastoma protein and the oncoprotein MDM2," *Nature* **375**(6533), 694 (1995).
- ¹⁵⁵M. Yamauchi, et al., "Abnormal stability of wild-type p53 protein in a human lung carcinoma cell line," *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **330**(2), 483 (2005).
- ¹⁵⁶R. I. Yarden, et al., "MDM2 SNP309 accelerates breast and ovarian carcinogenesis in BRCA1 and BRCA2 carriers of Jewish-Ashkenazi descent," *Breast Cancer Res Treat.* (2007).
- ¹⁵⁷G. P. Zambetti and A. J. Levine, "A comparison of the biological activities of wild-type and mutant p53," *FASEB J* **7**(10), 855 (1993).
- ¹⁵⁸A Zauberman, et al., "A functional p53-responsive intronic promoter is contained within the human mdm2 gene.," **23**(14), 2584 (1995).
- ¹⁵⁹Zhang and H. Wang, "MDM2 oncogene as a novel target for human cancer therapy," *Curr. Pharm. Des* **6**(4), 393 (2000).
- ¹⁶⁰V. R. Zurawski, Jr., et al., "Elevated serum CA 125 levels prior to diagnosis of ovarian neoplasia: relevance for early detection of ovarian cancer," *Int. J. Cancer* **42**(5), 677 (1988).

Verzeichnis eigener Publikationen

Originalarbeiten – thematisch geordnet (Sonderdrucke im Anhang)

Thematik 1 – Genetische Veränderungen von MDM2, MDMX, p53 bei WTS und Ovarialkarzinomen

1. **Bartel F**, Meye A, Wurl P, Kappler M, Bache M, Lautenschlager C, Grunbaum U, Schmidt H, Taubert H. 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* 2001;95:168-75.
2. **Bartel F**, Schulz J, Blumke K, Kappler M, Bache M, Schmidt H, Taubert H. [HDMX amplification and high levels of HDMX-S splice variant are correlated with a poor prognosis in soft tissue sarcomas]. *Verh Dtsch Ges Pathol* 2004;88:199-206. (kein Sonderdruck vorhanden)
3. **Bartel F**, Schulz J, Bohnke A, Blumke K, Kappler M, Bache M, Schmidt H, Wurl 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.
4. Taubert H, Kappler M, Meye A, **Bartel F**, Schlott T, Lautenschlager C, Bache M, Schmidt H, Wurl P. A MbolI 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* 2000;456:39-44.
5. Bond GL, Hu W, Bond EE, Robins H, Lutzker SG, Arva NC, Bargonetti J, **Bartel F**, Taubert H, Wuerl P, Onel K, Yip L, Hwang SJ, Strong LC, Lozano G, Levine AJ. A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell* 2004;119:591-602.
6. Bond GL, Hirshfield KM, Kirchhoff T, Alexe G, Bond EE, Robins H, **Bartel F**, Taubert H, Wuerl P, Hait W, Toppmeyer D, Offit K, Levine AJ. MDM2 SNP309 accelerates tumor formation in a gender-specific and hormone-dependent manner. *Cancer Res* 2006;66:5104-10.
7. Taubert H*, **Bartel F***, Greither T, Bache M, Kappler M, Böhnke A, Lautenschläger C, Schmidt H, Holzhausen HJ, Hauptmann S, Würll P. Association of HDM2-transcript levels with age of onset and prognosis in soft tissue sarcomas. *Mol Can Res* 2008;6:1-7.

* Taubert H und **Bartel F** - Erstautoren

Thematik 2 - Genetische Veränderungen von MDM2 und MDMX bei Ovarialkarzinomen

8. 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.
9. **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.

Thematik 3 - Spleißvarianten von MDM2 und MDMX - Auftreten, Prognose

10. **Bartel F**, Taylor AC, Taubert H, Harris LC. Novel mdm2 splice variants identified in pediatric rhabdomyosarcoma tumors and cell lines. *Oncol Res* 2000;12:451-7. (kein Sonderdruck vorhanden)
11. **Bartel F**, Pinkert D, Fiedler W, Kappler M, Wurl P, Schmidt H, Taubert H. Expression of alternatively and aberrantly spliced transcripts of the MDM2 mRNA is not tumor-specific. *Int J Oncol* 2004;24:143-51. (kein Sonderdruck vorhanden)
12. **Bartel F**, Meye A, Wurl P, Kappler M, Bache M, Lautenschlager C, Grunbaum U, Schmidt H, Taubert H. 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* 2001;95:168-75.
13. **Bartel F**, Taubert H, Harris LC. Alternative and aberrant splicing of MDM2 mRNA in human cancer. *Cancer Cell* 2002;2:9-15. (Review)

Thematik 4 - MDM2 als ein therapeutisches Target für WTS

14. Wurl P*, **Bartel F***, Meye A, Kappler M, Bache M, Schmidt H, Schonfelder M, Taubert H. Growth reduction of a xenotransplanted human soft tissue sarcoma by MDM2 antisense therapy via implanted osmotic minipumps. *Int J Oncol* 2002;20:1087-93.
* Wurl P und **Bartel F** - Erstautoren
15. **Bartel F**, Harris LC, Wurl P, Taubert H. MDM2 and its splice variant messenger RNAs: expression in tumors and down-regulation using antisense oligonucleotides. *Mol Cancer Res* 2004;2:29-35. (Review)

Weitere Originalpublikationen (Sonderdrucke nicht im Anhang)

16. Bache M, Oehlmann S, Meye A, **Bartel F**, Kappler M, Wurl P, Schmidt H, Rath FW, Dunst J, Taubert H. Radiosensitization in sarcoma cell lines with a p53 missense mutation correlates with prevention of irradiation G2/M arrest but not with induction of apoptosis. *Oncol Rep* 2001;8:1007-11.
17. Bache M, Pigorsch S, Dunst J, Wurl P, Meye A, **Bartel F**, Schmidt H, Rath FW, Taubert H. Loss of G2/M arrest correlates with radiosensitization in two human sarcoma cell lines with mutant p53. *Int J Cancer* 2001;96:110-7.
18. Bache M, Dunst J, Matschiner F, Matschiner S, Kappler M, **Bartel F**, Schmidt H, Berghaus A, Taubert H. Radiosensitization of a human soft tissue sarcoma cell line US8-93 (mt-p53) with the oxidizer sodium peroxodisulfate. *Oncol Rep* 2004;12:889-93.
19. Blumke K, Bilkenroth U, Schmidt U, Melchior A, Fussel S, **Bartel F**, Heynemann H, Fornara P, Taubert H, Wirth MP, Meye A. Detection of circulating tumor cells from renal carcinoma patients: experiences of a two-center study. *Oncol Rep* 2005;14:895-9.
20. Grunbaum U, Meye A, Bache M, **Bartel F**, Wurl P, Schmidt H, Dunst J, Taubert H. Transfection with mdm2-antisense or wtp53 results in radiosensitization and an increased apoptosis of a soft tissue sarcoma cell line. *Anticancer Res* 2001;21:2065-71.
21. Kappler M, Kohler T, Kampf C, Diestelkotter P, Wurl P, Schmitz M, **Bartel F**, Lautenschlager C, Rieber EP, Schmidt H, Bache M, Taubert H, Meye A. Increased survivin

- transcript levels: an independent negative predictor of survival in soft tissue sarcoma patients. *Int J Cancer* 2001;95:360-3.
22. Kappler M, Kotsch M, **Bartel** F, Fussel S, Lautenschlager C, Schmidt U, Wurl P, Bache M, Schmidt H, Taubert H, Meye A. Elevated expression level of survivin protein in soft-tissue sarcomas is a strong independent predictor of survival. *Clin Cancer Res* 2003;9:1098-104.
 23. Kappler M, Bache M, **Bartel** F, Kotsch M, Panian M, Wurl P, Blumke K, Schmidt H, Meye A, Taubert H. Knockdown of survivin expression by small interfering RNA reduces the clonogenic survival of human sarcoma cell lines independently of p53. *Cancer Gene Ther* 2004;11:186-93.
 24. Kappler M, Taubert H, **Bartel** F, Blumke K, Panian M, Schmidt H, Dunst J, Bache M. Radiosensitization, after a combined treatment of survivin siRNA and irradiation, is correlated with the activation of caspases 3 and 7 in a wt-p53 sarcoma cell line, but not in a mt-p53 sarcoma cell line. *Oncol Rep* 2005;13:167-72.
 25. Kappler M, Rot S, Taubert H, Greither T, **Bartel** F, Dellas K, Hansgen G, Trott KR, Bache M. The effects of knockdown of wild-type survivin, survivin-2B or survivin-Delta3 on the radiosensitization in a soft tissue sarcoma cells in vitro under different oxygen conditions. *Cancer Gene Ther* 2007.
 26. Kern A, Taubert H, Scheele J, Rudroff C, Mothes H, Kappler M, **Bartel** F, Richter KK. Association of p53 mutations, microvessel density and neoangiogenesis in pairs of colorectal cancers and corresponding liver metastases. *Int J Oncol* 2002;21:243-9.
 27. Kohler T, Wurl P, Meye A, Lautenschlager C, **Bartel** F, Borchert S, Bache M, Schmidt H, Holzhausen HJ, Taubert H. High bad and bcl-xL gene expression and combined bad, bcl-xL, bax and bcl-2 mRNA levels: molecular predictors for survival of stage 2 soft tissue sarcoma patients. *Anticancer Res* 2002;22:1553-9.
 28. Meye A, Wurl P, Bache M, **Bartel** F, Grunbaum U, Mansa-ard J, Schmidt H, Taubert H. Colony formation of soft tissue sarcoma cells is inhibited by lipid-mediated antisense oligodeoxynucleotides targeting the human mdm2 oncogene. *Cancer Lett* 2000;149:181-8.
 29. Meye A, Bilkenroth U, Schmidt U, Fussel S, Robel K, Melchior AM, Blumke K, Pinkert D, **Bartel** F, Linne C, Taubert H, Wirth MP. Isolation and enrichment of urologic tumor cells in blood samples by a semi-automated CD45 depletion autoMACS protocol. *Int J Oncol* 2002;21:521-30.
 30. Schlott T, Taubert H, Fayyazi A, Schweyer S, **Bartel** F, Korabiowska M, Brinck U. Analysis of central regulatory pathways in p53-deficient primary cultures of malignant fibrous histiocytoma exposed to ifosfamide. *Anticancer Res* 2004;24:3819-29.
 31. Schmidt H, Taubert H, Meye A, Wurl P, Bache M, **Bartel** F, Holzhausen HJ, Hinze R. Gains in chromosomes 7, 8q, 15q and 17q are characteristic changes in malignant but not in benign peripheral nerve sheath tumors from patients with Recklinghausen's disease. *Cancer Lett* 2000;155:181-90.
 32. Schmidt H, Taubert H, Wurl P, Bache M, **Bartel** F, Holzhausen HJ, Hinze R. Cytogenetic characterization of six malignant peripheral nerve sheath tumors: comparison of karyotyping and comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 2001;128:14-23.
 33. Schmidt H, Taubert H, Wurl P, Kappler M, Lange H, **Bartel** F, Bache M, Holzhausen HJ, Hinze R. Gains of 12q are the most frequent genomic imbalances in adult fibrosarcoma and are correlated with a poor outcome. *Genes Chromosomes Cancer* 2002;34:69-77.

34. Schmidt H, **Bartel** F, Kappler M, Wurl P, Lange H, Bache M, Holzhausen HJ, Taubert H. Gains of 13q are correlated with a poor prognosis in liposarcoma. *Mod Pathol* 2005;18:638-44.
35. Seidel C, **Bartel** F, Rastetter M, Bluemke K, Wurl P, Taubert H, Dammann R. Alterations of cancer-related genes in soft tissue sarcomas: hypermethylation of RASSF1A is frequently detected in leiomyosarcoma and associated with poor prognosis in sarcoma. *Int J Cancer* 2005;114:442-7.
36. Taubert H, Thamm B, Meye A, **Bartel** F, Rost AK, Heidenreich D, John V, Brandt J, Bache M, Wurl P, Schmidt H, Riemann D. The p53 status in juvenile chronic arthritis and rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 2000;122:264-9.
37. Taubert H, Koehler T, Meye A, **Bartel** F, Lautenschlager C, Borchert S, Bache M, Schmidt H, Wurl P. mdm2 mRNA level is a prognostic factor in soft tissue sarcoma. *Mol Med* 2000;6:50-9.
38. Taubert H, Riemann D, Kehlen A, Meye A, **Bartel** F, John V, Brandt J, Bache M, Wurl P, Schmidt H, Weber E. Expression of cathepsin B, D and L protein in juvenile idiopathic arthritis. *Autoimmunity* 2002;35:221-4.
39. Taubert H, Schuster K, Brinck U, **Bartel** F, Kappler M, Lautenschlager C, Bache M, Trump C, Schmidt H, Holzhausen HJ, Wurl P, Schlott T. Loss of heterozygosity at 12q14-15 often occurs in stage I soft tissue sarcomas and is associated with MDM2 amplification in tumors at various stages. *Mod Pathol* 2003;16:1109-16.
40. Taubert H, Blumke K, Bilkenroth U, Meye A, Kutz A, **Bartel** F, Lautenschlager C, Ulbrich EJ, Nass N, Holzhausen HJ, Koelbl H, Lebrecht A. Detection of disseminated tumor cells in peripheral blood of patients with breast cancer: correlation to nodal status and occurrence of metastases. *Gynecol Oncol* 2004;92:256-61.
41. Taubert H, Kappler M, Bache M, **Bartel** F, Kohler T, Lautenschlager C, Blumke K, Wurl P, Schmidt H, Meye A, Hauptmann S. Elevated expression of survivin-splice variants predicts a poor outcome for soft-tissue sarcomas patients. *Oncogene* 2005;24:5258-61.
42. Taubert H, Greither T, Kaushal D, Wurl P, Bache M, **Bartel** F, Kehlen A, Lautenschlager C, Harris L, Kraemer K, Meye A, Kappler M, Schmidt H, Holzhausen HJ, Hauptmann S. Expression of the stem cell self-renewal gene Hiwi and risk of tumour-related death in patients with soft-tissue sarcoma. *Oncogene* 2007;26:1098-100.
43. Taubert H, Wurl P, Greither T, Kappler M, Bache M, **Bartel** F, Kehlen A, Lautenschlager C, Harris LC, Kaushal D, Fussel S, Meye A, Bohnke 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.
44. Taubert HW, **Bartel** F, Kappler M, Schuster K, Meye A, Lautenschlager C, Thamm-Mucke B, Bache M, Schmidt H, Holzhausen HJ, Wurl P. Reduced expression of hMSH2 protein is correlated to poor survival for soft tissue sarcoma patients. *Cancer* 2003;97:2273-8.
45. Wurl P, Fittkau M, Meye A, **Bartel** F, Schmidt H, Schonfelder M, Taubert H. Low detection rate of p53 antibodies in sera of soft tissue sarcoma patients. *Cancer Lett* 2001;170:199-205.
46. Wurl P, Kappler M, Meye A, **Bartel** F, Kohler T, Lautenschlager C, Bache M, Schmidt H, Taubert H. Co-expression of survivin and TERT and risk of tumour-related death in patients with soft-tissue sarcoma. *Lancet* 2002;359:943-5.

Buchbeiträge

1. F. **Bartel**, J. Lasch. Virale und nichtvirale Gentherapie: Techniken und Ansätze (Kap. 4.1) in Diagnostik und Therapie der Weichteilsarkome - Stand und Perspektiven. Rath, F.W.; Schönfelder, M. (Hrsg.) Karger Verlag, Leipzig, 2002.
2. A. Meye und F. **Bartel** Bedeutung des Onkogens mdm2 für die Entwicklung neuer Therapiestrategien (Kap. 4.4) in Diagnostik und Therapie der Weichteilsarkome - Stand und Perspektiven. Rath, F.W.; Schönfelder, M. (Hrsg.) Karger Verlag, Leipzig, 2002.

Übersicht über Preise und Auszeichnungen

1. Bester Forschungsbeitrag 2004
Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie in Rostock
2. Bester Forschungsbeitrag 2007
Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie in Magdeburg
3. AACR Young Investigator Award 2007
MDM2-Tagung in Woods Hole, USA

Übersicht über eingeworbene Drittmittel

1. Titel: „Untersuchungen zum Einfluss von HDMX und seiner Spleißvarianten auf die Funktionalität des p53-Tumorsuppressor-Pathways in Ovarialkarzinomen?“
Dauer: 2 Jahre
Projektträger: Land Sachsen-Anhalt
Mittel: 18.000 €
2. Titel: „Untersuchung der klinischen Relevanz von Mdm2-Onkogen-Veränderungen in malignen Weichteilsarkomen: Angriffspunkt für die Entwicklung eines molekulargenetischen Therapiekonzeptes?“
Dauer: 2 Jahre
Projektträger: Deutsche Krebshilfe
Mittel: 90.750 €
3. Titel: „Die Bedeutung des MDM2-Gens und seiner Produkte für die Diagnostik, Prognose und Therapie von Weichteilsarkomen“ – Fortsetzungsantrag
Dauer: 2 Jahre
Projektträger: Deutsche Krebshilfe
Mittel: 120.000 €

4. Titel: „Das Onkogen HDMX im humanen Ovarialkarzinom – Prognosefaktor und Ziel einer molekularen therapeutischen Intervention?“
Dauer : 1 Jahr
Projektträger: Wilhelm-Roux-Programm – Juniorgruppe
Mittel: 36.491 €
5. Verlängerung der Juniorgruppe (Projekt 4)
Dauer : 1 Jahr
Projektträger: Wilhelm-Roux-Programm – Juniorgruppe
Mittel: 65.000 €
6. Verlängerung der Juniorgruppe (Projekt 4)
Dauer : 1 Jahr
Projektträger: Wilhelm-Roux-Programm – Juniorgruppe
Mittel: 79.000 €
7. Titel: „Sind das Onkogen HDMX und seine Spleißvarianten im humanen Ovarialkarzinom?“
Dauer : 2 Jahre
Projektträger: Wilhelm-Sander-Stiftung
Mittel: 69.620 €
8. Titel: „Untersuchungen zu Sequenzveränderungen des Onkogens HDMX in humanen Weichteilsarkomen und Ovarialkarzinomen“
Dauer : 1 Jahre
Projektträger: Wilhelm-Roux-Programm
Mittel: 9.000 €
9. Titel: „Untersuchungen zur Regulation der MDMX-Expression durch die microRNA miR191“
Dauer : 3 Monate (Reisestipendium)
Projektträger: Fritz-Thyssen-Stiftung
Mittel: 5.400 €
10. Titel: „Untersuchungen zum Zusammenhang der Expression von HDM2- und HDMX-Spleißvarianten nach DNA-Schäden und der Zytostatikaresistenz in Ovarialkarzinomen“
Dauer : 3 Jahre
Projektträger: Deutsche Krebshilfe
Mittel: 108.000 €

Lebenslauf

Persönliche Daten

geboren am 22. April 1972 in Ludwigslust

Eltern: Elisabeth und Manfred Bartel

Familienstand verheiratet, 2 Kinder

Ausbildung Studium der Biochemie an der Martin-Luther –University Halle-Wittenberg

Abschluss 1996: Diplom-Biochemiker Prädikat: „Gut“

Promotion zum Dr. rer. nat. am Fachbereich Biochemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Abschluss 2002: magna cum laude

Wissenschaftlicher Werdegang

seit 1.9.2008 Leiter des Forschungslabors am Institut für Pathologie

2007 Verleihung des AACR Young Investigator Awards für herausragende Forschungsleistungen

seit 2005 Leiter einer Juniorgruppe am Institut für Pathologie, Universität Halle

2000 und 2002 mehrmonatige Arbeitsaufenthalte am St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN, U.S.A. Schwerpunkt: Entwicklung adenoviraler Vektorsysteme zur Gentherapie von Weichteilsarkomen sowie die molekulare Charakterisierung kindlicher Rhabdomyosarkome

seit 1998 Universität Halle-Wittenberg, Medizinische Fakultät, Institut für Pathologie

Schwerpunkt: Charakterisierung des Onkogens MDM2 in Weichteilsarkomen (Genstatus, Amplifikation, Expressionsstudien, Analyse von Isoformen, Mutationen) sowie die Entwicklung und Testung von Gentherapiestrategien mit MDM2 als Target

1996 bis 1998 Universität Leipzig, Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin, Abteilung Medizinische Biotechnologie, Leipzig - Schwerpunkt: Entwicklung von Assays zum patientenspezifischen Cytostatikascreening mit miniaturisierten Hohlfaserbioreaktoren

1995 Universität Halle-Wittenberg, Medizinische Fakultät, Institut für Medizinische Immunologie - Diplomarbeit zum Thema: Quantifizierung der Preproenkephalin-mRNA in Lymphozyten mittels kompetitiver RT-PCR

Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Habilitationsschrift selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt zu haben. Ich habe keine anderen als die im Literaturverzeichnis angeführten Quellen benutzt und sämtliche Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen wurden, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, als solche kenntlich gemacht. Ebenfalls sind alle von anderen Personen bereitgestellten Materialien oder erbrachten Leistungen als solche gekennzeichnet. Ich erkläre weiterhin, dass an keiner anderen Hochschule ein Habilitationsverfahren eröffnet wurde. Ich habe bisher keine Habilitationsversuche an anderen Hochschulen unternommen.

Halle/Saale, 9. Dezember 2008

Dr. Frank Bartel