

Aus dem Institut für Pathologie
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Direktor: Prof. Dr. med. Steffen Hauptmann

**Molekulare Charakterisierung des humanen *MDMX*-Gens (HDMX)
in Weichteilsarkomen - besitzen der Amplifikationsstatus und das
Genexpressionsniveau eine prognostische Relevanz?**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt der
Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Jördis Schulz
geboren am 19. 11. 1975 in Burg bei Magdeburg (Sachsen-Anhalt)

Gutachter:

1. Prof. Dr. Helge Taubert
2. Prof. Dr. Peter Würfl

verteidigt in/am: Halle/Saale, 23.01.2008

urn:nbn:de:gbv:3-000013008

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000013008>]

Meinen Eltern

Bibliographisches Verzeichnis

Schulz, Jördis

Molekulare Charakterisierung des humanen *MDMX*-Gens (*HDMX*) in Weichteilsarkomen - besitzen der Amplifikationsstatus und das Genexpressionsniveau eine prognostische Relevanz?

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Medizinische Fakultät, Dissertation, 2007

64 S., 58 Lit., 17 A., 3 Tab.

Referat:

Ziel der vorliegenden Arbeit war die molekulare Charakterisierung des *HDMX*-Gens in Weichteilsarkomen (WTS). Dabei stand die Untersuchung des Einflusses des Amplifikationsstatus und der mRNA-Expression des *HDMX*-Gens auf die Prognose der an WTS erkrankten Patienten im Vordergrund. Im Verlauf der Arbeit wurden weitere Spleißvarianten detektiert und analysiert. Von großem Interesse war dabei das *HDMX*-S-Transkript, dessen Expression ebenfalls auf die prognostische Relevanz für an WTS erkrankte Patienten hin untersucht wurde.

Es konnte gezeigt werden, dass 17% (11 von 66) der WTS-Proben eine *HDMX*-Amplifikation aufwiesen. In der Kaplan-Meier-Analyse zeigte sich, dass diese Patienten eine deutlich schlechtere Prognose hatten. Die durchschnittliche Überlebenszeit dieser Patienten betrug 25 Monate (68 Monate Überlebenszeit der Patienten ohne *HDMX*-Amplifikation). Nach der Cox-Regression war das Risiko, an einem WTS zu versterben für Patienten mit *HDMX*-Amplifikation 6,5-fach höher als für die Patienten ohne *HDMX*-Amplifikation. Weiterhin konnte ermittelt werden, dass die Überlebenszeit der Patienten, deren Tumor die Spleißvariante *HDMX*-S expremierte, deutlich verkürzt war. Eine Überexpression der *HDMX*-S-mRNA verkürzte die Überlebenszeit noch drastischer. Dabei war das Risiko, an einem WTS zu versterben bei Malignen Fibrösen Histiocyten und Fibrosarkomen 8,1-fach erhöht.

Es konnte somit bewiesen werden, dass die *HDMX*-Genamplifikation und die *HDMX*-S-Überexpression einen unabhängigen, negativen prognostischen Faktor für WTS-Patienten darstellen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Weichteilsarkome	1
1.2	Molekulare Prognosefaktoren für WTS	4
1.3	Das Tumorsuppressorgen p53	5
1.4	Das <i>MDM2</i> -Onkogen und dessen Wechselwirkung mit p53	6
1.5	Das <i>HDMX</i> -Gen	8
1.6	<i>HDMX</i> -Spleißvarianten	10
1.7	Aufgabenstellung	11
2	Material	12
2.1	Tumormaterial	12
2.2	Geräte und Verbrauchsmaterial	12
2.3	Chemikalien	12
2.4	Enzyme	13
2.5	Kits	13
2.6	Plasmide	13
2.7	Primer	13
3	Methoden	15
3.1	Zellkultivierung	15
3.2	Isolation von Nukleinsäuren	15
3.2.1	RNA-Isolation aus Patientenproben	15
3.2.2	Konzentrationsbestimmung	15
3.2.3	RNA-Gelelektrophorese	16
3.2.4	Isolation von genomischer DNA aus Paraffinmaterial	16
3.2.5	Isolation genomischer DNA aus peripherem Blut	17

3.2.6	Isolation von Plasmid-DNA	18
3.2.7	Maxi- und Megapräparation	19
3.3	RT-PCR und Polymerasekettenreaktion	19
3.3.1	Reverse Transkription	19
3.3.2	Polymerasekettenreaktion	19
3.3.3	Multiplex-PCR	20
3.3.4	Gelelektrophorese	21
3.3.5	DNA-Isolation aus Agarose-Gelen	21
3.3.6	Gellauf PAGE	21
3.3.7	Silberfärbung	22
3.3.8	Klonierung von DNA-Fragmenten	22
3.3.9	Sequenzierung	23
3.10	statistische Auswertung	23
4	Ergebnisse	24
4.1	<i>HDMX</i> -Amplifikationsstatus in Weichteilsarkomen	24
4.1.1	Auswahl der Primer	24
4.1.2	Optimierung der Reaktionsbedingungen für die Multiplex-PCR	24
4.1.3	Auswahl der Tumor- und Blutproben	26
4.1.4	Bestimmung des <i>HDMX</i> -Amplifikationsstatus	27
4.1.5	Korrelation der <i>HDMX</i> -Genamplifikation mit klinischen Daten	27
4.1.6	Einfluss der <i>HDMX</i> -Amplifikation auf das Überleben von WTS-Patienten	28
4.1.7	Untersuchung benachbarter Genloci	29
4.2	<i>HDMX</i> -mRNA-Expressionsanalysen	30
4.2.1	Nachweis der <i>HDMX</i> -Expression in Tumorproben	30
4.2.2	FL- <i>HDMX</i> -mRNA und <i>HDMX</i> -S-mRNA-Expressionsanalysen	33
4.2.3	Detektion der FL- <i>HDMX</i> und <i>HDMX</i> -S-Transkripte in Normalgewebe	35
4.2.4	Klinische Bedeutung der <i>HDMX</i> -S-mRNA-Expression für WTS-Patienten	35

5	Diskussion	38
6	Zusammenfassung	42
7	Literaturverzeichnis	44

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
bidest.	bidestilliertes Wasser
bp	Basenpaar
cDNA	komplementäre DNA
CGH	comparative genomic hybridization – komparative genomische Hybridisierung
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
FL	„full length“ – in der Arbeit als Synonym für das <i>MDMX</i> -Transkript verwendet, das für das 90 kDa-Protein kodiert
g	Gramm
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
IHC	Immunhistochemie
kDa	Kilodalton
LB	Luria Broth - Bakteriennährmedium
LMS	Leiomyosarkom
mAk	monoklonaler Antikörper
<i>HDM2</i>	„murine double minute gene 2“ – in der Arbeit für das humane Homolog MDM2 verwendet; zurzeit werden in der Literatur beide Bezeichnungen parallel verwendet
HDM2	Protein des „murine double minute gene 2“
MFH	malignes fibröses Histiozytom
MOPS	Morpholinopropan-sulfonsäure
mRNA	„messenger RNA“ – Boten-RNA
mt	Mutante, mutiert
n.b.	nicht bestimmt
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
PBS	„phosphate buffered saline“ – Phosphat-gefufferte Kochsalzlösung

PCR	„polymerase chain reaction“ – Polymerasekettenreaktion
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RMS	Rhabdomyosarkom
rpm	„revolutions per minute“ – Umdrehungen pro Minute
RT	reverse Transkription
SE	sense
TP53	Tumorsuppressorprotein p53
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
TSG	Tumorsuppressorgen
ÜN	über Nacht
wt	Wildtyp
WTS	Weichteilsarkom
X-Gal	5-Bromo-4-chlor-3-indoyl- β -D-galaktosid

1 Einleitung

1.1 Weichteilsarkome

Zu den Weichteilsarkomen (WTS) zählt man alle malignen, nichtepithelialen Tumoren, die sich nicht in den parenchymatösen Organen, dem zentralen Nervensystem, dem Skelettsystem bzw. den lymphoretikulären Organen entwickeln. Sie schließen Tumoren des peripheren und autonomen Nervensystems ein (Enzinger und Weiss, 1995). Sarkome treten wesentlich seltener auf als Karzinome und sind durch eine meist frühzeitige hämatogene oder lymphogene Metastasierung gekennzeichnet, letztere vorrangig bei Rhabdomyo- und Synovialsarkomen. Die Häufigkeit der Metastasierung bei WTS beträgt ca. 50-80% (Enzinger und Weiss, 1995). Die Metastasen sind hauptsächlich in der Lunge, aber auch in der Leber, im Skelettsystem und in den Lymphknoten zu finden. Bei der chirurgischen Therapie ist darauf zu achten, dass so genannte Skip-Metastasen vorliegen können. Diese, in unmittelbarer Umgebung des Primärtumors befindlichen, kleinen Metastasen müssen sorgfältig entfernt werden (R0-Resektion), da von ihnen fast immer Lokalrezidive ausgehen (Giuliano und Eilber, 1985; Enzinger und Weiss, 1995; Brennan, 1996). Der Anteil der WTS an allen malignen Tumoren des Erwachsenen beträgt ca. 1% (Katenkamp, 1990; Gustafson, 1994; Enzinger und Weiss, 1995). Etwa 15% aller WTS sind nicht genau klassifizierbar und werden daher als eine Entität zusammengefasst (z.B. malignes fibröses Histiozytom, MFH).

Insgesamt werden annähernd 150 Entitäten und Subtypen unterschieden, deren Diagnose und Therapie aufgrund ihrer Lokisationsvielfalt, Rezidivneigung und Fähigkeit zur Metastasierung in Zusammenarbeit von Pathologen und Ärzten verschiedener Fachrichtungen durchgeführt werden muss (Rath *et al.*, 2002).

In der Bundesrepublik Deutschland treten jährlich rund 800 bis 1500 Neuerkrankungen auf. Auf alle Bevölkerungs- und Altersgruppen der Industrieländer in Westeuropa und Nordamerika bezogen, ergibt sich eine Inzidenz der WTS von 1-2 Neuerkrankungen je 100.000 Einwohner pro Jahr (Waterhouse *et al.*, 1982; Katenkamp, 1990; Enzinger und Weiss, 1995). Das Auftreten bestimmter Subtypen ist altersabhängig. Bei über 80-Jährigen ist die Inzidenz 4- bis 6-mal höher als bei jüngeren Patienten (ca. 8 je 100.000 Einwohner). Jedoch gibt es Sarkome, die vorwiegend bei Kindern und Jugendlichen auftreten, wie z.B. das Rhabdomyosarkom. Der Altersgipfel über alle Entitäten liegt bei 64 Jahren (Enzinger und Weiss, 1995; Gustafson, 1994). Männer haben eine höhere Disposition als Frauen (Verhältnis 1,3:1).

Nach dem heutigen Stand der Wissenschaft geht man davon aus, dass WTS aus undifferenzierten mesenchymalen Stammzellen mit pluripotenten Eigenschaften hervorgehen

(Katenkamp und Kosmehl, 1995). Ursächliche Faktoren für die Entstehung von Weichteilsarkomen sind nicht sicher identifiziert. Eine genetische Basis mit familiärer Häufung ist bisher nur bei der Neurofibromatose und dem Li-Fraumeni-Syndrom nachgewiesen worden (Enzinger und Weiss, 1995). Die Induktion eines WTS mit Hilfe chemischer Substanzen (Benzanthrazen, Dioxin) ist nur im Tierversuch belegt worden. Ob diese Ergebnisse auf den Menschen übertragbar sind, ist bisher noch nicht geklärt (Enzinger und Weiss, 1995). Eine Entstehung von Mesotheliomen durch Asbestexposition gilt hingegen als gesichert (Brockmann, 1991).

Die Bezeichnung der WTS richtet sich nach dem erreichten Phänotyp nach Abschluss aller Differenzierungs- und Entdifferenzierungsprozesse (Katenkamp und Kosmehl, 1995). Demnach weist beispielsweise ein Fibrosarkom dem Bindegewebe ähnliche Differenzierungsmerkmale auf. Die Malignität eines Tumors spiegelt sich in dessen Entdifferenzierungsgrad wieder. Neben der Einteilung der Tumoren nach histologischen Subtypen, dient das Grading der histopathologischen Differenzierung und der Einschätzung der Malignität eines Tumors. Somit kann Auskunft über dessen klinische Manifestation und Prognose gegeben werden. Neben den relevantesten Parametern Differenzierungsgrad, Nekrosen und Mitoseaktivität, werden Zellreichtum, Polymorphie, Wachstumsverhalten, Einblutungen und Infiltrationen beurteilt. Ziel aller Grading-Systeme ist es, möglichst genaue Aussagen über die Prognose der Tumorerkrankung zu machen und eine effektive, sinnvolle Therapie einleiten zu können. Einheitliche, weltweit gleichermaßen akzeptierte Systeme gibt es bisher noch nicht (Rath, 2002). Da die bisherigen Graduierungssysteme nur eine statistische Sicherheit hinsichtlich der Aussagen über die Prognose des einzelnen Patienten erlauben, ist es erstrebenswert, neue unabhängige Prognosefaktoren zu finden. Damit wäre es möglich, einer individuellen Prognosebestimmung sehr nahe zu kommen. Der heutige Trend der Malignitätsgraduierung bezieht dabei nicht nur die konventionellen Parameter ein. Häufig wird die Bestimmung molekularer Marker wie Onkoproteine oder Proliferationsmarker empfohlen, um WTS beurteilen zu können (Tomita *et al.*, 1993; Brinck *et al.*, 1995).

Ein einfacher und schneller Nachweis ist mit immunhistochemischen Methoden möglich, dessen prognostische Relevanz für MFH bereits nachgewiesen wurde (Brinck *et al.*, 1998). Zur Bestimmung der Ausdehnung eines malignen Tumors und dessen Einteilung in verschiedene Stadien dient das so genannte Staging (TNM-System) der WHO. Hierbei werden Tumorgöße, Tumortiefe, Lymphknotenbefall und das Vorliegen von Fernmetastasen mit Hilfe von operativen Eingriffen bzw. Biopsien und bildgebenden Verfahren (z.B. CT, MRT, konventionelle Röntgenaufnahmen, farbcodierte Duplexsonographie etc.) beurteilt.

Die Lokalisation der WTS erstreckt sich nahezu über den gesamten Organismus. Die unteren Extremitäten sind mit 40-50% aller Fälle am häufigsten betroffen. 20-25% betreffen das Retroperitoneum/Abdomen, 15-20% die Rumpfwand, 10-15% die oberen Extremitäten, 10% den Kopf-Hals-Bereich und weniger als 1% die Mamma (Enzinger, 1995; Brennan, 1996). Diese prozentuale Verteilung der WTS ist in etwa der Verteilung der Weichgewebsmasse des Körpers proportional. 20% aller diagnostizierten WTS des Erwachsenen sind Liposarkome und MFH, 10% Leiomyosarkome, ca. 10-15% Rhabdomyosarkome, jeweils 10% Fibrosarkome, synoviale Sarkome bzw. unklassifizierbare Sarkome und 6% maligne periphere Nervenscheidentumoren (Katenkamp, 1990; Enzinger, 1995; Brennan, 1996). Besonders nachteilig für eine rechtzeitige Diagnose und Therapie eines WTS wirkt sich die Schmerzlosigkeit und allgemeine Symptomlosigkeit (kein Gewichtsverlust, normale Leistungsfähigkeit und Appetit) aus. Daher suchen die Patienten meist erst im späten Stadium der Erkrankung, oft bei bereits bestehender Metastasierung, einen Arzt auf. Durch unphysiologische Gewebevermehrung, die besonders an den Extremitäten auffällig ist, treten meist runde Schwellungen auf, die aber oft erst nach massiver Größenzunahme und Infiltration als Spätfolge der Erkrankung durch den Patienten wahrgenommen werden. Aus diesem Grunde und wegen der hohen Rezidivrate der WTS ist deren Prognose vergleichsweise ungünstig. Unabhängig von der Tumorart und den Behandlungsmerkmalen beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate ca. 55% (Pollock *et al.*, 1996), die 10-Jahres-Überlebensrate 38% (Myhre-Jensen *et al.*, 1991). Mit zunehmendem Tumorstadium sinkt die Überlebenszeit der Patienten deutlich. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt im Stadium I 90%, im Stadium II 60%, im Stadium III rund 25% und im Stadium IV nur noch 2-5 % (Enzinger und Weiss *et al.*, 1995). Demzufolge ist eine frühe und umfangreiche Diagnostik und gezielte Therapie Voraussetzung, um die Mortalitätsrate senken zu können. Die zur Therapie der WTS angesetzten prä- und postoperativen Behandlungsrichtlinien ergeben sich aus dem Wachstumsverhalten des jeweiligen Tumors. Der meist von einer Pseudokapsel umgebene Tumor wächst zunächst verdrängend und erst mit Eintreten der Metastasierung infiltrativ im Sinne der Überschreitung von anatomischen Grenzen (Durchbruch von Faszien, Periost und Gefäßen). Unter Berücksichtigung der Ausbreitung und Lage des Tumors ist in allen Fällen darauf zu achten, dass der Tumor und ggf. die Skip-Metastasen während des individuellen chirurgischen Eingriffs unversehrt, vollständig und mit ausreichendem Sicherheitsabstand entfernt werden. Begleitende Therapieformen wie systemische Chemotherapie, Hyperthermie, Radiatio und Extremitätenperfusion zeigen bei WTS des Erwachsenen keine ausreichende Wirkung und sind daher für eine langfristige Tumorkontrolle von geringer Bedeutung. WTS besitzen eine eingeschränkte Sensibilität gegenüber derartigen Verfahren mit einer Ausnahme, der isolierten

Extremitätenperfusion mit Zytostatika. Hierbei konnte eine Ansprechquote von rund 90% erzielt werden (Lienard *et al.*, 1992; Eggermont *et al.*, 1996; Gutman *et al.*, 1997; Lejeune *et al.*, 2000).

Aufgrund der Tumorvariabilitäten, ihrer Histologie und ihres biologischen Verhaltens kann jedoch keine genaue Prognose für Patienten mit WTS erstellt werden. Besonders über sehr seltene Tumoren können heute noch keine Aussagen hinsichtlich Therapieerfolg und Krankheitsverlauf getroffen werden. Derzeit ist eine Prognoseeinschätzung nur anhand der Auswertung von Grading, Staging und Tumorentität möglich. Daher sind molekulare Marker zur genaueren Beurteilung der Tumorerkrankung und individuellen Prognose wünschenswert. Mit Hilfe der molekulargenetischen Charakterisierung der am Entstehen eines Weichteilsarkoms beteiligten Gene bzw. Proteine könnten sich zudem alternative Therapieverfahren eröffnen, eine Sensibilisierung des Tumors für bereits existierende Verfahren (Chemotherapie, Bestrahlung) erreicht und exaktere prognostische Aussagen getroffen werden.

Besondere Charakteristika der WTS seien an dieser Stelle noch einmal hervorgehoben:

- erschwerte Einschätzung der individuellen Prognose durch sehr variable Histologie, Metastasierung, Tumorausdehnung und biologisches Wachstumsverhalten
- Ihr Auftreten ist vergleichsweise selten und meist symptomlos, sodass die Diagnose und Therapie oft erst in späten Erkrankungsstadien erfolgt.
- WTS besitzen eine hohe Rezidivneigung, hauptsächlich durch frühe Bildung von „Skip-Metastasen“.
- Durch die ausgeprägte Resistenz der WTS gegenüber konventionellen Behandlungsmaßnahmen, wie Chemotherapie und Bestrahlung, erweist sich die Therapie der Tumoren als sehr problematisch bei oft nur mäßigem Erfolg.

1.2 Molekulare Prognosefaktoren für WTS

Bei der Tumorgenese kommt es in den Tumorzellen zu vielseitigen physiologischen und morphologischen Veränderungen, die miteinander verknüpft sind und durch gegenseitige Beeinflussung das Tumorwachstum vorantreiben. Diese Veränderungen finden sich auf der DNA,- RNA- und/oder der Proteinebene. Sie können als Keimbahnmutationen vererbt sein (z.B. hereditäre p53-Tumor-Suppressor-Genmutation) oder als somatische Mutationen erworben werden und sowohl einzelne Gene, Chromosomen oder das gesamte Genom betreffen (Hagemann, 1984). Ursache der Transformationen sind Mutagene, wie z.B.

polyzyklische Kohlenwasserstoffe, Dioxine, Viren oder energiereiche Strahlung. Besondere Bedeutung bei der Entstehung von Tumoren kommt den Onkogenen und Onkoproteinen zu, die die Zellproliferation anregen. Onkoproteine, als Rezeptoren, Proteinkinasen oder Transaktivatoren, sind Bestandteile der Signalwege von Wachstumsfaktoren. Diese Gene können in Tumoren amplifiziert und/oder mutiert sein, woraus eine erhöhte Proteinexpression resultieren kann.

Ein entscheidender Faktor für die Tumorentstehung ist die Gruppe der Tumorsuppressorgene (TSG). Sie kodieren für Proteine, die das Wachstum von Zellen negativ regulieren und somit der Zellproliferation durch Induktion der Apoptose und Hemmung der Zellteilung entgegen wirken. TSG liegen in Tumoren häufig verändert vor (Mutationen, Deletionen), sodass es zum partiellen oder totalen Funktionsverlust des Gens kommt. Für die Entstehung von Tumoren müssen wahrscheinlich mehrere Mutationen in den Onkogenen und TSG vorliegen. Untersuchungen an kolorektalen Tumoren ergaben, dass z.B. vier bis fünf unabhängige Mutationen nötig sind, damit maligne Tumoren ausgebildet werden. (Vogelstein und Kinzler, 1993; Fearon und Vogelstein, 1990).

1.3 Das Tumorsuppressorgen p53

Einen besonderen Einfluss auf die Entstehung von Weichteilsarkomen besitzt das TSG p53. Seine Funktion ist in Tumoren in ca. 50% der Fälle durch Mutationen/Deletionen eingeschränkt. Liegen zwei defekte Allele vor, kommt es zum vollständigen Funktionsverlust des Gens. Man schätzt, dass von den jährlich weltweit neu auftretenden 6,5 Millionen Tumorneuerkrankungen ca. 2,5 Millionen p53-Mutationen aufweisen (Harris, 1996). Taubert *et al.* untersuchten in ihren Studien 146 WTS-Patienten auf molekulare Veränderungen im TSG p53. In 16% aller untersuchten Tumoren konnte ein mutiertes p53-Gen identifiziert werden (Taubert *et al.*, 1998, 2001). Der Einfluss der p53-Mutationen auf die Prognose der an einem WTS erkrankten Patienten konnte mit Hilfe der multivariaten Cox-Regressionsanalyse ermittelt werden. Das Risiko an einem WTS zu versterben, ist demnach für Patienten mit mutiertem p53 bis zu 2,4-fach höher als im Vergleich zu Patienten ohne eine p53-Mutation. P53 wird durch DNA-Schäden (bedingt durch Bestrahlung, Chemotherapeutika usw.) aktiviert. Es ist anschließend für den Zellzyklusarrest (Senkung der Proliferationsrate) und den programmierten Zelltod (Apoptose) verantwortlich.

1.4 Das MDM2-Onkogen und dessen Wechselwirkung mit p53

Der Gegenspieler von p53, das MDM2 (murine double minute gene 2), hat in den vergangenen Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Das *MDM2*-Gen ist auf der Chromosomenregion 12q14.3-15 lokalisiert und kodiert für ein 90 kDa-Protein. Es liegt in rund 30% aller WTS amplifiziert vor. Eine *MDM2*-Genamplifikation korreliert mit einer guten Prognose (Bartel *et al.*, 2001). Die Wechselwirkung von MDM2 mit p53 ist bereits sehr gut untersucht (Juven-Gershon und Oren, 1999; Freedmann *et al.*, 1999). Die Transkription des *MDM2*-Gens wird durch p53 positiv reguliert. Durch die Bindung von p53 an den P2-Promoter des *MDM2*-Gens wird dessen Expression verstärkt. Auf der anderen Seite kann durch eine Komplexbildung des MDM2-Protein mit p53 dieses wiederum in seiner Funktion als Transkriptionsaktivator gehemmt und degradiert werden. Als E3-Ubiquitin-Ligase stimuliert es den nukleären Export von p53 und dessen proteolytischen Abbau. Auf diesem Wege entsteht zwischen der p53- und der MDM2-Expression ein so genannter autoregulatorischer

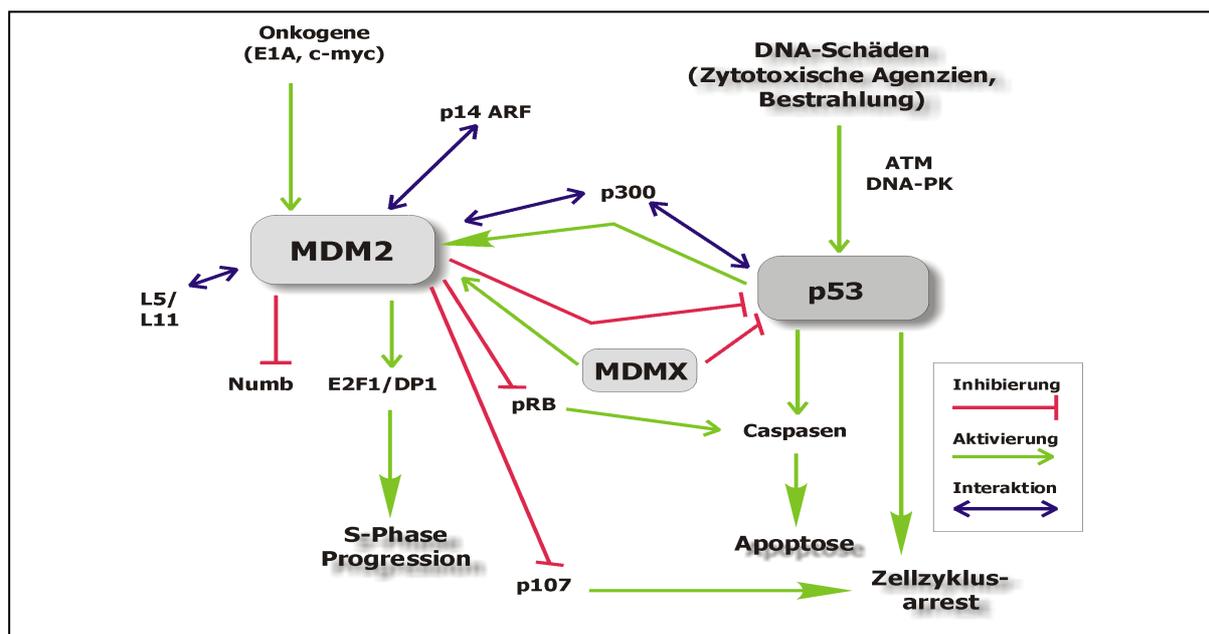


Abb. 1: Zusammenspiel des MDM2/HDMX/p53

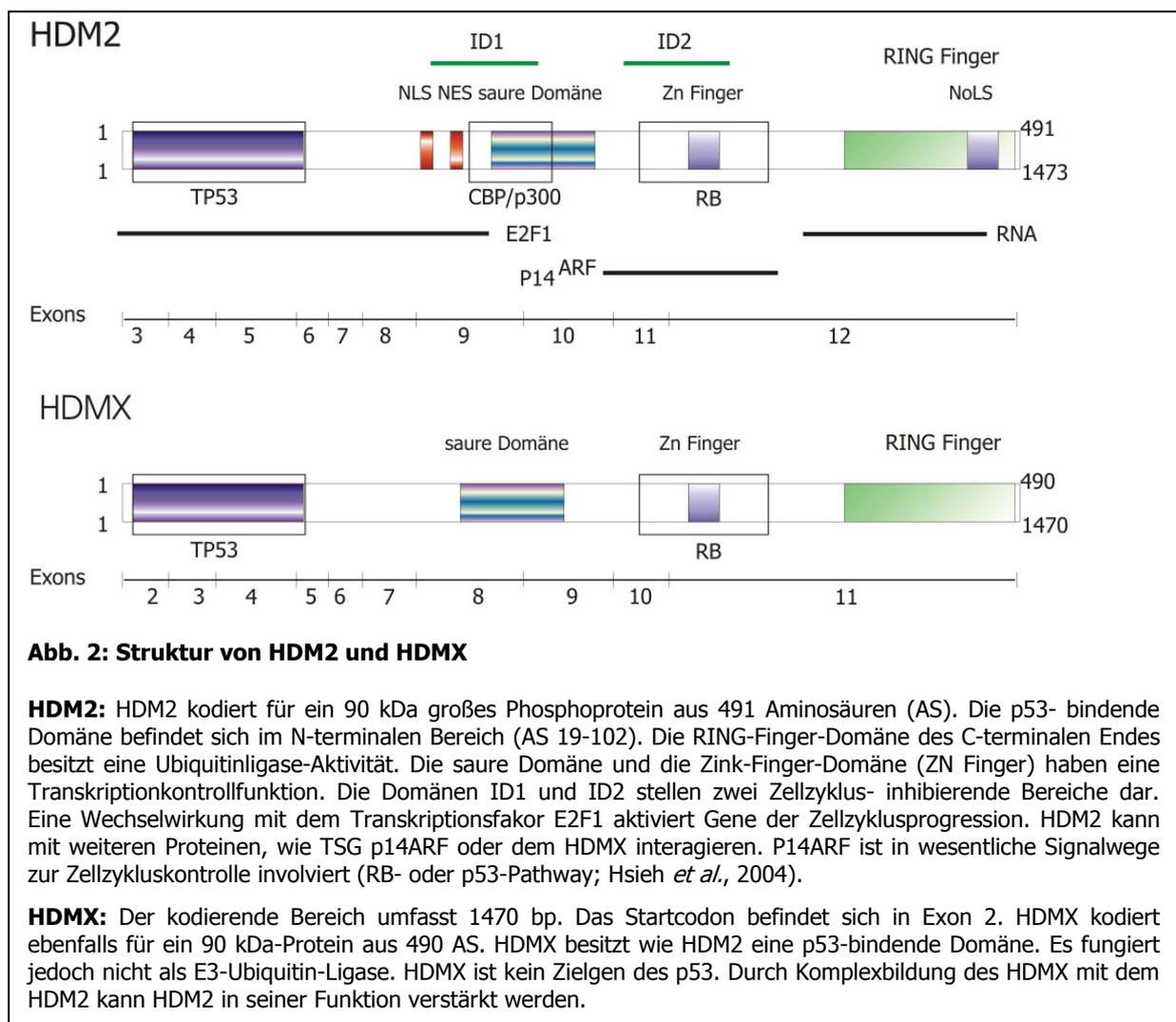
Das durch DNA-Schäden aktivierte TSG p53 verhindert die Tumorgenese durch Auslösung des Zellzyklusarrestes und der Apoptose. Durch Bindung des MDM2 an p53 kommt es, durch die Wirkung des MDM2 als E3-Ubiquitin-Ligase, zur Markierung des p53 für den nukleären Export und den proteolytischen Abbau. Dadurch blockiert MDM2 die transaktivierende Funktion des p53 und es wird einem gesteigerten Zellzyklusstop bzw. einer übermäßigen Apoptose entgegengewirkt (autoregulatorisches Feedback-Loop). In Tumoren kann diese Wechselwirkung, z.B. durch eine MDM2-Überexpression, gestört sein. MDMX kann ebenfalls an p53 binden und dessen Aktivität hemmen. Jedoch wird es nicht als E3-Ubiquitin-Ligase aktiv. Die Überexpression des HDMX führt zur unkontrollierten Vermehrung der Tumorzellen, d.h. zur Progression des Tumors. Eine p53-vermittelte MDMX-Expression findet nicht statt. Durch Komplexbildung des HDMX mit dem MDM2 kann MDM2 in seiner Funktion verstärkt werden. Das hat die Zunahme des proteolytischen Abbaus des p53 zur Folge und damit ein Voranschreiten der Tumorgenese.

Feedback-Loop (Momand *et al.*, 2000; Abb. 1). Bei Mutationen von p53 und/oder MDM2-Überexpression wird p53 in seiner Funktion gehemmt und kann damit der Tumorentstehung nicht mehr effektiv entgegenwirken. Eine MDM2-Überexpression ist in seiner Auswirkung mit einer p53-Alteration vergleichbar. MDM2 ist außerdem in der Lage an Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie zu binden und mit Proteinen in Wechselwirkung zu treten, die wiederum an Genpromotoren binden (Freedman *et al.*, 1999). Des Weiteren hemmt es die Funktion des ersten identifizierten und molekular charakterisierten Tumorsuppressorgens. Dieses sogenannte Rb-Gen spielt eine wesentliche Rolle bei der zellzyklusspezifischen Regulation von Genen. Mutationen in diesem Gen können beispielsweise zur Tumorbildung in der Retina, dem Retinoblastom führen (Weinberg *et al.*, 1995; Zheng und Lee, 2001). Diese Daten belegen, dass *MDM2* auch unabhängig von p53 als Onkogen wirksam ist.

Untersuchungen an wt-p53-Mäusen und p53-Nullmäusen zeigten, dass eine MDM2-Überexpression, an beiden Untersuchungsgruppen gleichermaßen, eine Tumorbildung hervorruft (Cordon-Cardo, 1997; Lundgren *et al.*, 1997). Auch in zahlreichen WTS-Entitäten konnte eine Überexpression des *MDM2*-Transkripts bzw. des MDM2-Proteins gefunden werden (Melzer *et al.*, 1995; Cordon-Cardo *et al.*, 1997; Würfl *et al.*, 1998). Eine statistisch signifikante Beziehung zwischen einer MDM2-Protein-Überexpression bzw. einer gleichzeitigen MDM2- und p53-Überexpression und einer schlechteren Prognose für WTS wurde bisher von Cordon-Cardo *et al.* (1994) und Würfl *et al.* (1997, 1998) nachgewiesen. Die Arbeitsgruppe von Würfl *et al.* untersuchte hierzu 215 WTS. Eine alleinige MDM2-Überexpression in Abhängigkeit vom eingesetzten Antikörper erwies sich als negativer Prognosefaktor (Würfl *et al.*, 1997). Eine kombinierte Überexpression des MDM2 und p53 stellte sich als 4,6-fach ($p=0,00001$) erhöhtes Risiko dar, an dem entsprechenden Tumor zu versterben. Eine drastische Erhöhung dieses Risikos auf das 19-fache konnte bei Patienten nachgewiesen werden, die ein WTS im Extremitätenbereich aufwiesen und sowohl für MDM2 als auch für p53 positiv waren (Würfl *et al.*, 1998). Somit stellt eine MDM2-p53-Koüberexpression einen unabhängigen molekularen Prognosefaktor mit großer Aussagekraft dar (Würfl *et al.*, 1997, 1998). Untersuchungen zu MDM2 und p53 zeigten, dass besonders auf genetischer Ebene für die Entstehung und den Verlauf von Tumorerkrankungen entscheidende Veränderungen zu finden sind. Aus diesem Grunde war es von Interesse, ein weiteres, dem *MDM2* verwandtes Gen, das *HDMX*-Gen, in Bezug auf dessen Amplifikationsstatus, Expressionsverhalten und Einfluss auf den Verlauf der WTS-Erkrankung zu untersuchen.

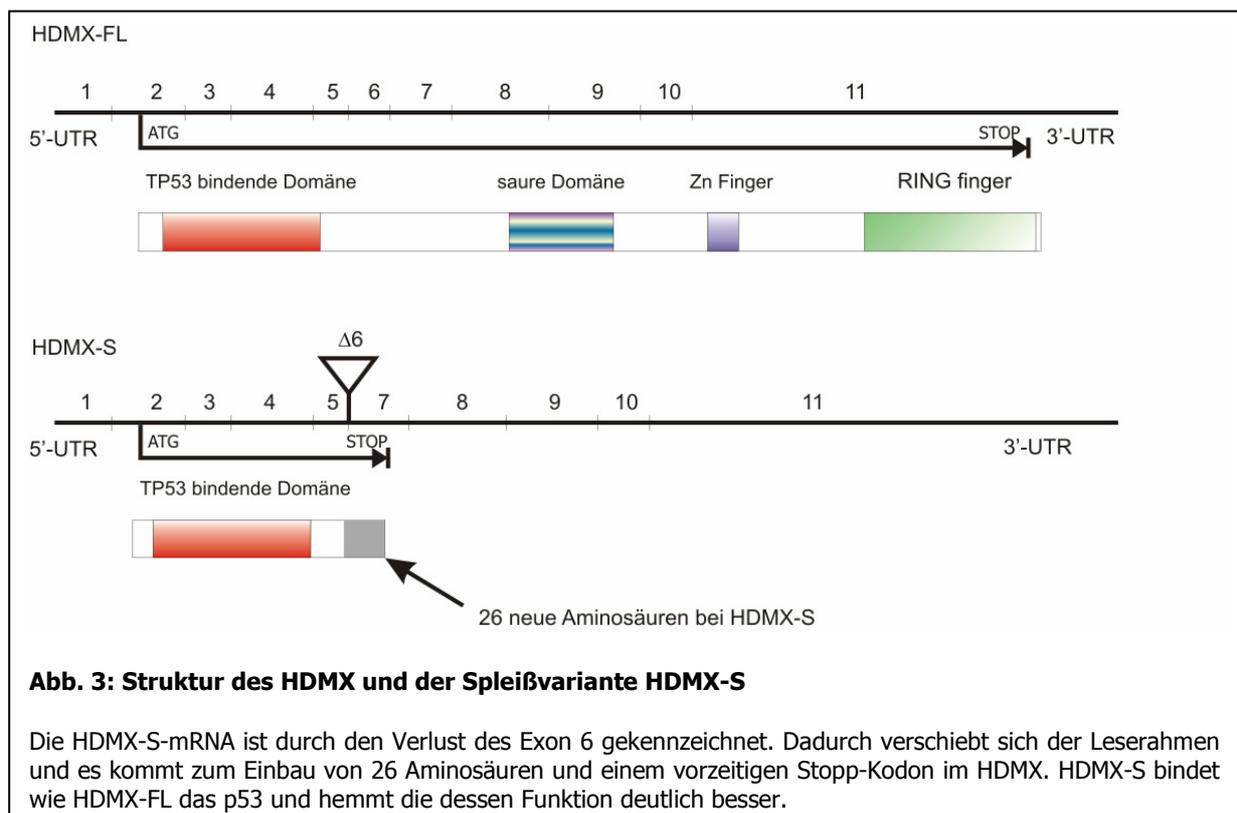
1.5 Das *HDMX*- Gen

Das *HDMX*-Gen (*MDMX* in der Maus) ist ein Homologes des *MDM2*-Gens und ist auf der Chromosomenregion 1q32 lokalisiert. Beide Proteine weisen einen ähnlichen Aufbau auf. Wie *MDM2* besitzt *HDMX* eine C-terminale RING-Finger-Domäne und eine N-terminale-Domäne, mit der es an die α -Helix der transaktivierenden Domäne von p53 binden kann (Shvarts *et al.*, 1996; Abb. 2). Durch diese Interaktion wird die Aktivität des p53-Proteins gehemmt, ohne dass *HDMX* direkt in den Export von p53 aus dem Zellkern oder dessen proteolytischen Abbau eingreift (Jackson und Berberich, 2000). Es wird jedoch nicht als Ubiquitin-Protein-Ligase (E3-Ligase) wirksam (Jackson und Berberich, 2000). Im Gegensatz zu *MDM2* wird die Transkription des *HDMX*-Gens nicht durch eine direkte DNA-Schädigung induziert (Shvarts *et al.*, 1997). Dies zeigt, dass der *HDMX*- Promotor nicht wie der P2-Promoter von *MDM2* durch p53 aktiviert werden kann. Es findet keine p53-vermittelte Expression von *HDMX* statt. Die hemmende Wirkung des *MDMX* auf p53 wurde mit Hilfe von Knock-out-Experimenten an



Mäusen belegt. Die beiden Untersuchungsgruppen (*MDMX*- und *MDM2*-Knock-out-Mäuse) verstarben durch unterschiedliche Störungen in der Entwicklung. *MDMX*-Knock-out-Embryos entwickelten sich nach 7-11 Tagen durch Stopp der Zellproliferation nicht weiter und starben ab. *MDM2*-Knock-out-Mäuse hingegen verstarben durch eine massive Apoptose im Blastulastadium. Die Phänotypen sowohl der *MDM2*- als auch der *MDMX*-Knock-out-Mäuse konnten durch gleichzeitigen Knock-out von p53 gerettet werden (Jones *et al.*, 1995; Parant *et al.*, 2001). Dies zeigt, dass beide Proteine eine regulierende Wirkung in Bezug auf p53 besitzen (Parant *et al.*, 2001). Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass HDMX durch eine Interaktion mit MDM2 die MDM2-vermittelte Hemmung der p53-Aktivität verhindern kann (Linares *et al.*, 2003). Damit hat HDMX einen bedeutenden Einfluss auf den p53-MDM2-Feedback-Loop (Michael und Oren, 2003).

Studien an malignen Gliomen zeigten, dass eine *HDMX*-Amplifikation hauptsächlich dann nachzuweisen war, wenn keine *MDM2*-Amplifikation und keine p53-Mutation vorlagen (Riemenschneider *et al.*, 1999 und 2003). In 5% der von Danovi *et al.* (2004) untersuchten Mammakarzinome, in denen ein wt-p53-Gen nachweisbar war, wurde *HDMX* amplifiziert. Untersuchungen an der Brustkrebszelllinie MCF-7, welche ein wt-p53-Gen besitzt, ergaben, dass sich das Zellwachstumsverhalten bei verringertem HDMX-Gehalt deutlich verlangsamte. Dies zeigt, dass durch die *HDMX*-vermittelte Hemmung von p53 die Tumorgenese beeinflusst



wird. Die genauen molekularen Mechanismen hierzu sind bisher noch unbekannt. Andere Untersuchungen weisen auf eine stabilisierende Wirkung des MDMX auf das MDM2 hin. Durch eine verringerte *MDMX*-Expression sank das MDM2- und erhöhte sich das p53-Niveau deutlich. Andererseits kann MDM2 unter bestimmten Bedingungen (DNA-Schäden) das MDMX-Niveau, durch Rekrutierung in den Kern, modulieren (Migliorini *et al.*, 2004). In diesem Modell wird vermutet, dass die p53 Aktivität über die Regulation des MDM2 durch MDMX gesteuert wird.

1.6 *HDMX*-Spleißvarianten

Neben dem Full-length-*HDMX/MDMX* (FL-*HDMX/MDMX*) konnten in humanen Tumor- und in Mäusezelllinien verschiedene Spleißvarianten nachgewiesen werden. Rallapalli *et al.* (1999) und de Graaf *et al.* (2001) detektierten das so genannte *HDMX-S/MDMX-S*. Dieses Transkript ist durch den Verlust des Exon 6 gekennzeichnet, wodurch eine Verschiebung des Leserahmens erfolgt (Abb. 3). Dies führt zu einem Einbau von 13 neuen Aminosäuren und einem vorzeitigen Stopp-Kodon im MDMX bzw. von 26 Aminosäuren und einem vorzeitigen Stopp-Kodon im HDMX. Das HDMX-S-Protein hemmt die p53-vermittelte Transkription und Apoptoseinduktion wesentlich effektiver, als das FL-HDMX (Rallapalli *et al.*, 1999 und de Graaf *et al.*, 2003). Bisher wurde diese kürzere Spleißvariante in Glioblastomen nachgewiesen (Riemenschneider *et al.*, 1999; Rallapalli *et al.* 1999). Daten über die *HDMX-S*-Spleißvariante in WTS sind bisher noch nicht bekannt.

1.7 Aufgabenstellung

Aufbauend auf den Arbeiten von Dr. Frank Bartel (Institut für Pathologie, AG tumorassoziierte Gene, MLU Halle-Wittenberg) zur Analyse des Onkogens MDM2, sollte in dieser Arbeit ein weiteres Gen, das *HDMX*-Gen, untersucht werden. Im Vordergrund standen dabei:

- die molekulare Charakterisierung des *HDMX*-Gens in WTS,
- die Untersuchung des Einflusses der mRNA-Expression und des Amplifikationsstatus des *HDMX*-Gens auf die Prognose der an WTS erkrankten Patienten,
- die Detektion von Spleißvarianten (besonders des *HDMX-S*),
- der Einfluss der *HDMX-S*-mRNA-Expression auf die Prognose von WTS-Patienten,
- Auswertung des Verhältnisses zwischen FL-*HDMX* und *HDMX-S*-mRNA in den untersuchten WTS sowie die
- prognostische Bedeutung von *HDMX*-Veränderungen bei WTS-Patienten.

Zu Beginn der Arbeiten gab es nur sehr wenige, jedoch viel versprechende Publikationen zum Thema *HDMX* und *HDMX-S*. Diese zeigten, dass beide Proteine eine bedeutende Rolle in der Tumorgenese spielen könnten. Aus diesem Grunde war es von Interesse Untersuchungen an WTS durchzuführen. Mit Hilfe der Bestimmung des Expressionsniveaus, des Amplifikationstatus und der anschließenden Korrelation der Daten mit klinischen Parametern, sollte deren Einfluss auf die Tumorentstehung bzw. den Krankheitsverlauf gewonnen werden. Ziel der Arbeit war es, mit den so erlangten Daten einen weiteren Beitrag auf der Suche nach neuen Therapieansätzen in der Tumorforschung leisten zu können.

2 Material

2.1 Tumormaterial

Die verwendeten Zelllinien sind in der Abteilung Zell- und Gewebezucht des Institutes für Pathologie der Universität Halle-Wittenberg kultiviert worden. Die hier untersuchten Tumorproben wurden freundlicherweise durch PD Dr. Peter Würfl der Chirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Leipzig zur Verfügung gestellt. Zusätzlich waren von jedem Patienten Blutproben verfügbar. Tumor- und Blutproben sind verschlüsselt und anonym in der Datenbank des Institutes für Pathologie der MLU Halle-Wittenberg chronologisch gespeichert. Die Kennzeichnung LZ68 entspricht somit der Tumorprobe Nr. 68 der chirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Leipzig.

2.2 Geräte und Verbrauchsmaterial

Sequi-Gen Gelkammersystem	Bio Rad, München
PTC-200 Thermal Cycler	Biozym
Trio Thermoblock mit Deckelheizung	Biometra, Göttingen
Imagemaster VDS	Amersham Pharmacia, Freiburg
Imagemaster VDS 3.0 Software	Amersham Pharmacia, Freiburg
Zellkulturflaschen	Greiner, Nürtingen

2.3 Chemikalien

Agarose	Serva, Heidelberg
Ampicillin	Serva, Heidelberg
5-Bromo-4-chloro-3-inolyl- β -D-galactosid (X-Gal)	Sigma, Deisenhofen
dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Promega, Heidelberg
EDTA	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
LB-Medium	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Luria Agar	Invitrogen, Groningen, Niederlande

β-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
MOPS	Serva, Heidelberg
Random-Primer	Promega, Heidelberg
Tris	Roth, Karlsruhe
Trypsin	Serva, Heidelberg
Tween 20	Serva, Heidelberg

2.4 Enzyme

SuperScript Reverse Transkriptase	Invitrogen, Eggenstein
HotStarTaq DNA-Polymerase	Qiagen, Hilden
DNA-Polymerase	Promega, Mannheim

2.5 Kits

RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
TOPO-TA Cloning Kit	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden

2.6 Plasmide

TOPO-TA, Invitrogen	Klonierungsvektor zur direkten Klonierung von PCR-Produkten
---------------------	--

2.7 Primer

Die in der Arbeit verwendeten Primer sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tab. 1: verwendete Primer und ihre Sequenzen

Name	Sequenz	Orientierung	Referenz
MDMX-1	5'-CGACTCATGGAGCTGCCGTA-3'	sense	diese Arbeit, 2003
MDMX-2	5'-CTCTGACAGTTGGAAATAA-3'	antisense	diese Arbeit, 2003
MDMX-3	5'-GCAGTTTCTTCACTACCA-3'	sense	diese Arbeit, 2003

Tab. 1 (Fortsetzung): verwendete Primer und ihre Sequenzen

Name	Sequenz	Orientierung	Referenz
MDMX-4	5'-TCGTA ^T ACTACCATTATGCT-3'	antisense	diese Arbeit, 2003
MDMX-5	5'-CCTTGAGGAAGGATTGGTATT-3'	sense	diese Arbeit, 2003
MDMX-7	5'-AAGACGATATCCCCACACTG-3'	sense	diese Arbeit, 2003
MDMX-8	5'-AGCCTAGATGTTTCATCTTG-3'	antisense	diese Arbeit, 2003
GAPDH-1	5'-CCAAGGTCATCCATGACAAC-3'	sense	Bartel <i>et al.</i> , 2001
GAPDH-2	5'-AGCTTGACAAAGTGGTCGTT-3'	antisense	Bartel <i>et al.</i> , 2001
Prot-1	5'-TCTCCTCAGTCCTAATGG-3'	sense	Bartel <i>et al.</i> , 2001
Prot-2	5'-AGACCCCAAGAAAGAAATGG-3'	antisense	Bartel <i>et al.</i> , 2001
ELF3(fw)	5'-GACTGGTGCTTCTCGGAGCTC	sense	Reifenberger <i>et al.</i> 2003
ELF3(rev)	5'-GTCCCAGTACTCTTTGCTCAGC-3'	antisense	Reifenberger <i>et al.</i> 2003
Ren(fw)	5'-GACAAACCTGAGCCTCTGTC-3'	sense	Reifenberger <i>et al.</i> 2003
Ren(rev)	5'-GTGGGTCAGGAGAGGCCTG-3'	antisense	Reifenberger <i>et al.</i> 2003
IFNG(fw)	5'-GCAGAGCCAAATTGTCTCC-3'	sense	Reifenberger <i>et al.</i> 2003
IFNG(rev)	5'-GTCTTCCTTGATGGTCTCC-3'	antisense	Reifenberger <i>et al.</i> 2003
GAC1(fw)	5'-AGACGGTTAGTGTGGTTGTGG-3'	sense	Reifenberger <i>et al.</i> 2003
Gac1(rev)	5'-GGGTAATGTTGTAGCTGTGGG-3'	antisense	Reifenberger <i>et al.</i> 2003
ELK4(fw)	5'-GAATCCAGCCGAGAACTGGC-3'	sense	Reifenberger <i>et al.</i> 2003
ELK4(rev)	5'-CTGTGTCGATGTCTGGGTGAG-3'	antisense	Reifenberger <i>et al.</i> 2003
HDCMD(fw)	5'-GGACTCGGCTCAATAGTTC-3'	sense	Reifenberger <i>et al.</i> 2003
HDCMD(rev)	5'-CATTCTCCCGAGAGTTAGGA-3'	antisense	Reifenberger <i>et al.</i> 2003
PIK3(fw)	5'-AGGCTACCTAGCAAGCAGTC-3'	sense	Reifenberger <i>et al.</i> 2003
PIK3(rev)	5'-GGTCAGCTGGTCTCTATGAA-3'	antisense	Reifenberger <i>et al.</i> 2003

3 Methoden

3.1 Zellkultivierung

Zur Anzucht von Zellkulturen wurden sterile Zellkulturflaschen (25 ml oder 250 ml) verwendet. Die Kultivierung erfolgte mit RPMI-1640 Medium bei 37°C, 5% (v/v) CO₂ und maximaler Luftfeuchtigkeit. Konfluent gewachsene Zellen wurden unter dem Mikroskop auf ihre Vitalität überprüft. Nach Absaugen des Mediums, erfolgte die Spülung der Zellen am Flaschenboden mit 4 ml PBS und anschließend mit Trypsin. Die Spüldauer betrug jeweils 3 min. Die Trypsinwirkung wurde durch FKS-haltiges Medium abgestoppt. Nach Abzentrifugation der Zellen wurden diese in frisches Nährmedium und in neue Flaschen umgesetzt.

3.2 Isolation von Nukleinsäuren

3.2.1 RNA-Isolation aus Patientenproben

Die Isolation der Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des RNeasy-Isolationskits der Fa. Qiagen nach Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Bis zur Bearbeitung erfolgte die Lagerung der Proben in Stickstoff. Es wurden jeweils 10 ca. 50 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt und direkt in 600 µl Lysepuffer aufgenommen. Anschließend erfolgte die Homogenisierung mit Hilfe von QIASHredder-Säulen. Die Isolation der RNA wurde dann durch Aufbringen des Homogenats auf die RNeasy-Spin-Säulen und anschließender Zentrifugation bei 10.000 U/min für 60 s durchgeführt. Zur Elution wurde RPE-Puffer verwendet. Die Lagerung der RNA erfolgte kurzfristig bei -20°C, langfristig bei -70°C, wobei ein häufiges Auftauen bzw. Einfrieren vermieden wurde.

3.2.2 Konzentrationsbestimmung

Zur Konzentrationsbestimmung wurden die RNA-Proben 1:50 verdünnt und im Spektralphotometer vermessen. Es wurde jeweils bei 260 nm und bei 280 nm die Extinktion bestimmt. Mit den so ermittelten Werten errechnete sich die Konzentration wie folgt:

1 OD_{260nm} entspricht 40 µg RNA/ml. Die Reinheit der Präparation ergibt sich aus dem Quotienten der OD_{260nm}/OD_{280nm} und liegt bei hoher Reinheit zwischen 1,8 und 2.

3.2.3 RNA-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der Integrität der gewonnenen RNA wurde eine Formaldehyd-gelelektrophorese durchgeführt. Vor dem Auftragen der Proben wurden diese 10 min bei 65°C in RNA-Probenpuffer denaturiert, auf Eis gestellt und durch Elektrophorese in 1X MOPS-Puffer bei 90 V für ca. 20 min aufgetrennt.

10 x MOPS	10 mM	EDTA
	50 mM	Natriumacetat
	200 mM	MOPS (pH 7,0)
RNA-Probenpuffer	720 µl	Formaldehyd
	260 µl	Formaldehyd (3%, w/v)
	160 µl	10xMOPS
	80 µl	Glycerol
	80 µl	Bromphenolblau
	100 µl	Ethidiumbromid (10µg/ml)
	100 µl	Aqua bidest.

3.2.4 Isolation von genomischer DNA aus Paraffinmaterial

Zur Isolation genomischer DNA wurde eine modifizierte Methode nach Wright und Manos (1990) sowie Lahiri und Nurnberger (1991) genutzt.

- 3-5 ca. 20 µm dicke Paraffinschnitte in 1 ml Xylol aufnehmen
- 30 min bei Raumtemperatur inkubieren
- 5 min bei 12.000 U/min zentrifugieren, den Überstand verwerfen
- Schritte 1 bis 3 wiederholen
- zweimal mit 1 ml Ethanol waschen und jeweils 5 min bei 12.000 U/min zentrifugieren, anschließend das Pellet trocknen
- Pellet über Nacht mit 400 µl Verdau-Puffer bei 37°C inkubieren
- Inkubation für 10 min bei 95°C (Heizblock oder Wasserbad)
- Zentrifugation für 30 s, den Überstand auf zwei 1,5-ml Reaktionsgefäße verteilen, jeweils 400 µl Salzpuffer und 12,5 µl SDS (20%, w/v) zugeben und mischen
- Inkubation für 10 min bei 55°C, anschließend abkühlen
- Zugabe von 150 µl 6M NaCl, gut mischen

- für 5 min bei 12.000 U/min zentrifugieren (4°C)
- den Überstand in ein neues Reaktionsgefäß geben
- gleiches Volumen Isopropanol hinzugeben
- Fällung der DNA bei – 20°C über Nacht
- für 5 min bei 12.000 U/min zentrifugieren (4°C), Überstand verwerfen
- DNA-Pellet mit eiskaltem 70%igem Ethanol waschen, trocknen und in 50 µl Aqua bidest. aufnehmen

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung erfolgte wie unter 3.2.2 beschrieben. 1 OD_{260nm} entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA.

Zusammensetzung der Puffer:

Verdaupuffer:	50 mM	Tris-HCl (pH 8,5)
	1 mM	EDTA
	0,5 %	Tween 20
	200 µg/ml	Proteinase K
Salzpuffer:	10 mM	Tris-HCl (pH 7,6)
	10 mM	KCl
	10 mM	MgCl ₂
	0,4 M	NaCl
	2 mM	EDTA

3.2.5 Isolation genomischer DNA aus peripherem Blut

Die Isolation genomischer DNA aus peripherem Blutlymphozyten erfolgte nach einer Methode von Miller *et al.* (1988). Die frisch gewonnenen EDTA-Blutproben stammen von gesunden Spendern bzw. von Tumorpatienten. Die Blut-DNA der gesunden Spender diente z.B. bei der PCR und Sequenzierung als Kontroll-DNA. Die Lymphozyten-DNA der Tumorpatienten wurden als Referenz-DNA bei Untersuchungen zur Genamplifikation eingesetzt.

Ablauf:

- 10 ml EDTA-Blut in ein 50 ml Falcon-Röhrchen geben
- mit 40 ml 4°C kaltem Triton-Lyse-Puffer auffüllen und schwenken
- Inkubation für 15 min im Eisbad, dabei das Röhrchen schwenken

- Zentrifugation für 10 min bei 2300 U/min, Überstand abnehmen
- Pellet 2-3 mal mit 95%iger NaCl-Lösung waschen
- zum Pellet 3 ml Kern-Lysepuffer, 25 µl Puffer A und 115 µl 20%iges SDS (w/v) hinzugeben
- schütteln bis die Lösung klar ist (1 h bei 50°C)
- 1 ml 6 M NaCl hinzugeben, 15 s kräftig schütteln
- Zentrifugation bei 4500 U/min, 4°C für 15 min, Wiederholung bis der Überstand klar ist
- DNA-Fällung durch Zugabe von 2 Vol. kaltem 96%igem Ethanol
- DNA in 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 70%igem Ethanol überführen
- bei 12.000 U/min, 4°C für 15 min zentrifugieren
- vakuumgetrocknetes Pellet in Aqua bidest. aufnehmen
- Konzentration und Reinheit, wie unter 3.2.2 beschrieben, bestimmen

Triton-Lysepuffer:	0,32 M	Saccharose
	5 mM	MgCl ₂ x H ₂ O
	10 mM	Tris (pH 7,5)
	1 %	Triton X-100
	0,4 M	NaCl
	3 mM	Proteinase A
Puffer A (pH 7,5)	0,1 M	NaCl
	50 mM	Tris-HCl-NaCl
	5 mM	EDTA (pH 8,0)
	20 mg	Proteinase K

3.2.6 Isolation von Plasmid-DNA

Bakterien-Einzelkolonien von einer Agarplatte wurden in 5 ml LB-Medium mit Ampicillinzusatz (50 µg/ml) über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Jeweils 3 ml einer Kultur wurden bei 5000 U/min abzentrifugiert und die Plasmid-DNA nach Herstellerangaben mit dem Endotoxin Free Plasmid Mini Kit der Fa. Qiagen isoliert. Die Integrität der isolierten Plasmide wurde mittels Spaltung durch geeignete Restriktionsenzyme und anschließende Gelelektrophorese überprüft.

3.2.7 Maxi- und Megapräparation

100 ml LB-Medium (500 ml bei Megapräparation) mit Antibiotikazusatz (50 µg/ml Ampicillin) wurden mit 1 ml bzw. 5 ml der gewonnenen Übernachtskultur geimpft und bei 37°C im Schüttelinkubator (200 rpm) für mindestens 12 h inkubiert. Der bakterielle Extrakt wurde gewonnen, die Plasmid-DNA mit dem Endotoxin Free Plasmid Maxi Kit (Qiagen) isoliert und in endotoxinfreiem Wasser gelöst.

3.3 RT-PCR und Polymerasekettenreaktion

3.3.1 Reverse Transkription

Um die Expression der gesuchten mRNA in den Tumorproben nachzuweisen, erfolgte zunächst die Umschreibung der mRNA in cDNA mittels Zufallsprimern (Random Hexamer Primers, Invitrogen) in einem Trio Thermoblock (Thermocycler) der Fa. Biometra. Die Synthese der cDNA wurde mit Hilfe des Superscript II Kits durchgeführt. Zunächst wurden je Ansatz 1 µg RNA, 11 µl Aqua bidest. und 150 ng Randomprimer gemischt und 10 min bei 70°C denaturiert. Anschließend wurden auf Eis 9 µl eines RT-Mastermix hinzugegeben (s.u.). Zur Primeranlagerung wurde der Ansatz für 10 min bei 20°C inkubiert. Die cDNA-Synthese erfolgte bei 42°C für 90 min und die Denaturierung für 2 min bei 95°C. Die gewonnene cDNA wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C aufbewahrt.

Zusammensetzung des cDNA-Mastermix (für eine Probe)

5 X Reaktionspuffer	4 µl
DTT	2 µl
dNTP-Mix	2 µl
Superscript	1 µl

3.3.2 Polymerasekettenreaktion

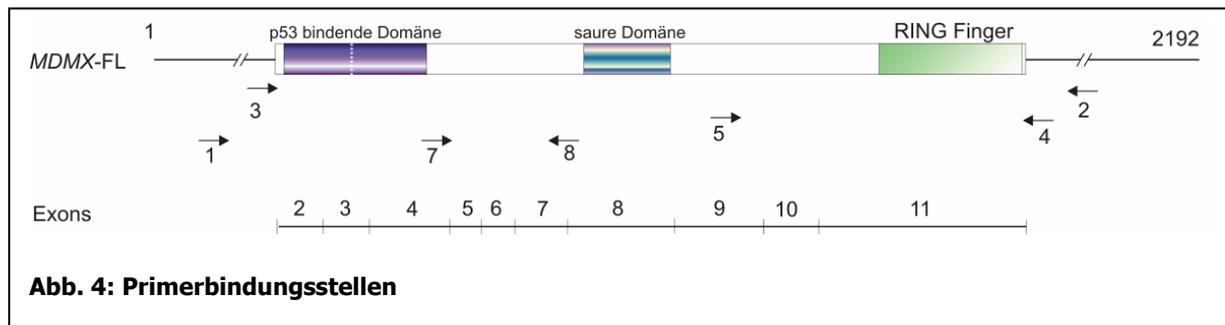
Die cDNA wurde mittels „nested“-PCR auf spezifische *HDMX*-Transkripte untersucht. Zunächst erfolgte in einer ersten PCR die Amplifikation der cDNA mit speziellen Primerpaaren (MDMX 1 und 2) anschließend wurden innere Primerpaare (MDMX 3 und 4 bzw. MDMX 3 und 8) für die so genannte „nested“-PCR verwendet (Abb. 4). Die erhaltenen Produkte wurden im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und analysiert.

Zusammensetzung eines 50 µl-Ansatzes:

Reaktionspuffer (10x)	5 µl
MgCl ₂ (1,5 mM)	3 µl
Nukleotide (10 mM)	4 µl
HotStarTaq (2 units)	0,5 µl
Q-Solution (5x)	10 µl
Primer sense (20 pmol/µl)	1 µl
Primer antisense (20 pmol/µl)	1 µl
Aqua bidest.	0,5 µl
cDNA	2µl

Reaktionsablauf:

1.	15:00	95°C	Denaturierung, Aktivierung der Polymerase
2.	00:30	55°C	Primer-Anlagerung
3.	04:30	72°C	Synthese
4.	00:30	95°C	Denaturierung
5.	10:00	72°C	abschließende Synthese
6.	∞	4 °C	



Um die cDNA auf spezifische HDMX-Transkripte untersuchen zu können, wurden so genannte „nested-PCR“ durchgeführt. Hierbei kamen spezielle Primer (Nukleotidsequenzen) zum Einsatz. Primer dienen als Startpunkt für DNA-replizierende Enzyme, wie der DNA-Polymerase. Sie greifen an bestimmten Bereichen (Exons) des der mRNA (hier: MDMX-FL) an und bestimmen damit den speziellen DNA-Abschnitt der amplifiziert wird. Die Nukleotidsequenzen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, flankieren die gesuchten DNA-Abschnitte (ca. 18-30 Nukleotide). Zunächst kamen die Primerpaare MDMX-1 und MDMX-2 zum Einsatz, anschließend die inneren Primer MDMX-3 und MDMX-4 bzw. MDMX-3 und MDMX-8.

3.3.3 Multiplex-PCR

Zur Ermittlung des Amplifikationsstatus des *HDMX*-Gens wurden Tumor- und Blutproben mittels Multiplex-PCR untersucht. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes ist unter 3.3 aufgeführt. Um die relative Intensität der Banden für das *HDMX*-Gen bestimmen zu können, wurde neben den HDMX-Primern zusätzlich Primer für das Prothrombin-Gen verwendet.

Dieses Gen liegt als „single-copy“-Gen vor und dient als Referenz für die Bestimmung der Amplifikation des *HDMX*-Gens. Nach Auftrennung der Banden im Agarose-Gel (2%) wurde deren Intensität densitometrisch bestimmt. Eine Tumorprobe wurde als amplifiziert für das *HDMX*-Gen eingestuft, wenn das Verhältnis *HDMX*/Prothrombin 4-fach grösser war als im Normalgewebe des jeweiligen Patienten.

3.3.4 Gelelektrophorese

Die Analyse der PCR-Produkte erfolgt durch die elektrophoretische Auftrennung. Das verwendete Gel wurde aus 100 ml 0,5 X TBE-Puffer, 5 µl Ethidiumbromidstammlösung (10 mg/l) und, je nach gewünschter Gelkonzentration, 1 bis 2 g Agarosepulver hergestellt. Die Elektrophorese wurde in Gelkammern der Fa. Bioplex mit 0,5 X TBE-Laufpuffer durchgeführt. Anschließend wurden 5 µl des PCR-Produktes mit 1 µl 10 X Bromphenolblau gemischt, auf das Gel aufgetragen und bei 70 V 1-2 h aufgetrennt. Die Banden wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht, photographiert, dokumentiert und die DNA-Fragmentgrößen bestimmt.

3.3.5 DNA-Isolation aus Agarose-Gelen

Zur Isolation bestimmter PCR-Produkte aus Agarosegelen wurden nach der elektrophoretischen Auftrennung die gewünschten Banden mit einem Einweg-Skalpell ausgeschnitten und auf Reaktionsröhrchen verteilt, mit 600 µl Puffer versetzt (Solubilization-QX) und 10 min im Thermoblock bei 50°C inkubiert. Anschließend wurde das gelöste Gel auf QIA-Quick-Säulen mit DNA-Filter gegeben und 1 min bei 11.000 U/min zentrifugiert. Es erfolgten weitere Waschschrirte nach dem Protokoll des Herstellers. Anschließend wurde die DNA mit 50 µl 10 mM Tris (pH 8,5) und Zentrifugation für 1 min bei 11.000 U/min von der Säule eluiert.

3.3.6 Gellauf PAGE

Zur Analyse bestimmter PCR-Produkte erfolgte die Auftrennung in einem 6,7- bzw. 8%igem Polyacrylamidgel mit anschließender Silberfärbung. Alle verwendeten Gelkammerbestandteile wurden mit 70%igem Ethanol gereinigt. Vor dem Gießen wurden 80 ml entgaste Gellösung mit 10%igem APS (w/v) und 3 ml 10%igem TEMED (v/v) gemischt. Nach der Polymerisation des Gels (ca. 1h) erfolgte zum Erhitzen des Gels auf 50°C ein Vorlauf bei 100 Watt. Die mit Isopropanol gefällten PCR-Produkte wurden in Probenpuffer

aufgenommen und unmittelbar vor dem Auftragen durch Erhitzen denaturiert. Die Gellaufzeit richtet sich nach der Länge des untersuchten PCR-Produktes und erfolgte bei 80 Watt und einer Geltemperatur von 50°C.

Gellösung:

<u>8%ig</u>	<u>6,7%ig</u>
113,4 g Harnstoff	113,4 g
108 ml Aqua bidest.	117 ml
27 ml 10 x TBE	27 ml
53,8 ml Acrylamid/Bisacrylamid (29/1) 30%ig	45 ml

Auftragspuffer:

10 ml	Formamid
10 mg	Xylencyanol FF
10 mg	Bromphenolblau
200 µl	0,5 M EDTA (pH 8,0)

3.3.7 Silberfärbung

Nach dem Gellauf wurde die Pufferkammer von der Glasplatte gelöst. Auf die Glasplatte wurde ein Färberahmen gespannt und die Banden mittels Silberfärbung sichtbar gemacht.

- Gelspülung mit Aqua bidest.
- 5 min mit 10%igem Ethanol spülen
- 3 min mit 1%iger Salpetersäure inkubieren, Spülung mit Aqua bidest
- 10 min Färbung mit 0,2%igem AgNO₃, Spülung mit Aqua bidest.
- Entwicklung mit Natriumcarbonat-Formalin-Lösungskit
- 2 min mit 10%iger Essigsäure und anschließend 2 min mit Aqua bidest. spülen
- getrocknetes Gel für 1 h bei 80°C unter Vakuum komplett trocknen

3.3.8 Klonierung von DNA-Fragmenten

Je 4 µl der PCR-Produkte wurden mit 1 µl Salt Solution, 1 µl 2.1 TOPO-Vektor (beides aus dem TOPO-TA-Cloning-Kit) versetzt und bei Raumtemperatur 5 min inkubiert. E.Coli-Zellen (TOP 10) wurden mit 3 µl des Ligationsansatzes transformiert und für 15 min auf Eis gelegt. Nach 45 s Hitzeschock bei 42°C erfolgte eine Abkühlung auf Eis für 2 min. Anschließend

wurden 250 µl S.O.C.-Medium des TOPO-TA-Cloning-Kits hinzugegeben und die Lösung bei 37°C für eine Stunde unter leichtem Schütteln (200 U/min) inkubiert. Je 25 µl und 100 µl der Bakteriensuspension wurden auf Agar ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die verwendeten Agar-Platten enthielten X-Gal und IPTG für die Blau-Weiß-Selektion, sowie Ampicillin. Positive Transformanden (weiße Kolonien) wurden gepickt und selektiert.

Zur Selektion wurde ein Teil der weißen Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und mittels Kolonie-PCR analysiert (Ansatz siehe 3.3.) Die PCR-Produkte wurden auf ein Agarosegel aufgetragen, elektrophoretisch getrennt und analysiert.

3.3.9 Sequenzierung

Zur Sequenzierung der DNA wurden der Big Dye Terminator 1.1-Mix der Firma ABI verwendet. Die Sequenzierung verlief nach dem Prinzip des Cycle Sequencing. Der Sequenzierungsansatz enthielt 2 µl Reaktionsgemisch und 6 µl Reaktionspuffer, 3,2 pmol des spezifischen Primers, 250 ng Plasmid-DNA oder 100 ng gereinigtes PCR-Produkt in einem Reaktionsvolumen von 20 µl. Folgendes Temperaturprofil wurde 25 x wiederholt: 96°C für 30 s zur Denaturierung, 55°C für 30 s zur Primeranlagerung, 4 min 60°C zur Synthese. Die DNA wurde durch Zugabe von 2 µl 1,5 M Na-Acetat, 250 mM EDTA-Lösung (Kit-Komponente) und 60 µl EtOH (96%) gefällt und durch Zentrifugation (15.000 U/min für 30 min) pelletiert. Abschließend erfolgte ein Waschschriff mit 70%igem Ethanol und anschließender Trocknung. Die Analyse erfolgte in einem ABI Prism 373 DNA-Sequencer (Applied Biosystem).

3.10 Statistische Auswertung

Alle statistischen Berechnungen, einschließlich der Kaplan-Meier-Analyse, sowie der Cox-Regression, wurden mit der SPSS 11.0-Software (SPSS-Science, Chicago, USA) durchgeführt. Eine Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als signifikant eingestuft.

4 Ergebnisse

4.1 *HDMX*-Amplifikationsstatus in Weichteilsarkomen

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die molekulare Charakterisierung des *HDMX*-Gens in Weichteilsarkomproben. Es wurde der Einfluss der mRNA-Expression und des Amplifikationsstatus des *HDMX*-Gens auf die Prognose der an Weichteilsarkomen erkrankten Patienten untersucht. Die Ermittlung des *HDMX*-Genstatus in den Tumorproben erfolgte mittels Multiplex-PCR. Im Vorfeld der Untersuchung wurden die Annealingtemperatur, die Reaktionszeit sowie die notwendige Zyklenanzahl optimiert.

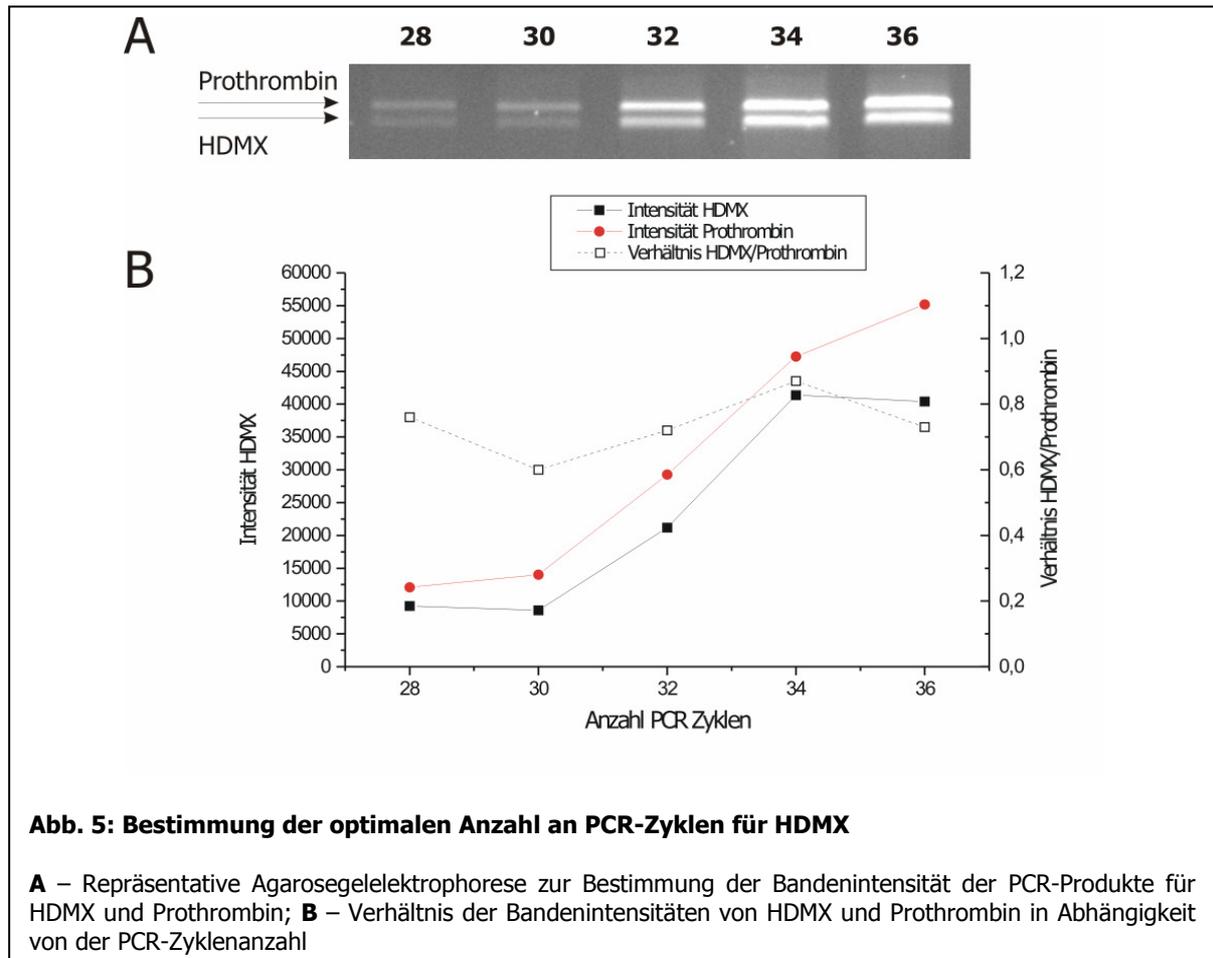
4.1.1 Auswahl der Primer

Neben der Amplifikation des *HDMX*-Gens mit den Primern HDMX-5 und HDMX-2 wurde ein sogenanntes „Single-copy“-Gen untersucht. Es handelt sich dabei um das Prothrombin-Gen, das auf dem Chromosom 11p11.2 lokalisiert ist. Dieses ist in WTS vergleichsweise selten amplifiziert. Für die Analyse dieses Gens mittels PCR wurden die Primer Prothrombin-1 und Prothrombin-2 verwendet.

4.1.2 Optimierung der Reaktionsbedingungen für die Multiplex-PCR

Um bestmögliche PCR-Produkte zu erhalten, wurden zunächst die Reaktionsbedingungen optimiert. Dazu wurde die DNA aus Fibroblasten und der Zelllinie Saos-2 verwendet, da das Tumormaterial nur in begrenztem Umfang zur Verfügung stand. Mit Hilfe eines Temperaturgradienten zwischen 55°C und 65°C konnte die optimale Annealingtemperatur für die *HDMX*- und Prothrombinprimer ermittelt werden. Anschließend erfolgte das Auftragen der PCR-Produkte auf ein 2%iges Agarosegel. Die Auswertung der Bandenintensitäten ergab eine optimale Reaktionstemperatur bei 58°C (Daten nicht gezeigt).

Während der PCR wird die gesuchte DNA-Sequenz exponentiell in jedem Zyklus vermehrt. Nach Verbrauch der Reaktionskomponenten tritt eine Sättigungsphase ein, in der keine weitere DNA synthetisiert wird. Aus diesem Grunde musste eine Zyklenanzahl ermittelt werden, bei der sich die DNA-Synthese noch in der exponentiellen Phase befindet. Es wurden je 12 Reaktionsgemische mit den Primern für HDMX-5 und HDMX-2, 12 mit den Primern für Prothrombin-1 und Prothrombin-2, sowie 12 weitere mit beiden Primerpaaren hergestellt. Jeweils 6 Ansätze wurden mit 20 ng DNA der Fibroblasten- Zelllinie und weitere 6 mit 20 ng DNA der Zelllinie Saos-2 versetzt. Je eines der 6 Reaktionsgemische durchlief die PCR bei 15, 20, 25, 30, 35 und 40 Zyklen. Die Auswertung der Banden ergab, dass sich die

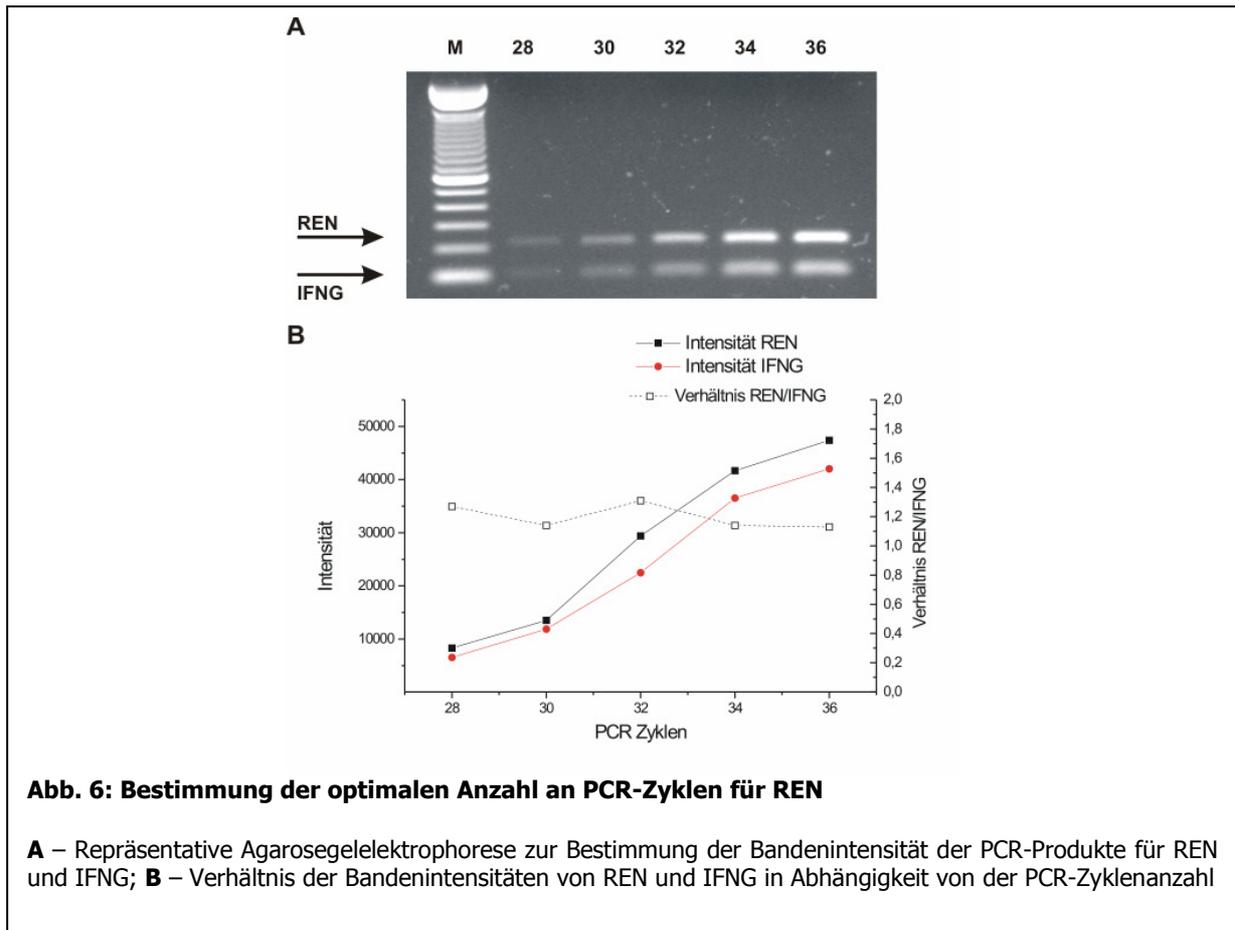


DNA-Synthese bei 30 Zyklen in der exponentiellen Phase befand und somit eine semiquantitative Analyse möglich wurde. Die auf dem Agarosegel sichtbare Bandenintensität des *HDMX*- und Prothrombin-PCR-Produktes zeigt die Abb. 5A. Die Bandenintensität des *HDMX* bzw. des Prothrombins in Abhängigkeit von der gewählten PCR-Zyklusanzahl, ist in der Abb. 5B graphisch dargestellt.

Nach diesem Verfahren wurde auch die optimale Zyklusanzahl für die PCR zur Untersuchung benachbarter Genloci ermittelt (*REN*, *ELK4*, *GAC1*, *HDCMD3*, *PIK3*, *ELF3*). Hierbei durchlief die PCR 28, 30, 32, 34 und 36 Zyklen.

Eine optimale DNA-Synthese wurde mit 30 Zyklen erreicht. Wie in Kap. 3.3.2. beschrieben, wurde ein PCR-Mastermix hergestellt. Zur Reaktionskontrolle wurden Primer für das Interferon-Gen (IFNG) eingesetzt.

Jeweils eine Probe durchlief die PCR mit 28, 30, 32, 34, 36 Zyklen. Die DNA-Synthese befand sich bei 32 Zyklen in der exponentiellen Phase. Die Bandenintensitäten des *REN* und *IFNG* im Agarosegel zeigt die Abb. 6A.



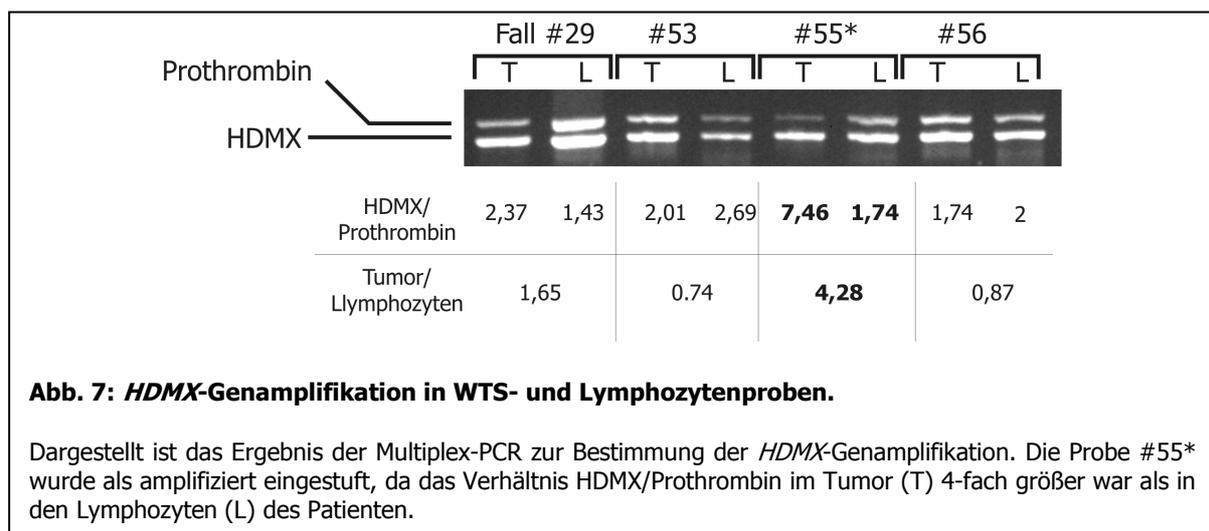
Die Intensitäten der Banden für REN und IFNG in Abhängigkeit von der Anzahl der durchlaufenen Zyklen bzw. deren Verhältnis zueinander sind in Abb. 6B graphisch dargestellt.

4.1.3 Auswahl der Tumor- und Blutproben

Zur Ermittlung des Amplifikationsstatus des *HDMX*-Gens standen 66 Tumorproben, sowie die Referenz-DNA aus Lymphozyten des peripheren Blutes der jeweiligen zur Verfügung. Es wurden insgesamt 18 Liposarkome (7 gut differenzierte, 8 myxoide, 1 rundzelliges, 1 pleomorphes, 1 undifferenziertes), 14 MFH (11 pleomorphe, 2 myxoide, 1 Riesenzell-MFH), 14 Rhabdomyosarkome (9 embryonale, 5 alveoläre), 6 Synovialsarkome (2 monophasig, 4 eiphasig), 5 neurogene Sarkome (4 maligne Schwannome, 1 Neuroepitheliom), 4 Leiomyosarkome, 3 andere Sarkome (2 maligne Hämangio-perizytome, 1 malignes epitheliales Mesotheliom) und 2 Fibrosarkome untersucht. Die Tumorproben wurden nach dem van Unnik-Grading-System (van Unnik *et al.* 1993) und nach dem Grading-System der UICC (Wittekind und Wagner 1997) klassifiziert.

4.1.4 Bestimmung des *HDMX*-Amplifikationsstatus

Wie in Kap. 4.1.1 beschrieben, wurden zur Analyse der *HDMX*-Genamplifikation jeweils 20 ng genomische DNA aus dem Tumor und, soweit verfügbar, 20 ng DNA aus Lymphozyten von WTS-Patienten mit *HDMX*-, *IFNG*- oder Prothrombin-Primern amplifiziert. Die PCR-Produkte konnten mittels Gelelektrophorese qualitativ nachgewiesen werden. Mit Hilfe des Computerprogramms Imagemaster 3.0 wurden die Intensitäten der *HDMX*- sowie der Prothrombin-Bande der Tumorproben bzw. der Blutproben densitometrisch bestimmt. Eine Probe wurde als amplifiziert eingestuft, wenn das Verhältnis der Intensität der *HDMX*-Bande im Vergleich zur Prothrombin-Bande im Tumor des Patienten mindestens 4-fach größer war als in der dazugehörigen Blutprobe. Es konnte in 17% (11 von 66) der Proben eine Amplifikation des *HDMX*-Gens detektiert werden. Die Auswertung der Bandenintensitäten ergab eine 3- bis 9-fach höhere Intensität der *HDMX*-Bande im Vergleich zur Bande der jeweiligen Patientenblutprobe. Die höchste *HDMX*-Genamplifikationsfrequenz konnte in den Leiomyosarkomproben (4 von 14, 28%, Tabelle 2) nachgewiesen werden. In 17% (3 von 18) der Liposarkome (3 von 18, 17%) und in nur 7% (1 von 14) der MFH bzw. Rhabdomyosarkome konnte eine *HDMX*-Amplifikation detektiert werden. Fibrosarkome, neurogene- und synoviale Sarkome zeigten keine Amplifikation des *HDMX*-Gens. Abb. 7 stellt die Bandenintensitäten für Prothrombin und *HDMX* an ausgewählten Tumorproben und Lymphozyten aus dem peripheren Blut der Patienten im Vergleich dar.



4.1.5 Korrelation der *HDMX*-Genamplifikation mit klinischen Daten

Die Analyse der *HDMX*-Genamplifikationen, in Verbindung mit dem Tumorgrad der jeweiligen WTS-Probe, ergab keine signifikanten Zusammenhänge. In Grad I-Tumoren wurde

kein amplifiziertes *HDMX*-Gen nachgewiesen. In 21% der Grad II- (7 von 32) bzw. 18% der Grad III-Tumoren (4 von 22) konnte eine *HDMX*-Amplifikation ermittelt werden ($p = 0,92$, log-Rank-Test, Tabelle 2). Das Tumorstadium korrelierte mit der *HDMX*-Genamplifikation. In Tumoren des Stadiums I wurde keine, im Stadium II in 4 von 30 WTS (13%), im Stadium III in 3 von 19 (16%) und im Stadium IV in 4 von 7 WTS (57%) eine Amplifikation des *HDMX*-Gens nachgewiesen ($p = 0,015$, log-Rank-Test, Tabelle 2). Von 51 der 66 untersuchten Tumorproben war der p53-Status bekannt. Die *HDMX*-Amplifikation korrelierte nicht mit dem p53-Genstatus. Von diesen 51 Proben trugen wiederum 33 das wt-p53-Gen, von denen 7 (21%) ein amplifiziertes *HDMX*-Gen aufwiesen. In 18 weiteren Proben lag eine p53-Mutation vor, in 3 dieser Proben (16%) lag das *HDMX*-Gen amplifiziert vor. Geschlechtsspezifische Unterschiede waren nicht erkennbar. 5 von insgesamt 29 (16%) untersuchten männlichen Patienten und 6 von 37 (17,2%) untersuchten weiblichen Patienten waren positiv für ein amplifiziertes *HDMX*-Gen.

4.1.6 Einfluss der *HDMX*-Amplifikation auf das Gesamtüberleben

In der Kaplan-Meier-Analyse zeigte sich, dass das Auftreten einer *HDMX*-Amplifikation mit einer deutlich verkürzten Überlebenszeit korrelierte ($p = 0,0004$, log-Rank Test). Die durchschnittliche Überlebensrate für Patienten mit einer *HDMX*-Amplifikation betrug 25 Monate (5-Jahres-Überlebensrate, 15%, $p = 0,0004$, log-Rank Test) und für Patienten ohne

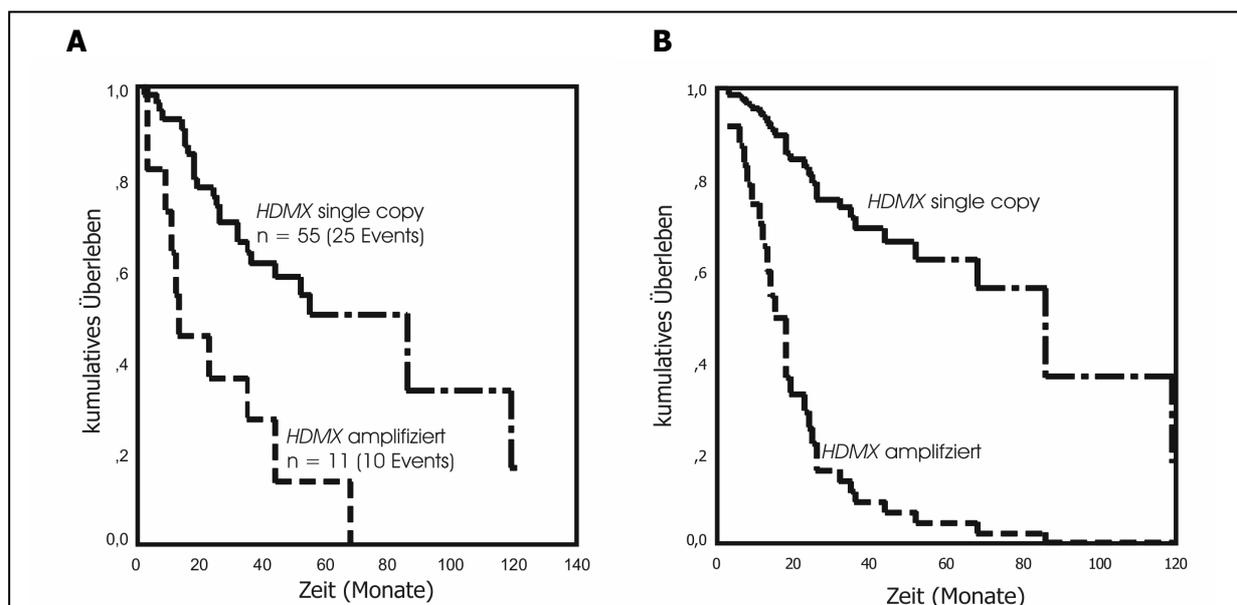


Abb. 8: Klinische Bedeutung der *HDMX*-Amplifikation für WTS-Patienten

A – In der Kaplan-Meier-Analyse zeigt sich deutlich, dass die *HDMX*-Genamplifikation mit einem signifikant verkürztem Gesamtüberleben von WTS-Patienten korreliert; **B** – Die multivariate Cox-Regressionsanalyse wurde nach Tumorgrad, -stadium und p53-Mutationsstatus adjustiert. Das Risiko am Tumor zu versterben ist, ist für Patienten mit *HDMX*-Amplifikation 6,5-fach erhöht.

ein amplifiziertes *HDMX*-Gen 68 Monate (5-Jahres-Überlebensrate, 50%). Den Zusammenhang zwischen *HDMX*-Amplifikation und Überlebenszeit zeigt die Abb. 8A.

Die multivariate Cox-Regressionsanalyse wurde adjustiert nach *HDMX*-Amplifikation, Tumorgrad, Tumorstadium und p53-Mutationsstatus. Es zeigte sich, dass das Risiko an einem Tumor zu versterben für Patienten mit einer *HDMX*-Amplifikation 6,5-fach höher ist, als für Patienten, deren Tumor keine *HDMX*-Amplifikation aufweist ($p < 0,0001$). Die Cox-Regressionsanalyse ist in Abb. 8B graphisch dargestellt.

4.1.7 Untersuchung benachbarter Genloci

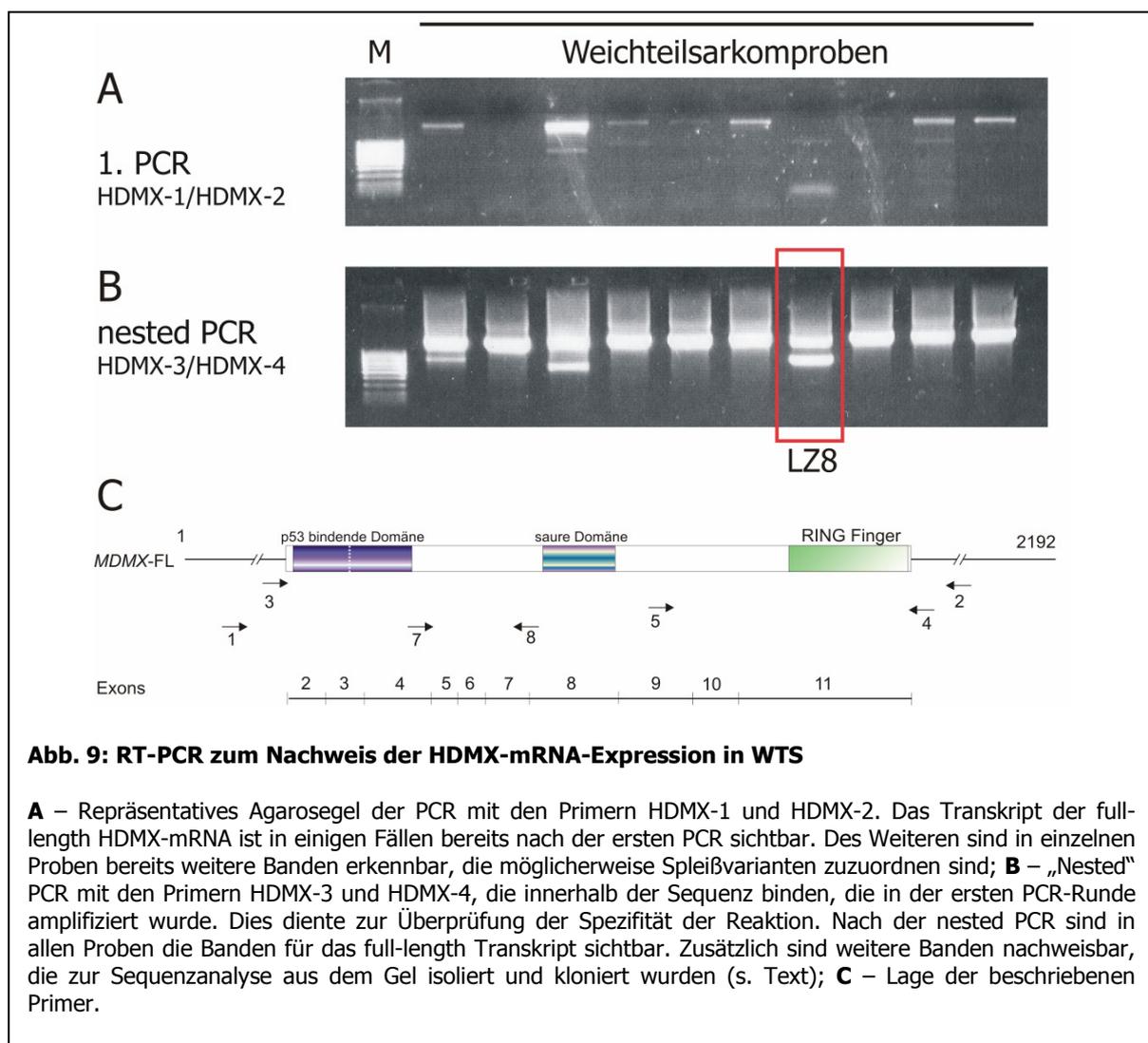
Im Rahmen der Forschungen am *HDMX*-Gen wurde auch der Amplifikationsstatus benachbarter Genloci (*REN*, *GAC*, *PIK*, *ELK4*, *HDCMD*, *ELF3*) untersucht. Die Auswahl der Gene erfolgte nach ihrer Lage zum *HDMX*-Gen. Ziel war es, sowohl distal als auch proximal flankierende Gene zu untersuchen. In die Untersuchung wurden nur die Proben einbezogen, bei denen eine *HDMX*-Genamplifikation nachgewiesen werden konnte. Weitere 5 Proben ohne *HDMX*-Genamplifikation dienten als Kontrolle.

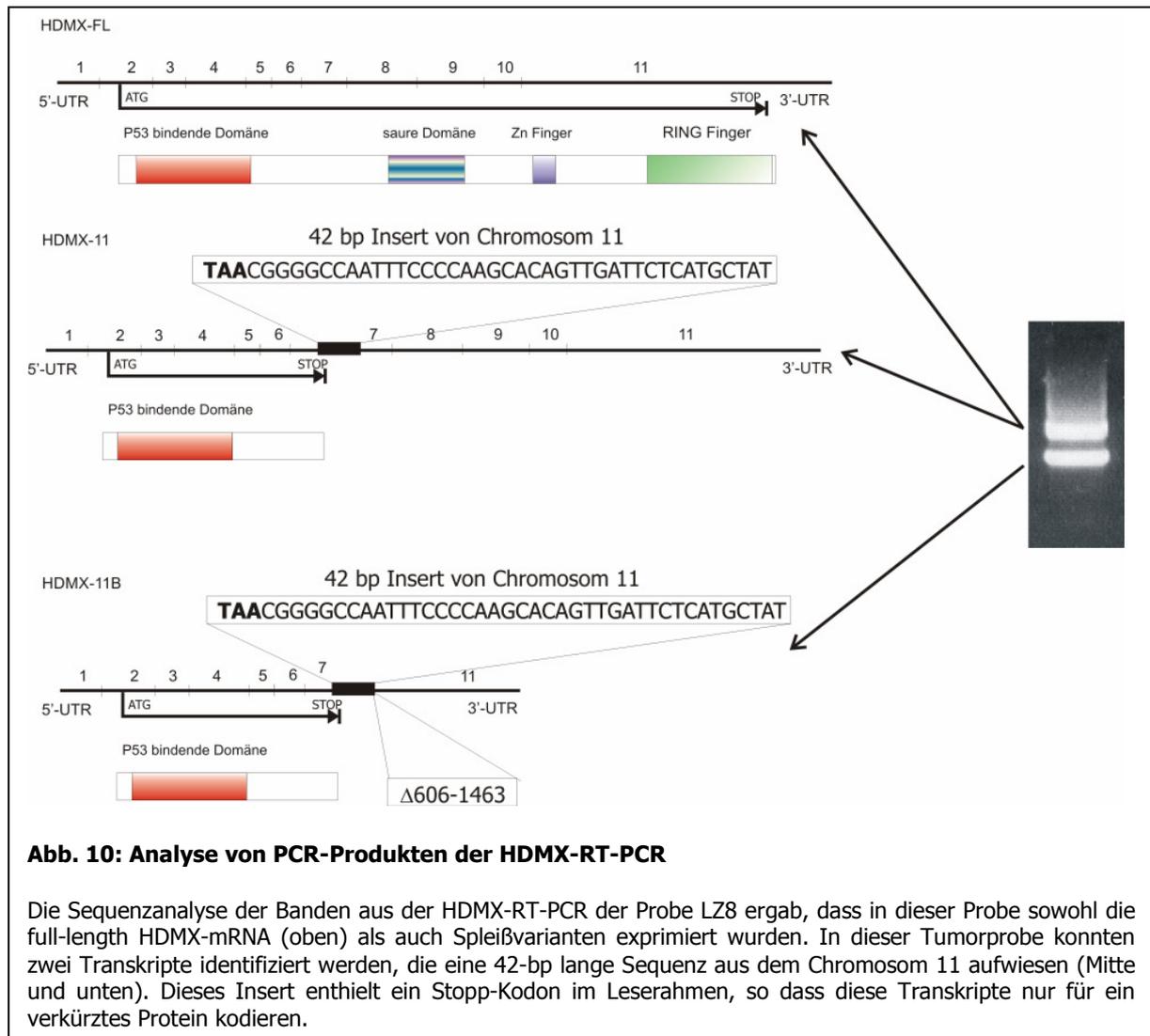
Mit Hilfe der Untersuchung des Amplifikationsstatus benachbarter Genloci konnte ermittelt werden, dass auf den untersuchten DNA-Abschnitten das *HDMX*-Gen am häufigsten amplifiziert vorlag. Die Analyse der distal von *HDMX* gelegenen Genloci ergab eine Genamplifikation des *GAC1*-Gens in 4 von 10 sowie des *HDCMD*- und *ELF3*-Gens in 3 von 10 Tumorproben. Die proximal von *HDMX* lokalisierten Gene *PIK3* und *REN* lagen in keiner der 10 untersuchten Proben amplifiziert vor. Ein dem *HDMX*-Gen direkt benachbartes Gen, das *ELK4*, war in 3 von 10 Proben amplifiziert. In der Tumorprobe LZ55 war die Amplifikation der Gene *HDMX*, *GAC1*, *HDCMD* und *ELF3* am deutlichsten. Die Tumorprobe LZ79 zeigte eine Amplifikation der am weitesten distal bzw. proximal gelegenen Gene (*ELF3*, *ELK4*). An 5 Tumoren ohne *HDMX*-Genamplifikation wurde eine Kontrollreaktion durchgeführt. Keines der benachbarten Gene lag amplifiziert vor (Daten nicht gezeigt).

4.2 *HDMX*-mRNA-Expressionsanalysen

4.2.1 Nachweis der *HDMX*-Expression in Tumorproben

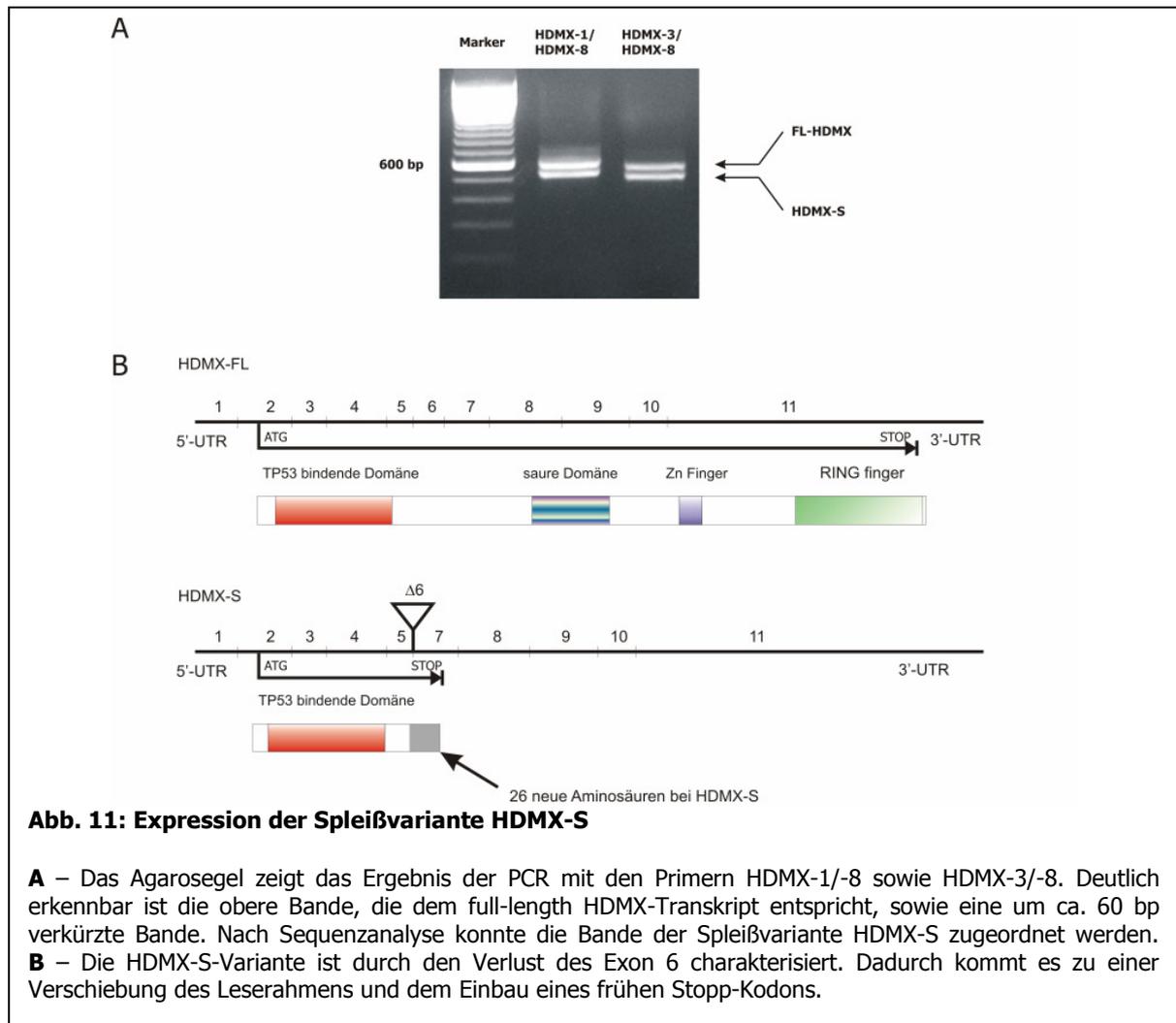
Für die Analyse der *HDMX*-mRNA-Expression standen 57 Tumorproben und patientenfremdes Normalgewebe zur Verfügung aus denen die Gesamt-RNA isoliert und mittels RT-PCR untersucht wurde. Die Umschreibung der Gesamt-RNA in cDNA erfolgte mit Zufallsprimern. Für den Nachweis der *HDMX*-Transkripte in Tumoren wurde zunächst für zufällig ausgewählte Proben eine PCR mit den Primern HDMX-1 und HDMX-2 durchgeführt (Abb. 9A). Diese Primer binden im 5'- bzw. 3'- untranslatiertem Bereich der *HDMX*-mRNA. Dadurch ist es auch möglich, Spleißvarianten der *HDMX*-mRNA nachzuweisen. Nach 35 Amplifikationszyklen zeigte sich, dass in 6 von 10 Proben eine Bande für die Full-length-mRNA detektierbar war. In einigen Fällen waren auch zusätzliche Banden im Agarosegel sichtbar. Diese Produkte sind eventuell alternativen Spleißprodukten zuzuordnen. Um die Spezifität der Banden der ersten PCR zu verifizieren, wurde eine so genannte „nested“-PCR





mit den Primern HDMX-3 und HDMX-4 durchgeführt (Abb. 9B). Die Bindungsstellen dieser inneren Primer überlappen nicht mit denen der äußeren Primer HDMX-1 und HDMX-2 aus der vorangegangenen PCR (Abb. 9C).

Die PCR-Produkte der nested-PCR wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend zur Isolation ausgeschnitten. Es erfolgte die Klonierung der DNA-Fragmente in den TOPO-TA-Vektor und die anschließende Sequenzierung der DNA. Es konnte das full-length-HDMX (FL-HDMX) nachgewiesen werden. Weiterhin wurde ein full-length-HDMX-Transkript mit einer 42 bp-Insertionen aus dem Chromosom 11 detektiert (siehe Abb. 10). Diese als HDMX-11 bezeichnete Spleißvariante besitzt 42 zusätzliche Basenpaare aus Chromosom 11, und eine weitere Variante war durch den Einbau der 42 zusätzlichen Basenpaare und einen Verlust der Nukleotide 606-1463 charakterisiert (HDMX 11-B). Durch die Verschiebung des Leserahmens wurde ein vorzeitiges Stopp-Codon eingebaut, sodass verkürzte Proteine entstehen.



Die Amplifikation der gesamten kodierenden Region erwies sich jedoch als schwierig. Diese ersten Ergebnisse ließen sich nicht für die anderen Proben reproduzieren. Zum Nachweis der *HDMX*-mRNA-Expression wurden daraufhin zunächst Teilbereiche der *HDMX*-mRNA untersucht.

Die Primer HDMX-3 und HDMX-8 dienten der Detektion der 5'-Region, Primer HDMX-7 und HDMX-2 der Detektion der 3'-Region. Die Primerbindungsstellen sind in Abb. 9C graphisch dargestellt. Im Agarosegel zeigten sich 2 Banden für die PCR mit der Kombination HDMX-3 und HDMX-8 (Abb. 14), eine Bande für HDMX-7 und HDMX-2 (nicht dargestellt). Die PCR-Produkte der Primer HDMX-3 und HDMX-8 wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten, kloniert und sequenziert. Die Auswertung der Sequenzierung ergab neben dem *HDMX*-Transkript aus 577 Basenpaaren eine um 68 bp (Deletion von Exon 6) kürzere Spleißvariante, das so genannte *HDMX-S*-Transkript (Rallapalli *et al.*, 1999).

4.2.2 FL-HDMX-mRNA und HDMX-S-mRNA-Expressionsanalysen

Zur weiteren Analyse wurden alle 57 Tumorproben in Hinblick auf eine Expression des FL-*HDMX*- und *HDMX-S*-Transkripts untersucht. Um die jeweiligen PCR-Produkte der cDNA der FL-*HDMX*-mRNA bzw. von der *HDMX-S*-Spleißvariante zu unterscheiden, wurden verschiedene Primer verwendet. In 54 von 57 (95%) der Proben konnte die *HDMX*-mRNA nachgewiesen werden. In einem der 3 Tumoren, in denen die *HDMX*-mRNA nicht detektierbar war, lag das *HDMX*-Gen amplifiziert vor. In 12 von 54 Proben (22%) bei denen die *HDMX*-mRNA nachweisbar war, wurde ausschließlich das full-length Transkript detektiert. 42 von 54 Proben (78%) exprimierten FL-*HDMX* und *HDMX-S*-mRNA. 48% dieser Proben (20 von 42) wiesen eine dominierende Expression des FL-Transkripts auf. 14 von 42 Proben (33%) zeigten ein identisches Verhältnis der beiden Transkripte. Als Vergleich wurde die *HDMX*-mRNA-Expression in verschiedenen Normalgeweben (Lunge, Niere etc.) untersucht. Die *HDMX*-mRNA war nicht nachweisbar, wenn die cDNA unter gleichen Bedingungen wie die Tumorproben amplifiziert wurde (35 PCR-Zyklen, Abb. 12B). Nach 70 PCR-Zyklen konnten die Transkripte für FL-*HDMX*-mRNA und *HDMX-S* detektiert werden. In allen Proben dominierte das FL-*HDMX*-Transkript.

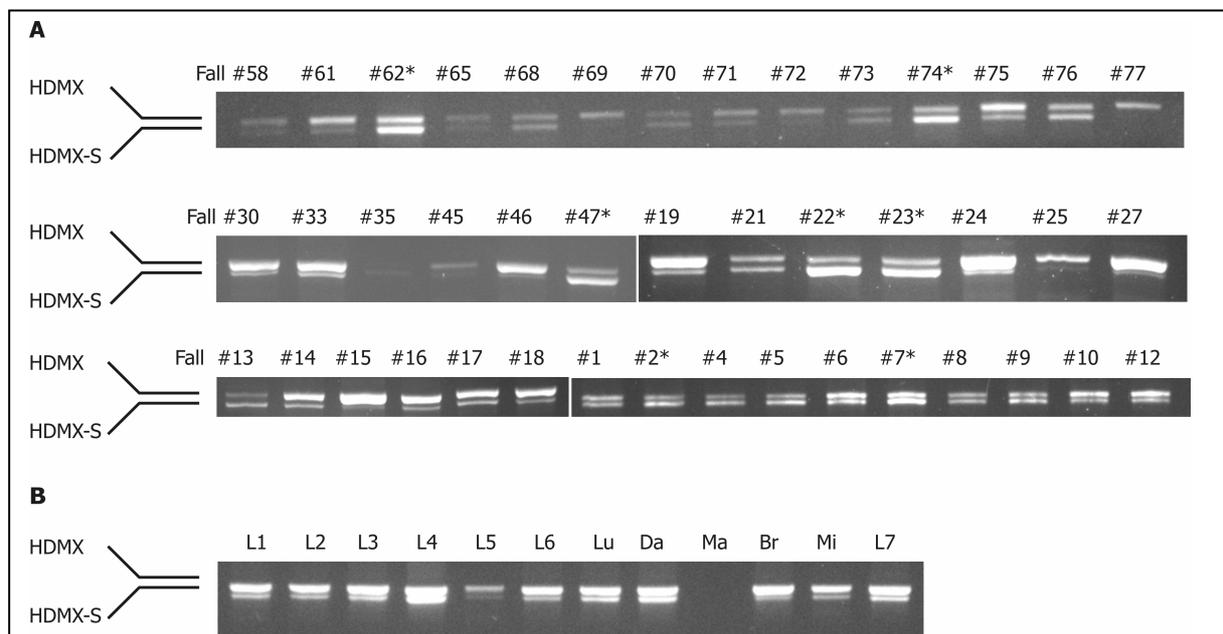


Abb. 12: Nachweis der FL-HDMX- und HDMX-S-Expression in WTS und Normalgewebe

A – Der Vorwärtsprimer HDMX-3 ist im Exon 2 und der Reverseprimer HDMX-8 im Exon 8 lokalisiert. Dies erlaubt eine Unterscheidung der full-length *HDMX*-mRNA (570 bp) und der *HDMX-S*-Spleißvariante (509 bp). Die Proben, in denen die Spleißvariante verstärkt exprimiert wird, sind mit einem Stern gekennzeichnet (*).

B – In allen untersuchten Normalgewebeproben wurde die FL-*HDMX*-mRNA stärker im Vergleich zur *HDMX-S*-Spleißvariante exprimiert (L – Lymphzyten, Lu – Lunge, Da – Darm, Ma – Magen, Br – Mamma, Mi – Milz). Des Weiteren war die Expression deutlich schwächer als in den Tumorproben, da die Banden erst nach insgesamt 70 PCR-Zyklen sichtbar waren (Details s. Text).

Tab. 2: klinische Daten von der WTS-Patienten

	HDMX-Amplifikation			HDMX-S-Überexpression		
	gesamt (n=66)	HDMX single copy	HDMX amplifiziert	gesamt (n=57)	HDMX-S/ FL-HDMX < 1	HDMX-S/ FL-HDMX > 1
Mann/Frau	29/37	24/31	5/6	28/29	27/22	1/7
Tumorart						
Liposarkome	18	15	3	15	14	1
MFH	14	13	1	12	8	4
Fibrosarkome	2	2	0	2	2	0
NS	4	4	0	5	5	0
RMS	4	3	1	4	3	1
LMS	14	10	4	11	10	1
andere Sarkome	10	8	2	8	7	1
Tumorstadium						
I	10	10	0	11	11	0
II	30	26	4	23	21	2
III	19	13	3	13	9	4
IV	7	3	4	10	8	2
Lokalisation						
Extremitäten	39	36	3	37	31	6
Thorax	4	3	1	3	1	2
Kopf	1	1	0	2	2	0
Bauch	19	13	6	14	14	0
andere	3	2	1	1	1	0

Abkürzungen: MFH – malignes fibröses Histiozytom, NS – neurogene Sarkome, RMS – Rhabdomyosarkome, LMS - Leiomyosarkome

In 19% (8 von 42) der untersuchten Proben war eine *HDMX-S*-mRNA-Überexpression nachweisbar. Hierbei konnte kein Zusammenhang zwischen der *HDMX-S*-Überexpression und dem p53-Mutationsstatus festgestellt werden. In 3 der 8 Proben konnte das wt- p53-Gen, in 5 der 8 Proben ein mutiertes p53-Gen nachgewiesen werden. Daten zur Tumorart-, größe-, grad- und Lokalisation, Geschlecht des Patienten, p53-Mutation sowie zu der FL- und *HDMX-S*-Expression der *HDMX*-Genamplifikation sind in der Tab. 2 und 3 aufgeführt. An Tumorproben, welche *HDMX-S* überexprimierten, wurden mit Hilfe der Real-time-PCR separat eine quantitative Expressionsanalyse durchgeführt, mit der das Verhältnis zwischen dem *HDMX-S* und dem FL-*HDMX* untersucht werden sollte. Als Kontrolle dienten 5 Proben, die *HDMX-S* in deutlich geringeren Mengen expremierten, als die übrigen Tumorproben. In allen 8 untersuchten Proben wurde eine *HDMX-S*-Überexpression festgestellt, deren Intensität 3-16-fach stärker war, als die Expression des FL-*HDMX*-Transkripts. In allen Kontrollproben hingegen dominierte die FL-*HDMX*-mRNA (Daten nicht gezeigt).

4.2.3 Detektion der FL- *HDMX* und *HDMX-S*-Transkripte in Normalgewebe

Neben dem Tumorgewebe wurde auch Gewebe aus Lunge, Darm, Magen, Brust und Milz auf eine FL-*HDMX* und *HDMX-S*-mRNA-Expression untersucht (Abb. 12B). Unter identischen Reaktionsbedingungen wie beim Nachweis der FL-*HDMX* und *HDMX-S*-mRNA in WTS-Proben, konnte in Normalgewebe keines der beiden Transkripte gefunden werden. Erst nach der zweiten PCR (70 Zyklen) wurde die FL-*HDMX*-mRNA in allen Normalgewebeproben detektiert. Im Vergleich zum Tumorgewebe und der *HDMX-S*-mRNA war das FL-*HDMX* im Normalgewebe stärker expremiert.

4.2.4 Klinische Bedeutung der *HDMX-S*-mRNA-Expression

Eine der zentralen Aufgabestellungen dieser Arbeit war die Ermittlung der klinischen Bedeutung einer *HDMX-S*-mRNA-Überexpression in WTS. Es konnte ein Zusammenhang zwischen dem Tumorgrad und der Überexpression des *HDMX-S*-Transkripts festgestellt werden. Von 8 der untersuchten WTS-Proben, die *HDMX-S* überexprimierten, waren 3 Tumoren als Grad II-Tumoren, 5 als Grad III- Tumoren klassifizierbar (Tab. 2).

Die Frequenz der *HDMX-S*-Überexpression in MFH (4 von 12, 33%) war deutlich höher, als in anderen Tumorarten (Tab. 2). In nur 1 von 15 Liposarkomen wurde eine *HDMX-S*-Überexpression detektiert. In Fibrosarkomen und neurogenen Sarkomen war das FL-*HDMX* quantitativ deutlich erhöht im Vergleich zum *HDMX-S*.

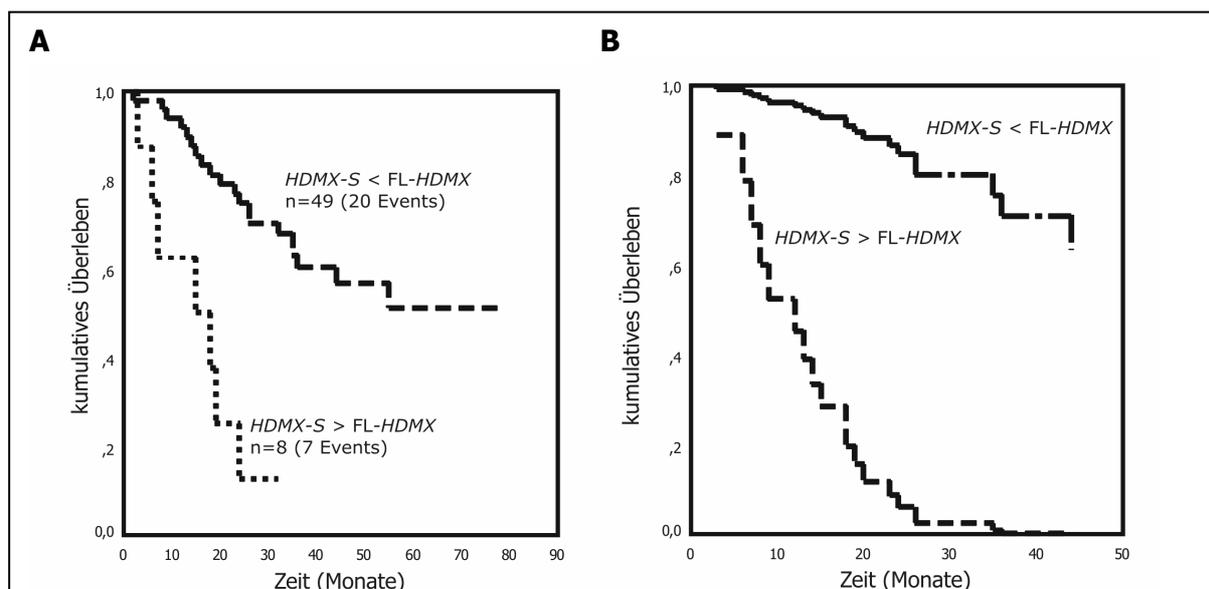


Abb. 8: klinische Bedeutung der *HDMX-S*-Überexpression für WTS-Patienten

A – In der Kaplan-Meier-Analyse zeigt sich deutlich, dass die *HDMX-S*-Überexpression mit einem signifikant verkürztem Gesamtüberleben von WTS-Patienten korreliert; **B** – Die multivariate Cox-Regressionsanalyse wurde nach Tumorgrad, -stadium und p53-Mutationsstatus adjustiert. Das Risiko am Tumor zu versterben, ist für Patienten mit *HDMX*-Amplifikation 17-fach erhöht.

Tab. 3: klinische Daten von Patienten mit *HDMX-S*-Überexpression und *HDMX*-Genamplifikation

Fall	Tumorart ^a	Grad	Lokalisation	Status	<i>HDMX</i> amplifiziert	<i>HDMX-S</i> Über - expression	<i>HDM2</i> amplifiziert ^b
<i>HDMX-S</i> Überexpression							
LZ2	pleo. MFH	III	untere Extremität	V	nein	ja	nein
LZ13	emb. RMS	III	Thoraxwand	V	ja	ja	nein
LZ23	pleo. MFH	III	untere Extremität	V	nein	ja	nein
LZ47	myx. LS	III	Thoraxwand	V	nein	ja	nein
LZ57	pleo. MFH	III	untere Extremität	V	nein	ja	nein
LZ94	syn.	II	untere Extremität	V	nein	ja	nein
LZ98	LMS	III	untere Extremität	L	nein	ja	nein
LZ100	pleo. MFH	III	untere Extremität	V	nein	ja	ja
<i>HDMX</i>-Genamplifikation							
LZ3	wd-LS	II	retroperitoneal	V	ja	nein	ja
LZ5	LMS	III	intraabdominal	V	ja	nein	nein
LZ10	pleo LS	II	untere Extremität	V	ja	nein	nein
LZ11	myx. LS	II	multi	V	ja	nein	nein
LZ13	emb. RMS	III	Thoraxwand	V	ja	ja	nein
LZ18	MPNST	II	intraabdominal	V	ja	nein	nein
LZ20	pleo. MFH	III	Hüfte	V	ja	nein	nein
LZ49	LMS	II	intraabdominal	V	ja	nein	nein
LZ55	fib. MT	II	intraabdominal	V	ja	nein	nein
LZ76	LMS	II	untere Extremität	L	ja	nein	ja
LZ79	epith. LMS	III	intraabdominal	V	ja	nein	nein

^a Abkürzungen: pleo. MFH – pleomorphes malignes fibröses Histiozytom; MPNST – maligner peripherer Nervenscheidentumor; fib. MT – fibröses Mesotheliom; neu-epith – Neuroepitheliom; emb. RMS – embryonales Rhabdomyosarkom; myx. LS – myxoides Liposarkom; wd-LS – gut differenziertes Liposarkom; LMS – Leiomyosarkom; syn – Synovialsarkom; V – verstorben; L – lebt, ^b die Ergebnisse der *HDM2*-Amplifikation wurden publiziert in: Bartel *et al.*, *IJC*, 2001, 95:168-175.

Mit Hilfe der Kaplan-Meier-Analyse wurde der Einfluss der *HDMX-S*-mRNA-Expression auf das Überleben der Patienten untersucht. Die durchschnittliche Überlebenszeit für Patienten deren Tumor die *HDMX-S*-Spleißvariante überexpressierte, ist signifikant verkürzt im Vergleich zu Patienten mit geringerer oder fehlender *HDMX-S*-Expression. Sie betrug 15 Monate (Verhältnis *HDMX-S* zum FL-*HDMX* > 1). Bisher verstarben 7 der 8 Patienten mit *HDMX-S*-Überexpression. Im Vergleich dazu haben Patienten, in deren Tumoren eine dominierende FL-*HDMX*-Expression nachgewiesen werden konnte, eine durchschnittliche Überlebenszeit von 53 Monaten (Verhältnis *HDMX-S* zum FL-*HDMX* < 1, log-Rank-Test, p < 0,0001). In einer

multivariaten Cox-Regressionsanalyse, unter Berücksichtigung des Tumorgrades und des p53-Mutationsstatus, war das relative Risiko 17-fach erhöht für Patienten mit einer *HDMX-S*-Überexpression an der Tumorerkrankung zu versterben, im Vergleich zu Patienten mit einer geringeren *HDMX-S*-Expression. Detaillierte Analysen der MFH und Fibrosarkome ergaben, dass Patienten, deren Tumor das *HDMX-S*-Transkript überexprimierte ein 8,1-fach höheres Risiko haben, an einem WTS zu versterben (abhängig von der Tumorlokalisation, $p = 0,017$, Daten nicht gezeigt). Diese Untersuchungsergebnisse zeigen, dass die Überexpression der *HDMX-S*-Spleißvariante ein unabhängiger Prognosefaktor ist, der mit einer signifikant verkürzten Überlebenszeit verbunden ist.

5. Diskussion

Änderungen des p53-MDM2-p14ARF-Pathways, wie z.B. p53-Genmutationen und MDM2-Überexpression, stellen unabhängige Prognosefaktoren für Patienten mit WTS dar (Taubert *et al.* 1996, Würfl *et al.* 1997, Orlow *et al.* 1999). Nur wenige Arbeitsgruppen untersuchten bisher die *HDMX*-Gen-Amplifikation und die Überexpression des *HDMX*-Proteins, einem Homologen des humanen HDM2. Ramos *et al.* (2001) detektierten das *HDMX*-Protein ausschließlich in Zelllinien humaner Primärtumoren unterschiedlicher Entitäten. Andere Untersuchungen wiesen Amplifikationen des *HDMX*-Gens und Überexpression des *HDMX*-Proteins in Glioblastomen nach (Riemenschneider *et al.* 1993, 1999 und 2003). Eine Studie an Weichteilsarkomen wurde bisher nicht durchgeführt. Dies erfolgte erstmals im Rahmen dieser Arbeit, in der die Konsequenz einer *HDMX*-Genamplifikation bzw. einer *HDMX*-mRNA-Überexpression in WTS dargestellt werden konnte (Bartel *et al.* 2004, 2005).

Im Rahmen der Analyse des *HDMX*-Amplifikationsstatus an primären WTS konnte in 17% der Tumorproben ein amplifiziertes *HDMX*-Gen nachgewiesen werden. Riemenschneider *et al.* (1999) untersuchten die *HDMX*-Genamplifikation bzw. *HDMX*-Protein-Überexpression in 208 Gliomen (Glioblastome, anaplastische Gliome, low-grade-Gliome). Sie stellten fest, dass eine *HDMX*-Amplifikation oder *HDMX*-Protein-Überexpression einen neuartigen Mechanismus darstellen können, um die Funktion von wt-p53 zu inhibieren. Untersuchungen von Ramos *et al.* 2001 stützen diese Hypothese. Sie stellten einen Zusammenhang zwischen der *HDMX*-Protein-Überexpression und der Anwesenheit von wt-p53 in Ovarialkarzinomzelllinien und Melanomen fest. In Bezug auf WTS ist erkennbar, dass eine *HDMX*-Genamplifikation tendenziell gehäuft in Anwesenheit von wt-p53 vorliegt. 7 von 11 WTS-Proben wiesen keine p53-Genmutationen auf. (Tab. 2). Eine der Probe trug eine stille Mutation (Codon 213), eine Probe eine Mutation im Intron und eine weitere Probe eine Mutation, die zu einem Aminosäureaustausch im Codon 213 führt. Unsere Daten zeigen somit ebenfalls, dass eine *HDMX*-Genamplifikation und/oder *HDMX*-Überexpression einen Mechanismus darstellt, der zu einer Inaktivierung von p53 führen kann.

In unserer Studie konnte in gut differenzierten Liposarkomen und MFH eine Koamplifikation des *HDMX*- und des *HDM2*-Gens festgestellt werden. Im Gegensatz dazu wurde in pleomorphen und myxoiden Liposarkomen ausschließlich eine *HDMX*-Genamplifikation, jedoch keine *HDM2*-Amplifikation detektiert. Diese Ergebnisse sind identisch mit den Ergebnissen der komparativen genomischen Hybridisierung von Dr. H. Schmidt aus unserer Arbeitsgruppe (persönliche Mitteilung, Daten nicht gezeigt).

Bartel *et al.* wiesen im Jahre 2001 den Zusammenhang zwischen der *HDM2*-Genamplifikation und einer guten Prognose für den betroffenen Patienten nach. Aufbauend auf diese Studien wurde die prognostische Relevanz der *HDMX*-Genamplifikation in dieser Arbeit ebenfalls untersucht. Zunächst stellte sich heraus, dass das *HDMX*-Gen häufiger amplifiziert vorliegt als benachbarte Gene auf dem Locus 1q32 in WTS. Benachbarte Gene sind koamplifiziert, jedoch in wesentlich geringerem Maße. Vergleicht man die Daten dieser Studie mit denen von Bartel *et al.* (2001) so haben Patienten mit einer *HDM2*-Genamplifikation die größte Überlebensrate, Patienten mit amplifiziertem *HDMX*-Gen die geringste. Weiterhin wurden unsere Tumorproben auf die Expression der *HDMX*-mRNA, besonders auf die Expression der Spleißvariante *HDMX-S*, untersucht. Die ermittelten Daten zeigen, dass das *HDMX-S*-Transkript in 8 der 54 untersuchten Proben überexprimiert wurde. Die Analyse der Daten ergab ein 17-fach höheres Risiko für Patienten, deren Tumorprobe eine *HDMX-S*-mRNA-Überexpression nachgewiesen werden konnte, an dem jeweiligen Tumor zu versterben. Die verstärkte Expression des *HDMX-S*-Transkripts wurde hauptsächlich in einer Untergruppe der MFH mit malignem Phänotyp detektiert.

In Bezug auf aggressive Tumoren stimmen diese Daten mit denen von Riemenscheider *et al.* (1999) überein. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die *HDMX-S*-Expression im Vergleich zum FL-*HDMX* in Glioblastomen erhöht war. In anaplastischen und low-grade-Gliomen konnte dies nicht beobachtet werden. Rallapalli *et al.* (1999) und Graaf *et al.* (2003) stellten fest, dass das verkürzte *HDMX-S*-Protein die p53-vermittelte Transaktivierung und Induktion der Apoptose effektiver hemmt als FL-MDMX. Es ist denkbar, dass die Überexpression des *HDMX-S* und die daraus resultierende Hemmung des wt-p53 dafür verantwortlich ist, dass die Zellen sich verändern, d.h., dass sich Neoplasien ausbilden. Auf der anderen Seite kann das *HDMX-S*-Protein neben der Hemmung der p53-Aktivität eine andere Funktion besitzen. Literaturangaben zum Zusammenhang zwischen einer *HDMX-S*-Überexpression und p53-Mutationsstatus existieren bisher noch nicht. Riemenscheider *et al.* (1999) berichten, dass die Menge des *HDMX-S*, im Vergleich zum FL-*HDMX*, in Glioblastomen höher ist, als in anaplastischen Gliomen. Rallapalli *et al.* (1999) zeigten, dass die *HDMX-S*-Expressionen in transformierten Zellen gesteigert und in Normalzellen vermindert sind. Aussagen über den p53-Mutationsstatus des Tumors oder der Zellen wurden nicht getroffen. Wir überprüften 40 humane Tumorzelllinien mit bekanntem p53-Status. Die Untersuchungen ergaben, dass das FL-*HDMX*-Transkript in wt-p53-Zelllinien, wie der Mamma-Ca-Zelllinie MCF-7 und der Prostatazelllinie LnCap, dominierte. In diesen Zelllinien war das *HDMX-S*-Transkript mit Hilfe der RT-PCR nicht detektierbar. Auf der anderen Seite wird das *HDMX-S*-Transkript in Zelllinien mit verändertem wt-p53, wie der Zelllinie Saos-2 (Osteosarkomzelllinie) und PC3

(Prostatakarzinom-Zelllinie) verstärkt exprimiert, das FL- *HDMX* hingegen war nur im geringen Maße nachweisbar. In Zelllinien mit p53-Punktmutationen scheint die Menge *HDMX-S/FL-HDMX* vom Mutationstyp abhängig zu sein (missense oder nonsense etc., Bartel *et al.*, Daten nicht gezeigt). Diese Daten legen nahe, dass die Expression von FL-*HDMX* und *HDMX-S* auf transkriptioneller Ebene p53-abhängig reguliert wird. Der genaue Mechanismus ist jedoch noch nicht bekannt. Jackson und Berberich (2000) stellten fest, dass *HDMX* nicht durch die p53-Transkriptionsaktivität, z.B. nach DNA-Schädigungen, beeinflusst wird. Neben der mRNA-Analyse bewerteten wir auch die Expression der Proteine, für die das FL-*HDMX* und *HDMX-S* kodieren. Es ist offensichtlich, dass die beurteilte mRNA-Menge nicht immer mit einer erhöhten Proteinmenge korreliert. Es wird generell angenommen, dass nicht zwingend eine Korrelation zwischen einem Überschuss der mRNA und der Menge des Proteins vorliegen muss (Anderson und Seilhamer, 1997). Ursache dafür sind die Stabilität der mRNA, unterschiedliche Transkriptions- und/oder Translationseffizienz, die Stabilität des Proteins u.v.a. Die Menge des letztendlich produzierten Proteins, für welches FL-*HDMX* und *HDMX-S* kodieren, ist bedeutender als die absolute Expressionsmenge mRNA, da beide Proteine um die p53-Bindungsstelle konkurrieren. Es konnte gezeigt werden, dass das *HDMX-S*-Protein eine größere Bindungsaffinität zum p53 besitzt, als das FL-*HDMX* (Rallapalli *et al.* 1999).

Nach Abschluss dieser Arbeit wurde in Western-Blot-Untersuchungen die Proteinexpression von FL-*HDMX* und *HDMX-S* untersucht. In unserer Studie war das durchschnittliche Verhältnis der *HDMX-S/FL-HDMX*-Proteinmenge in den WTS-Proben am höchsten, die durch eine *HDMX-S*-Überexpression gekennzeichnet waren. Proben mit einem Überschuss an *HDMX-S*-mRNA exprimierten deutlich mehr *HDMX-S*-Protein. Die Bandenintensitäten wurden densitometrisch bestimmt und spiegeln die Quantität des FL-*HDMX* bzw. *HDMX-S*-Proteins wieder. Diese wurden gegen Aktin normalisiert. Diese Daten sind jedoch kritisch zu bewerten. Wir haben unterschiedliche Antiseren für die Detektion des FL-*HDMX* und *HDMX-S* verwendet. Diese Antiseren können unterschiedliche Bindungsaffinitäten für das jeweilige Protein besitzen. Zukünftig sollte die *HDMX-S* und FL-*HDMX*- Expression mit Hilfe von Antikörpern analysiert werden, die ein Epitop, welches auf beiden Proteinen zu finden ist, erkennen.

In dieser Arbeit konnte deutlich gezeigt werden, dass die FL-*HDMX/HDMX-S*- mRNA-Menge ein eindeutiger, unabhängiger Prognosefaktor für WTS ist. Wir demonstrierten, dass die *HDMX*-mRNA in WTS in einer bedeutend höheren Menge exprimiert wird als in Vergleichsproben aus Normalgeweben. Das FL-*HDMX* und *HDMX-S*-Transkript konnte unter denselben Bedingungen, wie sie bei einer PCR für Tumorproben vorlagen, nicht in Normalgewebe detektiert werden. Erst nach einer „nested“-PCR, also 70 Zyklen, wurden

beide Transkripte nachgewiesen. Riemenschneider *et al.* beobachteten, dass die *HDMX-S*-mRNA besonders in nicht-neoplastischem Hirngewebe exprimiert wird. Quantitativ dominierte die *FL-HDMX*-mRNA in Glioblastomen. Diese Aussagen konnten mit Hilfe der RT-PCR und des Northern-Blot bestätigt werden. Die Ergebnisse waren besonders ausgeprägt in Tumoren, denen eine *HDMX*-Genamplifikation nachgewiesen werden konnte (Riemenschneider *et al.*, 1999). Es kann daher angenommen werden, dass beide Transkripte in normalem, nicht verändertem Gewebe exprimiert werden können. *FL-HDMX* ist im Vergleich zum *HDMX-S* das dominierende Transkript in Normalgewebe.

6. Zusammenfassung

In dieser Studie wurden Tumoren untersucht, die vom Mesenchym abstammen und vergleichsweise selten auftreten. Sie werden als humane Weichteilsarkome bezeichnet und sind durch ihre tumorbiologische Heterogenität gekennzeichnet. WTS kommen im Gegensatz zu Karzinomen auch schon in sehr jungen Lebensjahren vor. Sie weisen aufgrund ihrer Variabilität, ihrer ausgeprägten Strahlen- und Chemotherapeutikaresistenz, sowie der oft späten Diagnosestellung eine hohe Mortalitätsrate auf. Daraus resultieren die Notwendigkeit einer weiterführenden Analyse der WTS, die Identifikation molekularer Faktoren und die Einschätzung der prognostischen Relevanz der ermittelten Daten, um innovative Therapiemöglichkeiten zur Behandlung von WTS zu entwickeln.

In der Literatur sind bisher umfangreiche Arbeiten zur Analyse von Tumorsuppressorgenen (p53, p14ARF) und Onkogenen (*HDM2*) beschrieben worden. Aufbauend auf diesen Arbeiten sollte ein weiteres Gen, das *HDMX*, untersucht werden, um WTS weiterführend umfassend molekular charakterisieren zu können. Dabei stand die Analyse der *HDMX*-Genamplifikation und des *HDMX*-mRNA-Expressionsverhaltens mit anschließender Korrelation der Daten mit klinischen Parametern im Vordergrund. 66 WTS-Proben wurden mit Hilfe der sensitiven PCR-Methode auf ihre *HDMX*-Gen-Amplifikation untersucht. Als Referenz für ein nicht amplifiziertes Gen diente das Prothrombin-Gen. Es konnte nachgewiesen werden, dass in 17% (11 von 66) der WTS-Proben das *HDMX*-Gen amplifiziert vorlag. Patienten, deren Tumor ein amplifiziertes *HDMX*-Gen aufwies, hatten eine mittlere Überlebenszeit von 44 Monaten im Vergleich zu Patienten ohne amplifiziertes *HDMX*-Gen (66 Monate). Die multivariate Cox-Regressionsanalyse ergab auch hierfür eine schlechte Prognose für Patienten mit *HDMX*-Amplifikation. Demnach hatten diese Patienten ein erhöhtes relatives Risiko an der Tumorerkrankung zu versterben. 57 von 66 Proben wurden auf die Expression des „full-length“-Transkripts der *HDMX*-mRNA bzw. auf die Expression des *HDMX*-S-Transkripts untersucht. In 54 dieser Proben (95%) konnte die *HDMX*-mRNA detektiert werden. In 22% (12 von 54) der Proben, die die *HDMX*-mRNA exprimieren, fand sich ausschließlich das FL-*HDMX*. In 78% (42 von 54) der Fälle wurde neben der *HDMX*-mRNA auch die Spleißvariante *HDMX*-S exprimiert. In 48% dieser Fälle lag das FL-*HDMX* überwiegend vor, in 19% der Proben dominierte das *HDMX*-S-Transkript, in 33% war ein ausgewogenes Verhältnis zwischen *HDMX*-S und FL-*HDMX* nachweisbar. Die anschließende Kaplan-Meier-Analyse zeigte, dass diese *HDMX*-S-Überexpression mit einer schlechteren Prognose korrelierte. Die errechnete Überlebenszeit betrug durchschnittlich 15 Monate, während Patienten ohne *HDMX*-S-Überexpression eine Überlebenszeit von 53 Monaten aufwiesen. In der Cox-Regressionsanalyse, unter Berücksichtigung der Tumorart, und des

Tumorgrades, zeigte sich ein 17-fach erhöhtes Risiko der Patienten an einem WTS zu versterben. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen Tumorgrad und der *HDMX-S*-Überexpression konnte festgestellt werden.

7 Literaturverzeichnis

- Anderson L**, Seilhamer JA: comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. In: Electrophoresis 18 (1997) 533-537.
- Bartel F**, Meye A, Würfl P *et al.*: Amplification of the MDM2 gene, but not expression of splice variants of MDM2 mRNA, is associated with prognosis in soft tissue sarcoma. Intl J Cancer 95 (2001) 168-175.
- Brennan MF**: Management of soft tissue sarcoma. Br J Surg 83 (1996) 577-579.
- Brinck U**, Cordon-Cardo C, Kellner S *et al.*: Prognostic relevance of histological grading, cell cycle associated antigens and cell cycle regulators in malignant fibrous histiocytoma. A multivariate analysis. Pathol Pract Res 194 (1998) 257-259.
- Brinck U**, Stachura J, Kellner S, Schauer A: Prognostic relevance of Ki-67 antigen and c-myc oncoprotein in malignant fibrous histiocytoma. Anticancer Res 15 (1995) 1915-191.
- Brockmann M.**: Asbestassozierte Lungen- und Pleuraerkrankungen-pathologische. Anatomie Pneumotologie 45 (1991) 422-428.
- Cordon-Cardo S**: Sarcomas of the soft tissue and bone; in: de Vita VT, Hellmann S, Rosenberg SA (eds): Cancer Principles & Practice of Oncology; ed 5. Philadelphia, Lippincott- Raven, 1997.
- Cordon-Cardo C**, Latres E, Drobnjak M *et al.*: Molecular abnormalities of MDM2 and p53 genes in adult soft tissue sarcomas. Cancer Res 54 (1994) 794-799.
- Eggermont AM**, Schraddordt-Koops H, Klausner JM *et al.*: Isolated limb perfusion with tumor necrosis factor and melphalan for limb salvage in 186 patients with locally advanced soft tissue extremity sarcomas. The cumulative multicenter European experience. Ann Surg 224 (1996) 756-764.
- Enzinger FM, Weiss SW**: Soft Tissue Tumors; ed 3. Mosby, St Louis Missouri, 1995.
- Fearon ER**, Vogelstein B: A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 61 (1990) 759-767.
- Freedman DA**, Wu L, Levine AJ: Functions of the MDM2 oncoprotein. Cell Mol Life Sci 184 (1999) 96-107.
- Giuliano AE**, Eilber FR: The rationale for planned reoperation after unplanned total excision of soft tissue sarcomas. J Clin Oncol 3 (1985) 1344-1348.
- Gustafson P**: Soft tissue sarcoma epidemiology and prognosis in 508 patients. Acta Orthop Scand 65 (1994) 1-31.
- Gutman M**, Inbar M, Lev-Shlush D *et al.*: High dose tumor necrosis factor alpha and melphalan administered via isolated limb perfusion for advanced limb soft tissue sarcoma results in a > 90% response rate and limb preservation. Cancer 79 (1997) 1129-1137.
- Graaf P**, Little NA, Ramos YF *et al.*: HDMX protein stability is regulated by the ubiquitin ligase activity of MDM2. J Biol Chem 278 (2003) 38315-24.
- Hagemann R**: Mutationen I und II; in Hagemann R (Hrsg): Allgemeine Genetik; Auflage 1. Jena, Fischer (1984) 107-178.
- Harris CC**: Structure and function of the p53 tumor suppressor gene. Clues for rational cancer therapeutic strategies. J Natl Cancer Inst 88 (1996) 1442-1455.
- Hsieh CJ**, Nehls O, Sarbia M, *et al.*: Bedeutung der Inaktivierung von p16INK4a und p14ARF durch Promotor Methylierung (PM) beim Kolonkarzinom (UICC Stadium I-III). Z Gastroenterol (2004).
- Jackson MW** und Berberich SJ: MdmX protects p53 from Mdm2-mediated degradation. Mol Cell Biol 20 (2000) 1001-1007
- Jones SN**, Roe AE, Donehower LA, Bradley A: Rescue of embryonic lethality in MDM2-deficient mice by absence of p53. Nature 378 (1995) 206-208.
- Juven-Gershon T**, Oren M. MDM2: The ups and downs. Mol Med 5 (1999) 71-83.

- Lienard D**, EwalenkoP, Delmotte JJ *et al.*: High dose recombinant tumor necrose factor alpha in combination with interferon gamma and melphalan in isolation perfusion of the limbs for melanoma and sarcoma. *J Clin Oncol* 10 (1992) 52-60
- Lundren K**, Luna RMDO, Mc Neill YB: Targeted expression of MDM2 uncouples S phase from mitosis and inhibits mammary gland development independent of p53. *Gene Dev* 11 (1997) 714-725
- Katenkamp D, Kosmehl H**: Heterogeneity in malignant soft tissue tumors. *Curr Top Pathol* 89 (1995) 123-151.
- Katenkamp D, Stiller D**: Weichgewebstumoren; Auflage 1., Leipzig, Barth, (1990) 11-20.
- Lahiri D.K.& Nurnberger J.I.**: A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 19 (1991) 5444-5445
- Lejeune FJ**, Pujol N, Lienard D *et al.*: Limb salvage by neoadjuvant isolated perfusion with TNFa and melphalan for non- resectable soft tissue sarcoma of the extremities. *Eur J Surg Oncol* 26 (2000) 669-67
- Linares LK**, Hengstermann A, Ciechanover A *et al.*: HDMX stimulates HDM2- mediated ubiquitinsation and degradation of p53. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 (2003) 12009-12014
- Melzer PS**: Molecular biology of soft tissue tumors; in Enzinger FM, Weiss SW (eds): *Soft Tissue Tumors*; 3rd ed. St. Louis Missouri, Mosby, 11 (1995) 511-515
- Michael D & Oren M**: The p53 and MDM2 families in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 12 (2002) 53-59
- Miller S.A.**, Dykes D.D. & Polesky H.F.: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16 (1988) 1215.
- Momand J**, Wu HH, DaGupta G: MDM2-master regulator of the p53 tumor suppressor protein. *Gene* 242 (2000) 15-29
- Myrrhe Jensen O**, Kaae S *et al.*: Histopathological grading in soft tissue tumours: Relation to survival in 261 surgically treated patients. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 91 A (1983) 145-151
- Orlow I**, Drobnjak M, Zhang ZF *et al.*: Alteration of INK4A and INK4B genes in adult soft tissue sarcomas: effect on survival. *J Natl Cancer Inst* 91 (1999) 73-9
- Parant J**, Chavez-Reyes A, Little NA *et al.*: Rescue of embryonal lethality in MDM4-null mice by loss of Trp 53 suggests a nonoverlapping pathway with MDM2 to regulate p53. *Nat Genet* 29 (2001) 92-5
- Pollock RE**, Karnell LH, Menck HR, Winchester DP: The National Cancer Data Base Report on soft tissue sarcoma. *Cancer* 78 (1996) 2247-2257
- Rallapalli R**, Strachan G, Cho B *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 (1999) 8299-308
- Rath FW**: Allgemeine und klinische Pathologie. In: *Weichteilsarkome des Erwachsenen*. Hrsg: Rath FW, Schönfelder M. Karger, Basel 1. Aufl. (2002) 1-16.
- Riemenschneider MJ**, Buschges R, Wolter M *et al.*: Amplifikation and overexpression of the MDM4 (MDMX) gene from 1q32 in a subset of malignant gliomas without TP53 mutation or MDM2 amplification. *Cancer Res* 59 (1999) 6091-6096.
- Riemenschneider MJ**, Knobbe CB, Reifenberger G: Refined mapping amplification target. *Int J Cancer* 104 (2003) 752-757
- Shvarts A**, Bazuine M, Dekker P *et al.*: Isolation and identification of the human homolog of a new p53-binding protein. *Genomics* 1 (1997) 34-42.
- Shvarts A**, Steegenga WT, Riteco N *et al.*: MDMX: a novel p53-binding protein with some functional properties of MDM2. *EMBO J* 15 (1996) 5349-5357.

- Taubert H**, Meye A, Würfl P: Soft tissue sarcomas and p53 mutations. *Mol Med* 4 (1998) 365-372.
- Taubert H**, Meye A, Würfl P: Prognosis is correlated with p53 mutation type for soft tissue sarcoma patients. *Cancer Res* 56 (1996) 4134-4136.
- Tomita Y**, Aozasa K, Myoui A *et al.*: Histological grading in soft tissue sarcomas. An analysis of 194 cases including AgNOR count and mast-cell count. *Int J Cancer* 54 (1993) 194-196.
- Waterhouse J**, Muir C, Shanmugaratnam K, Powell J: Cancer incidence in five continents. Lyon IARC Scientific Publications, vol IV, no 42 (1982).
- Weinberg RA**: The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81 (1995) 323-330.
- Wright D.K. & Manos M.M.**: PCR protocols: A guide to methods and applications. Innis M.A. (ed.), Academic Press, San Diego (1990) 153-158.
- Würfl P**, Meye A, Schmidt H *et al.*: High prognostic significance of MDM2/p53 co-overexpression in soft tissue sarcomas of the extremities. *Oncogene* 16 (1998) 1183-1185.
- Würfl P**, Meye A, Berger D *et al.*: Prognostic relevance of C-terminal MDM2 detection is enhanced by positivity in soft tissue sarcomas. *Diagn Mol Pathol* 6 (1997) 249-254.
- Würfl P**, Taubert H, Meye A *et al.*: Prognostic value of immunohistochemistry for p53 in primary soft-tissue sarcomas: a multivariate analysis of five antibodies. *J Cancer Res Clin Oncol* 123 (1997) 502-508
- Vogelstein B**, Kinzler KW: The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 9 (1993) 138-141.
- Zheng L & Lee W-H**: The retinoblastoma gene: A prototypic and multifunctional tumor suppressor. *Exp Cell Res* 264 (2001) 2-18

Thesen der Dissertation

1. In dieser Studie wurde der Amplifikationsstatus des *HDMX*-Gens und die Expression der *HDMX*-mRNA in Weichteilsarkomen (WTS) untersucht. WTS stammen vom Mesenchym ab und treten vergleichsweise selten auf. Sie sind durch ihre tumorbiologische Heterogenität gekennzeichnet.
2. WTS weisen aufgrund ihrer Variabilität, ihrer ausgeprägten Strahlen- und Chemotherapeutikaresistenz, sowie der oft späten Diagnosestellung eine hohe Mortalitätsrate auf. Daraus resultieren die Notwendigkeit einer weiterführenden Analyse der WTS, die Identifikation molekularer Faktoren und die Einschätzung der prognostischen Relevanz der ermittelten Daten, um innovative Therapiemöglichkeiten zur Behandlung von WTS zu entwickeln.
3. In der Literatur sind bisher umfangreiche Arbeiten zur Analyse von Tumorsuppressorgenen (p53, p14ARF) und Onkogenen (*HDM2*) beschrieben worden. Aufbauend auf diesen Arbeiten sollte ein weiteres Gen, das *HDMX*, untersucht werden, um WTS weiterführend umfassend molekular charakterisieren zu können.
4. Im Rahmen dieser Arbeit wurde in 66 WTS-Proben die *HDMX*-Gen-Amplifikation mit Hilfe der Multiplex-PCR untersucht. Als Referenz für ein nicht amplifiziertes Gen diente das Prothrombin-Gen.
5. Es konnte nachgewiesen werden, dass in 17% (11 von 66) der WTS-Proben das *HDMX*-Gen amplifiziert vorlag. Patienten, deren Tumor ein amplifiziertes *HDMX*-Gen aufwies, hatten eine mittlere Überlebenszeit von 44 Monaten im Vergleich zu Patienten ohne amplifiziertes *HDMX*-Gen (66 Monate).
6. In der multivariaten Cox-Regressionsanalyse zeigte sich, dass die *HDMX*-Amplifikation mit einer schlechten Prognose für Patienten verbunden ist. Demnach hatten diese Patienten ein erhöhtes relatives Risiko an der Tumorerkrankung zu versterben.
7. In 57 der 66 Proben wurde die Expression des „full-length“-Transkripts der *HDMX*-mRNA bzw. die Expression des *HDMX*-S-Transkripts untersucht. In 54 dieser Proben (95%) konnte die *HDMX*-mRNA detektiert werden. In 22% (12 von 54) der Proben, die die *HDMX*-mRNA exprimieren, fand sich ausschließlich das FL-*HDMX*. In 78% (42 von 54) der Fälle wurde neben der *HDMX*-mRNA auch die Spleißvariante *HDMX*-S exprimiert. In 48% dieser Fälle lag das FL-*HDMX* überwiegend vor, in 19% der Proben dominierte das *HDMX*-S-Transkript, in 33% war ein ausgewogenes Verhältnis zwischen *HDMX*-S und FL-*HDMX* nachweisbar.

8. Die anschließende Kaplan-Meier-Analyse zeigte, dass diese *HDMX-S*-Überexpression mit einer verkürzten Überlebenszeit korrelierte. Die Gesamtüberlebenszeit für Patienten, deren Tumor eine erhöhte *HDMX-S*-Expression aufwies, betrug durchschnittlich 15 Monate, während Patienten ohne *HDMX-S*-Überexpression eine Überlebenszeit von 53 Monaten aufwiesen.
9. In der Cox-Regressionsanalyse, unter Berücksichtigung der Tumorart, und des Tumorgrades, zeigte sich ein 17-fach erhöhtes Risiko der Patienten an einem WTS zu versterben.
10. Die *HDMX-S*-Überexpression korrelierte mit einem erhöhten Tumorgrad.
11. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen deutlich, dass sowohl die *HDMX*-Genamplifikation als auch die FL-*HDMX*/*HDMX-S*-mRNA-Menge unabhängige, negative Prognosefaktoren für WTS sind.

Danksagung

Für die Möglichkeit, meine Dissertation am Institut für Pathologie der MLU Halle-Wittenberg erstellen zu dürfen, möchte ich dem Direktor, Herrn Prof. Dr. Steffen Hauptmann danken.

Herrn Dr. Frank Bartel danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas, für seine wissenschaftliche Beratung, seine lange, freundliche, hilfsbereite und geduldige Betreuung meiner Person bei der Erstellung dieser Arbeit. Nach Abschluss des praktischen Teils der Arbeit und nach Beendigung meines Zahnmedizinstudiums in Halle an der Saale hat er trotz großer räumlicher Entfernung und zeitlicher Schwierigkeiten mich zur Vollendung der Arbeit motiviert.

Lebenslauf

Jördis Schulz

Bahnhofstr. 1/1
88299 Leutkirch

Tel: ++49 (0) 7561 – 981298 (privat)

E-mail: joerdis@gmx.de

Persönliche Daten

Geboren am 19.11.1975 in Burg

Familienstand ledig

Ausbildung

Ausbildung zur Zahnarzhelferin
Abschluss: 1995

Abitur: 1998

Studium der Zahnmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-
Wittenberg

Abschluss 2005: Zahnärztin

Promotion: Dr. med. dent. an der Martin-Luther-Universität Halle-
Wittenberg, Institut für Pathologie

Halle, d. 14.01.2008

Jördis Schulz

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe Dritter 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.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in zwei Publikationen veröffentlicht:

Bartel F*, **Schulz J***, Blumke K, Kappler M, Bache M, Schmidt H *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* 2004;88:199-206.

Bartel F*, **Schulz J***, Bohnke A, Blumke K, Kappler M, Bache M *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* 2005;117:469-475.

* Bartel F und Schulz J sind Erstautoren

Ort, Datum:

Unterschrift: