

Molekulare Charakterisierung von HDM2
(MDM2) in Weichteilsarkomen – Bedeutung als
Prognosefaktor und Ziel innovativer Therapie-
strategien



Dissertation

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

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Frank Bartel

geboren am 22. April 1972 in Ludwigslust (Mecklenburg)

Gutachter:

1. Prof. Dr. R. Rudolph, Halle/Saale
2. Prof. Dr. F.-W. Rath, Halle/Saale
3. Prof. Dr. H. Kalthoff, Kiel

verteidigt am 13. März 2002 in Halle/Saale

urn:nbn:de:gbv:3-000003220

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000003220>]

Bibliographisches Verzeichnis

Bartel, Frank

Molekulare Charakterisierung von HDM2 (MDM2) in Weichteilsarkomen – Bedeutung als Prognosefaktor und Ziel innovativer Therapiestrategien

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Dissertation, 2001
147 S., 186 Lit., 41 A., 15 Tab., 4 Anlagen

Referat:

In der vorliegenden Arbeit wurden Weichteilsarkome (WTS) umfassend molekulargenetisch charakterisiert. Dabei stand die Analyse insbesondere der für WTS bedeutsamen Tumorsuppressorproteine TP53 und p14ARF sowie des Onkoproteins MDM2 in Bezug auf Alterationen der Expression bzw. auf Genebene (Überexpression, Genamplifikation, Mutationen, Mikrosatelliteninstabilitäten) im Vordergrund.

Es konnte gezeigt werden, dass 55 % der WTS-Proben zusätzlich zum *MDM2*-„full-length“-Transkript verkürzte Spleißvarianten exprimieren. Insgesamt wurden 20 verschiedene Transkripte identifiziert (16 davon erstmals im Rahmen dieser Arbeit). Das Auftreten der *MDM2*-Spleißformen korrelierte mit einem höheren Tumorgrad der WTS, ein Einfluss auf die Prognose von WTS-Patienten konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Es wird vermutet, dass bestimmte Formen zur Bildung und Progression von Tumoren, einschließlich WTS, beitragen. Der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte „Splice Capture Assay“ (SCA) ermöglicht eine schnelle und kostengünstige Analyse bislang unbekannter Spleißformen durch den Vergleich der charakteristischen Spaltmuster nach dem Verdau der PCR-Produkte mit bestimmten Restriktionsenzymen. Durch die Zuordnung der einzelnen Fragmente lässt sich ohne Sequenzierung die Struktur einer unbekannteren *MDM2*-Spleißform sehr genau vorhersagen.

Die Amplifikation des *MDM2*-Gens konnte in 28 % der untersuchten WTS detektiert werden. Überraschenderweise war die *MDM2*-Genamplifikation mit einer guten Prognose für WTS-Patienten verbunden. Die mittlere Überlebenszeit ohne Amplifikation betrug etwa 50 Monate, im Vergleich zu 80 Monaten für WTS-Patienten mit nachgewiesener *MDM2*-Amplifikation. Der Verlust der *p14ARF*-mRNA-Expression betraf 14 % der WTS-Patienten. Dies war jedoch mit einer stark verkürzten mittleren Überlebenszeit verknüpft (11 Monate ohne vs. 96 Monate mit *p14ARF*-mRNA-Expression). Sowohl die *MDM2*-Genamplifikation als auch die *p14ARF*-mRNA-Expression erwiesen sich in der COX-Regressionsanalyse als unabhängige prognostische Marker für WTS-Patienten.

Einen weiteren Schwerpunkt bildete die Durchführung von *MDM2*-Antisense-Therapiestudien an WTS-Xenotransplantaten im nu/nu-Rattenmodell. In diesen *in vivo*-Experimenten konnte nach einer Behandlungszeit von einer Woche die Tumormasse um bis 71 % reduziert werden. Des Weiteren wurde erstmals gezeigt, dass auch die Zahl der Tumoren, die sich gebildet hatten, in den mit *MDM2*-AS-ODNs behandelten Tieren signifikant kleiner als in den Kontrollgruppen war. Erwartungsgemäß führte die Behandlung der Tumoren mit *MDM2*-AS-ODNs zu einer Reduzierung der MDM2-Proteinmenge. Interessanterweise war zusätzlich auch die Menge an mt-TP53 in den Behandlungsgruppen stark vermindert. Diese Ergebnisse haben eine große allgemeine Bedeutung für die Behandlung von Tumoren mit *MDM2*-AS-ODNs, da nachgewiesen werden konnte, dass eine Reduzierung der Tumormasse und der Tumorzahl unabhängig vom *TP53*-Genstatus möglich ist.

Inhaltverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Weichteilsarkome	1
1.2	Molekulare Prognosefaktoren für Weichteilsarkome	5
1.3	Das Onkogen MDM2 (HDM2)	8
1.4	Die MDM2-TP53-Interaktion als Ziel einer Gentherapie	14
1.4.1	Gentherapie – eine allgemeine einföhrung	14
1.4.2	Vektorsysteme	15
1.4.3	MDM2 als Ziel einer Gentherapie	18
1.5	Aufgabenstellung	21
2	Material	22
2.1	Tumormaterial und Patientengut	22
2.2	Geräte und Verbrauchsmaterialien	23
2.3	Chemikalien	23
2.4	Antikörper	25
2.5	Enzyme	26
2.6	Kits	26
2.7	Plasmide	26
2.8	Bakterienstämme	27
2.9	Oligonukleotide und „Mixed Backbone Oligonucleotides (MBOs)“	27
2.10	Versuchstiere	28
3	Methoden	29
3.1	Isolieren von Nukleinsäuren	29
3.1.1	Präparation von Gesamt-RNA	29
3.1.2	Konzentrationsbestimmung	29
3.1.3	RNA-Gelelektrophorese	29
3.1.4	Isolieren von genomischer DNA aus Paraffinmaterial	30
3.1.5	Isolieren von genomischer DNA aus peripherem Blut	31
3.1.6	Isolieren von Plasmid-DNA	33
3.1.6.1	Minipräparation	33
3.1.6.2	Maxi- und Megapräparation	33
3.1.7	Isolieren von viraler DNA aus Zellkulturüberständen	33
3.2	Reverse Transkription, Polymerasekettenreaktion und Sequenzierung	34
3.2.1	Reverse Transkription	34

3.2.2	Polymerasekettenreaktion (PCR)	34
3.2.2.1	PCR zum Nachweis der <i>MDM2</i> -Transkripte	34
3.2.2.2	Multiplex-PCR zum Nachweis der Amplifikation des <i>MDM2</i> -Gens	36
3.2.2.3	PCR mit weiteren Primern	36
3.2.2.4	Sequenzierreaktion	37
3.3	DNA-Arbeiten	37
3.3.1	Agarosegelelektrophorese	37
3.3.2	Isolieren von DNA aus Agarosegelen	38
3.3.3	Polyacrylamidgelelektrophorese von PCR-Produkten	38
3.3.3.1	Gellauf	38
3.3.3.2	Silberfärbung	39
3.4	Klonierung von DNA-Fragmenten	40
3.4.1	Enzymatische Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen	40
3.4.2	Ligation von PCR-Produkten in den TOPO-T/A-Vektor	40
3.4.3	Ligation von Oligonukleotiden	40
3.4.4	Herstellung RbCl ₂ -kompetenter Zellen	40
3.4.5	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	41
3.4.6	Selektion positiver Transformanden	41
3.5	Splice Capture Assay zur Identifizierung neuer Spleißvarianten	42
3.6	Northern Blot Analysen	43
3.7	Western Blot Analysen	43
3.7.1	Isolieren von Proteinen aus Gewebe und Zellkulturen, Proteinbestimmung	43
3.7.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	44
3.7.3	Übertragung von Proteinen auf eine PVDF-Membran	44
3.7.4	Immunfärbung mit spezifischen Antikörpern	44
3.8	Immunhistochemie	46
3.9	Zellkultur	47
3.10	Arbeiten mit Adenoviren	48
3.10.1	Expansion und Reinigung von Adenoviren	49
3.10.2	Kotransfektion eukaryotischer Zellen	51
3.10.3	Isolieren der Plaques	51
3.10.4	Charakterisieren der Plaques	51
3.11	<i>MDM2</i> -AS-Behandlung von xenotransplantierten WTS in Nacktratten	52
3.11.1	Xenotransplantation von humanen WTS in Nacktratten	52
3.11.2	Nichtviraler Gentransfer <i>in vivo</i>	54

3.11.2.1	Versuchsreihe 1	54
3.11.2.2	Versuchsreihe 2	55
3.12	Statistik	55
4	Ergebnisse	56
4.1	mRNA- und Proteinexpressionsstudien von MDM2 und p14ARF in WTS	56
4.1.1	RT-PCR zum Nachweis der <i>MDM2</i> -mRNA-Expression	56
4.1.2	Detektion verkürzter Transkripte der <i>MDM2</i> -mRNA in WTS	57
4.1.3	Detektion von in Normalgewebe und Lymphozyten	59
4.1.4	Charakterisierung der Spleißvarianten der <i>MDM2</i> -mRNA	60
4.1.5	Expression von <i>MDM2</i> -Spleißformen in juvenilen Rhabdomyosarkomen	66
4.1.6	Korrelation der Expression von <i>MDM2</i> -Spleißvarianten mit klinischen Parametern	70
4.1.7	Splice Capture Assay	71
4.1.8	Nachweis der Amplifikation des <i>MDM2</i> -Gens	74
4.1.8.1	Korrelation der Amplifikation des <i>MDM2</i> -Gens mit klinischen Parametern	77
4.1.9	Mikrosatellitenanalyse für die <i>MDM2</i> -Marker D12S80b und D12S83a	78
4.1.10	Nachweis der p14ARF-mRNA-Expression	79
4.1.10.1	Korrelation der p14ARF-mRNA-Expression mit klinischen Parametern	80
4.2	<i>TP53</i> -Mutationsanalyse in WTS	80
4.3	Nachweis der MDM2-, TP53- und p14ARF-Proteinexpression	82
4.4	Aberrante Lokalisation des Onkoproteins MDM2 im Zytoplasma	84
4.5	Zusammenfassung der Ergebnisse zur Untersuchung von MDM2, TP53, p14ARF und prognostische Aussagen der klinisch relevanten Parameter	86
4.6	Konstruktion eines Adenovirus zur Expression von <i>MDM2</i> -antisense RNA	87
4.6.1	Klonierungsstrategie	88
4.7	Klonierung von Antisense- und Mismatch-Oligos in den Shuttle-Vektor pSP6mU6	90
4.7.1	Subklonierung des <i>Cla</i> -Fragments in den pAVS6aCla-Vektor	91
4.7.2	Kotransfektion von pAVS6aCla und <i>Add327</i> in 293-Zellen	93
4.7.3	Expansion der Plaques, Nachweis der Insertion der dsODNs	95
4.8	<i>In vivo</i> Transfektionsexperimente mit <i>MDM2</i> -AS-Oligonukleotiden	96
4.9	Etablierung eines WTS-Xenotransplantationsmodells in nu/nu-Ratten	96

4.10	Behandlung von Xenotransplantattumoren mittels <i>MDM2</i> -AS-Oligonukleotiden (Versuchsreihe 1)	97
4.11	Behandlung von Xenotransplantattumoren mittels <i>MDM2</i> -AS-Oligonukleotiden (Versuchsreihe 2)	99
4.12	Reduzierung der Tumormasse und der Tumorzahl durch die Behandlung mit <i>MDM2</i> -AS-Oligonukleotiden	99
4.12.1.1	Western Blot Analyse	101
4.12.1.2	Immunhistochemische Charakterisierung der soliden Tumoren	102
5	Diskussion	104
5.1	Expression von Spleißvarianten der <i>MDM2</i> -mRNA	104
5.2	Splice Capture Assay	111
5.3	MDM2 – ein Onkogen mit den Eigenschaften eines Tumorsuppressors?	112
5.4	Molekulare Prognosefaktoren für WTS	118
5.5	MDM2 als Ziel einer Gentherapie	121
5.6	Ausblick	125
6	Zusammenfassung	129
7	Literaturverzeichnis	132
8	Anhang	141

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ad	Adenovirus, adenoviral
Ak	Antikörper
AS	antisense
ATCC	American Type and Tissue Collection – Amerikanische Zell- und Gewebesammlung
bidest.	bidestilliertes Wasser
bp	Basenpaar
BSA	bovine serum albumine - Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
CGH	comparative genomic hybridization – komparative genomische Hybridisierung
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dmin	- „double minute chromosomes“ – kurze Doppelchromosomen ohne Zentromer
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	Doppelstrang
dsODN	Doppelstrangoligodesoxynukleinsäure
DTT	Dithiothieitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
FKS	fötales Kälberserum
FL	„full length“ – in der Arbeit als Synonym für das MDM2-Transkript verwendet, das für das 90 kDa-Protein kodiert
g	Gramm
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GFP	„green fluorescent protein“ – grünfluoreszierendes Protein
HE	Haematoxylin-Eosin (-Färbung)
IHC	Immunhistochemie
kDa	Kilodalton
LB	Luria Broth - Bakteriennährmedium
LMS	Leiomyosarkom
LOH	„loss of heterozygosity“ – Verlust der Heterozygotie
mAk	monoklonaler Antikörper
MBO	„mixed backbone oligonucleotid“ – Oligonukleotid, das aus DNA und RNA besteht

MDM2	„murine double minute gene 2“ – in der Arbeit für das humane Homolog HDM2 verwendet; zurzeit werden in der Literatur beide Bezeichnungen parallel verwendet
MDM2	Protein des „murine double minute gene 2“
MFH	malignes fibröses Histiozytom
MM	Mismatch
MOPS	Morpholinopropan-sulfonsäure
mRNA	„messenger RNA“ – Boten-RNA
mt	Mutante, mutiert
n.b.	nicht bestimmt
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
ODN	Oligodesoxyribonukleinsäure
PBS	„phosphate buffered saline“ – Phosphat-gefufferte Kochsalzlösung
PCR	„polymerase chain reaction“ – Polymerasekettenreaktion
PVDF	Polyvinylidifluorid
RMS	Rhabdomyosarkom
rpm	„revolutions per minute“ – Umdrehungen pro Minute
RT	reverse Transkription, Raumtemperatur
SE	sense
TP53	Tumorsuppressorprotein p53
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
TSG	Tumorsuppressorgen
ÜN	über Nacht
wt	Wild-Typ
WTS	Weichteilsarkom
X-Gal	5-Bromo-4-chlor-3-indoyl- β -D-galaktosid

1 Einleitung

1.1 Weichteilsarkome

Alle malignen Tumoren des nichtepithelialen und extraskeletalen Gewebes sowie neuroektodermale Malignome des peripheren und autonomen Nervensystems mit Ausnahme des retikuloendothelialen Systems, der Glia und des Stützgewebes parenchymatöser Organe werden unter dem Begriff Weichteilsarkome (WTS) zusammengefasst ¹.

Der Anteil der WTS an malignen Geschwülsten im Erwachsenenalter beträgt ungefähr 1 % ^{1, 2}. Demnach treten WTS wesentlich häufiger auf als maligne Tumoren des Knochens oder Knorpels, wohingegen der Anteil des kolorektalen und des Mammakarzinoms etwa 20-mal höher als der der WTS ist. Es ist sehr schwierig, genaue epidemiologische Daten zu erheben, da die Lokisationsvielfalt dieser Tumoren außerordentlich hoch ist. Aus diesem Grund werden WTS von verschiedenen klinischen Fachrichtungen diagnostiziert und behandelt. Als Beispiel seien hier die Tumoren des Retroperitoneums genannt, die häufig den bösartigen Tumoren des Gastrointestinaltraktes zugeordnet werden. Die Inzidenz von WTS in den Industrieländern Westeuropas und Nordamerikas wird mit etwa 1 – 2 Neuerkrankungen je 100.000 Einwohner über alle Altersgruppen angegeben ^{1 - 3}. Für die Bundesrepublik Deutschland bedeutet dies, dass jährlich etwa 800 bis 1500 Neuerkrankungen pro Jahr auftreten. Gutartige Weichgewebstumoren treten demgegenüber mit einer Inzidenz von etwa 300 je 100.000 Einwohner pro Jahr auf ⁴.

Bei WTS zeigt sich eine Altersabhängigkeit, die deutlich mit altersbezogenen Häufigkeitsgipfeln für bestimmte histologische Subtypen einhergeht. So ist beispielweise die Inzidenz von WTS bei über 80-Jährigen 4 – 6 mal höher als im Vergleich zu anderen Altersgruppen. In diesem Alter treten nahezu keine Rhabdomyosarkome (RMS) auf. Dagegen ist der Anteil von malignen fibrösen Histiozytomen (MFH) in dieser Altersgruppe erhöht. Der Altersgipfel über alle Entitäten beträgt 64 Jahre, wobei erhebliche Entitätsunterschiede bestehen (Tab. 1-1). Männer sind verhältnismäßig häufiger von WTS betroffen als Frauen (Verhältnis 1,3:1) ⁵.

WTS stellen eine sehr heterogene Tumorgruppe dar. Man unterscheidet etwa 150 Entitäten und Subtypen. Die Histogenese der WTS ist weitgehend ungeklärt. Es wird angenommen, dass sich WTS aus undifferenzierten, mesenchymalen Stammzellen entwickeln. Die Tumorbezeichnung spiegelt nicht deren Histogenese wider, sondern vielmehr den durch Differenzierungs- bzw. Entdifferenzierungsprozesse erreichten Phänotyp ^{6, 7}. Ein Liposarkom ist demnach ein WTS mit Differenzierungsmerkmalen, die denen des Fettgewebes ähneln. Ob-

wohl es in der Literatur zahlreiche Hinweise für die Existenz der „multipotenten mesenchymalen Stammzelle“ gibt, konnte diese aber bislang nicht identifiziert werden. Es wird jedoch unabhängig davon auch die Hypothese diskutiert, dass ursprünglich differenzierte Zellen mesodermaler Herkunft Ausgangspunkt eines Dedifferenzierungsprozesses sein können ⁶.

Die ausgeprägte Heterogenität der WTS erfordert eine große Erfahrung in der Diagnostik, um sie von tumorähnlichen Läsionen und anderen Malignomen abgrenzen zu können. Dennoch bleiben etwa 15 % aller WTS nicht klassifizierbar. Sie lassen sich nicht einer bestimmten Entität zuordnen bzw. werden in einer so genannten „Sammelentität“, wie dem MFH oder dem undifferenzierten WTS, zusammengefasst ¹.

Tab. 1-1: Häufigkeiten und Altersverteilung der klinisch relevanten Sarkomentitäten ^{1, 2}

<i>Entität</i>	<i>Anteil (%)</i>	<i>Altersgipfel (Jahre)</i>
Liposarkom	15 – 20	30 – 70
malignes fibröses Histiocytom (MFH)	15 – 20	> 50
Rhabdomyosarkom (RMS)	10 – 15	
Leiomyosarkom (LMS)	~ 10	40 – 50, 60 – 70
Fibrosarkom	~ 10	20 – 40
synoviales Sarkom	~ 10	15 – 35
maligner peripherer Nervenscheidentumor	~ 6	30 – 60
andere Entitäten	~ 5	
unklassifizierbar	10 – 15	

Die am häufigsten auftretenden WTS des Erwachsenen sind Liposarkome und MFH; ihr Anteil beträgt jeweils etwa 20 % aller diagnostizierten WTS ⁸. Daneben kommen Leiomyosarkome (LMS) mit etwa 10 % vor, RMS ebenfalls mit ca. 10 % sowie maligne periphere Nervenscheidentumoren mit 6 % (Tab. 1-1). Im Kindesalter auftretende WTS werden als eigenständige Gruppe betrachtet, da die unterschiedlichen histologischen Subtypen ein anderes biologisches Verhalten aufweisen. Als Beispiel sei hier das RMS, das häufigste juvenile WTS, aufgeführt.

Neben der Einteilung in die verschiedenen histologischen Subklassen dient die Definition des Malignitätsgrades (Grading) als wichtigstes Kriterium dem Ziel, das biologische Verhalten eines Tumors möglichst genau voraussagen zu können. Zu den histologischen Merkmalen, die zur Bestimmung des Malignitätsgrades herangezogen werden, zählen u.a. Zellreichtum, Polymorphie, Mitoseaktivität, Wachstumsmuster, Nekroseanteil, Einblutungen sowie das Vor-

liegen von Entzündungsinfiltraten¹. Die relevantesten Parameter sind dabei die Mitoserate des Tumors sowie das Vorliegen von Nekrosen. Die heute in der Praxis angewandten Gradingssysteme kombinieren die genannten Parameter in unterschiedlicher Weise mit dem Ziel, die höchst mögliche prognostische Relevanz zu erzielen⁹. Bei der Bestimmung der einzelnen Faktoren zur Ermittlung des Malignitätsgrades kommt es sowohl bei einfachen als auch bei komplexen Gradingssystemen zu individuellen Begutachtungsschwankungen. Die Einteilung von Tumoren in verschiedene Stadien („Staging“) beruht neben dem Grading auch auf der Tumorgroße, der Tumortiefe, dem Lymphknotenbefall sowie dem Vorliegen von Fernmetastasen¹⁰.

Ein weiteres charakteristisches Merkmal von WTS, das ebenfalls zur besonderen klinischen Problematik dieser Tumorgruppe beiträgt, ist ihre ausgeprägte Lokisationsvielfalt. Die unteren Extremitäten sind mit 35 – 50 % überdurchschnittlich häufiger betroffen als die Rumpfwand (20 %), die oberen Extremitäten und das Retroperitoneum/Abdomen (jeweils ca. 15 %) und der Kopf-/Hals-Bereich mit ca. 10 %¹. Im Wesentlichen ist die Lokalisation etwa der Verteilung der Weichgewebsmasse im Körper proportional.

Die Lokisationsvielfalt, das seltene Auftreten und ein oftmals beschwerdefreies Wachstum führen häufig zu einer späten Diagnosestellung, so dass bis zu 20 % der Patienten zu diesem Zeitpunkt bereits nachweisbare Fernmetastasen aufweisen. Fernmetastasen treten bei WTS schon sehr frühzeitig auf und betreffen vorwiegend die Lunge. Außerdem ist die hohe Rezidivneigung von WTS hervorzuheben. Obwohl WTS häufig innerhalb einer Pseudokapsel wachsen, sind sie durch eine hohe Rezidivrate charakterisiert. 80 % aller Rezidive treten dabei innerhalb von 2 Jahren nach der Entfernung des Primärtumors auf^{1, 6}. Lokal rezidive können auch noch sehr lange nach Entfernung des Primärtumors auftreten.

Die Prognose der WTS ist vergleichsweise ungünstig. So beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate für alle WTS-Entitäten 55 %, die 10-Jahres-Überlebensrate wird mit 38 % angegeben^{11, 12}. Ein differenzierteres Bild ergibt sich, vergleicht man die 5-Jahres-Überlebensrate der einzelnen Tumorstadien. Während im Stadium I die 5-Jahresüberlebensrate bei über 90 % liegt, sind es im Stadium II nur noch etwa 60 %, im Stadium III ca. 25 % und im Stadium IV nur 2 – 5 %¹. Als Hauptgründe für diese schlechte Überlebensprognose seien nochmals die oft späte Diagnosestellung sowie eine inadäquate Erstbehandlung der WTS neben den besonderen tumorbiologischen, nur molekular erfassbaren Eigenschaften genannt. Eine frühe und umfassende Ausnutzung der diagnostischen Möglichkeiten ist für eine erfolgreiche Therapieplanung und die Senkung der Mortalitätsrate unerlässlich¹³.

Die radikale chirurgische Entfernung des Tumors (R0-Resektion) bildet die Hauptsäule der Therapie von WTS. Dabei ist darauf zu achten, dass WTS zur Bildung von so genannten „skip“-Metastasen (mikroskopisch kleine Tumornester, einige Zentimeter vom Tumorherd entfernt) neigen. Dies erfordert vor allem die Mitnahme der potenziellen Lokalisationsgebiete für „skip“-Metastasen, da sich daraus mit großer Wahrscheinlichkeit Lokalrezidive entwickeln können¹⁴. Auf Grund der bereits erwähnten Lokisationsvielfalt von WTS ergibt sich für jeden Patienten ein individuelles chirurgisches Behandlungskonzept. Es ist weitgehend unmöglich, für jede denkbare Situation eine genaue chirurgische Handlungsanweisung zu geben. Trotzdem konnten aber einige wichtige Grundprinzipien herausgearbeitet werden, die an jeden WTS-Patienten individuell anzupassen sind¹⁵.

Weichteiltumoren zeigen eine ausgeprägte Resistenz gegenüber Strahlen- und Chemotherapie. Diese Therapieformen, wie auch Hyperthermie, spielen bei der Planung eines Gesamttherapiekonzepts keine kurative, sondern nur untergeordnete Rolle. Die Anwendung der Chemotherapie zeigt nur eine geringe Verbesserung des Gesamtüberlebens. Die Empfindlichkeit von WTS des Erwachsenen gegenüber Zytostatika ist nur mäßig¹⁶. Auch durch die Anwendung der Hochdosis-Chemotherapie konnte keine wesentliche Verbesserung erzielt werden¹⁷. Eine Ausnahme bildet die isolierte Extremitätenperfusion mit Zytostatika. Durch die außerordentlich hohen Dosierungen der Zytostatika konnten Ansprechraten von bis zu 90 % erzielt werden¹⁸. Eine individuelle Aussage über das Ansprechen der Therapie ist, wie auch bei der Strahlentherapie, nicht möglich; selbst bei gleicher klinischer Konstellation kann der Therapieerfolg stark differieren.

Es hat sich gezeigt, dass das Grading die beste Korrelation zur Prognose besitzt. Als weitere Prognosemarker anerkannt sind i.) Tumorentität, ii.) die Tumorlokalisierung, iii.) die Größe und iv.) die Tiefe des Tumors. Außerdem haben sowohl die Radikalität des chirurgischen Eingriffs als auch die Realisierung eines multimodalen Therapiekonzepts eine prognostische Relevanz¹⁹. Trotz intensiver Bemühungen bezüglich der Prognosefaktoren ist es jedoch bis heute nahezu nicht möglich, eine genaue Aussage für kleinere Patientenkollektive oder gar für einen einzelnen Patienten zu treffen, da die an größeren Fallzahlen ermittelten und gesicherten prognostischen Marker eine erhebliche individuelle Varianz aufweisen. Die sowohl klinisch als auch histopathologisch bereits erwähnte große Variabilität der WTS zeigt den Bedarf an molekularen Markern, die für den Einzelfall eine hohe prognostische Aussagekraft haben.

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

Onkologie und der Chirurgie. Die wesentlichen Schwierigkeiten im Umgang mit WTS seien an dieser Stelle noch einmal kurz zusammengefasst:

- WTS sind durch eine hohe Variabilität in Bezug auf die Histologie und in ihrem biologischen Verhalten charakterisiert. Eine individuelle Prognose zu erstellen, ist auf Grund der Varianz der biologischen Merkmale nicht möglich.
- Tumoren der Weichgewebe kommen sehr selten vor und werden oft spät diagnostiziert. Daher gibt es nur an spezialisierten Tumorzentren ausreichend Erfahrung im diagnostischen und therapeutischen Umgang mit WTS.
- WTS besitzen trotz radikaler Tumorresektion eine sehr hohe Neigung zu Rezidiven. Als Ursache wird die frühe Aussaat von so genannten „skip“-Metastasen angesehen.
- Ein weiteres Merkmal ist die ausgeprägte Resistenz von WTS gegenüber der Behandlung mit Bestrahlung und Chemotherapie, außerdem ist die Metastasierung sehr schwer vorhersagbar und mit einer für den Patienten schlechten Prognose verbunden.

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

1.2 Molekulare Prognosefaktoren für Weichteilsarkome

Ein charakteristisches Merkmal von Tumorzellen ist die Vielfalt an physiologischen Veränderungen. Dazu zählen Alterationen auf DNA- und RNA-Ebene, ebenso eine veränderte Proteinexpression. Die Tumorgenese ist ein komplexer Prozess, in dem alle diese Veränderungen auf unterschiedliche Weise ineinander greifen und so das Tumorstadium vorantreiben. Dabei handelt es sich zum einen um Mutationen, Genamplifikationen bzw. -verluste, quantitative und qualitative Veränderungen der mRNA, der Translationseffizienz und des Zeitpunkts der Expression bestimmter Gene (Zellzyklusphasen). All dies hat schließlich Einfluss auf die Menge und nicht zuletzt auf die Funktionalität von Proteinen.

Für die Tumorgenese sind vor allem Gene/Proteine von entscheidender Bedeutung, die die Zellproliferation anregen können. Diese werden als Onkogene (Onkoproteine) bezeichnet und sind zumeist überexprimiert. Eine zweite Gruppe von Faktoren wird als Tumorsuppressorgene (TSG) bezeichnet; deren Aufgabe ist die Hemmung der Zellteilung und die Induktion des programmierten Zelltods. TSG werden häufig durch Mutationen inaktiviert.

Onkoproteine sind Bestandteile der Signalwege von Wachstumsfaktoren, dazu zählen außerdem deren Rezeptoren sowie Proteinkinasen und Transkriptionsfaktoren. In Tumoren liegen Onkogene häufig amplifiziert und/oder mutiert vor. Daraus resultiert eine erhöhte Expression und damit verbunden eine Überfunktion des Proteins („gain of function“). *Tumorsuppressorproteine* besitzen eine wachstumshemmende und zumeist differenzierungsinduzierende Funktion. Des Weiteren wirken sie als Transkriptionsfaktoren. TSG sind in Tumoren häufig mutiert bzw. deletiert, woraus ein teilweiser oder vollständiger Verlust der Funktionalität resultiert („loss of function“).

Die wichtigsten genetischen Veränderungen in WTS betreffen die Onkogene *MDM2* sowie das TSG *TP53*. Etwa 30 % aller Tumoren tragen Mutationen in der *Ras*-Genfamilie; ein Ereignis, das oft schon relativ frühzeitig im Tumorprozess auftritt. Der Gegenspieler des *TP53*-Gens, das Onkogen *MDM2*, liegt in nahezu einem Drittel aller WTS amplifiziert vor²⁰. Das *CDK4*-Gen, welches wie *MDM2* auf dem Chromosom 12 lokalisiert ist, kann zusammen oder unabhängig vom *MDM2*-Gen in bis zu 11 % der WTS amplifiziert sein^{21, 22}. Mit einem Anteil von bis zu 16 % sind Mutationen im *TP53*-Gen eine weitere genetische Veränderung in Tumoren²³. Die meisten der beschriebenen Mutationen konzentrieren sich auf mehrere Kodone in der Kerndomäne von *TP53*, den so genannten „hot spots“.

Für WTS gibt es bis jetzt nur sehr vereinzelte Ergebnisse zur Prognoserelevanz von Alterationen in Onkogenen und TSG bzw. deren Genprodukten. Es zeigt sich aber, dass in WTS das Onkogen *MDM2* und das TSG *TP53* eine zentrale Rolle spielen.

In einer Studie von Taubert *et al.*²³ wurde die bisher größte Gruppe von insgesamt 146 WTS-Patienten auf Mutationen im *TP53*-Gen hin untersucht. Dabei konnten 16 % der Patienten identifiziert werden, deren Tumoren ein mutiertes *TP53*-Gen enthielten^{23, 24}. In einer multivariaten Cox-Analyse zeigte sich, dass die Art der Mutation einen Einfluss auf die Prognose der Patienten hat. WTS-Patienten mit so genannten non-frameshift-Mutationen (Mutationen, die keine Verschiebung des Leserahmens bewirken) besitzen ein 2,4-fach erhöhtes Risiko am Tumor zu versterben als Patienten ohne *TP53*-Mutation²⁴.

Bei der Betrachtung der TP53-Proteinexpression zeigt sich, dass diese im Allgemeinen mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist. Es ist jedoch einschränkend zu sagen, dass

die prognostische Relevanz des TP53-Nachweises sehr stark vom verwendeten Antikörper in der immunhistochemischen Untersuchung abhängig ist²⁵.

Das *MDM2*-Gen ist in WTS in bis zu 30 % der Fälle amplifiziert²⁰, wobei die Amplifikationsfrequenz zwischen den einzelnen WTS-Entitäten stark variiert: während in LMS kein bisher untersuchter Tumor ein amplifiziertes *MDM2*-Gen aufweist, lag in ca. 30 % der untersuchten Liposarkome das *MDM2*-Gen amplifiziert vor. Weiterhin konnte in zahlreichen WTS sowohl eine Überexpression der mRNA²⁶ als auch des Proteins nachgewiesen werden^{27, 28}. Von zwei Arbeitsgruppen wurde eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der MDM2-Proteinüberexpression und einer schlechten Prognose nachgewiesen. Während sich die von Cordon-Cardo *et al.*²⁹ publizierten Daten auf eine univariate Analyse beziehen, konnte unsere Arbeitsgruppe in einer multivariaten Cox-Regression an über 215 Patienten zeigen, dass die Überexpression des MDM2-Proteins ein unabhängiger Prognosefaktor für WTS ist^{30, 31}. In Abhängigkeit vom eingesetzten Antikörper erwies sich die alleinige MDM2-Überexpression als negativer Prognosemarker (RR=2,6; p=0,0035). Es zeigte sich, dass Patienten, die zusätzlich das TSG *TP53* überexprimieren, ein 4,6-fach erhöhtes Risiko besitzen (p=0,00001), am Tumor zu versterben. Für Patienten mit Extremitätentumoren war die prognostische Relevanz dabei am höchsten (RR=19; p=0,006)³². Diese Daten zeigen, dass die gemeinsame Überexpression von MDM2 und TP53 ein unabhängiger negativer Prognosefaktor für WTS ist.

Ein anderes Bild ergibt sich, wenn man die *MDM2*-mRNA-Expression und die Prognose korreliert, denn in diesem Fall besitzen Patienten mit einer sehr niedrigen mRNA-Menge die schlechtere Prognose (RR=13) im Vergleich zu Patienten mit einer leicht erhöhten *MDM2*-mRNA-Expression³³. Demgegenüber weisen Patienten mit einer stark erhöhten *MDM2*-mRNA-Menge ebenso eine schlechtere Prognose auf. Für diese Patienten ist das Risiko am Tumor zu versterben 3,2-fach erhöht³³. Diese Befunde können dadurch erklärt werden, dass im Tumor die Menge an *MDM2*-mRNA-Transkripten, die vom TP53-sensitiven Promotor P2 stammen, auf Grund einer TP53-Fehlfunktion reduziert ist³⁴. Eine leicht erhöhte *MDM2*-mRNA-Menge entspricht daher eher dem physiologischen Normalzustand und MDM2 kann so seine Funktionen, wie z.B. die Regulierung der TP53-Menge, erfüllen. Demzufolge kann eine veränderte *MDM2*-mRNA-Expression (erhöht oder vermindert) als Ausdruck einer biologisch relevanten Fehlregulation aufgefasst werden.

1.3 Das Onkogen *MDM2* (*HDM2*)

Die Amplifikation von Genen und die häufig daraus resultierende Überexpression von Proteinen, die das Zellwachstum kontrollieren, ist ein Mechanismus, durch den diese Faktoren onkogene Eigenschaften erlangen können. In der spontan transformierten Mauszelllinie 3T3DM liegen amplifizierte DNA-Sequenzen in Form von „double minute“ Chromosomen (dmin) vor, von denen bestimmte Bereiche in bis zu 50 Kopien auftreten³⁵. Man nahm an, dass auf diesen dmins Gene kodiert sind, die durch die Überexpression den Zellen einen Wachstumsvorteil verschaffen und für die onkogenen Eigenschaften verantwortlich sind. Bei der Analyse der einzelnen Gene stellte sich heraus, dass nur das Produkt des murine double minute Gen 2 (*MDM2*) in der Lage ist, nach Transfektion in Fibroblasten, die Zellen zu transformieren³⁶. Dies äußerte sich in unkontrolliertem und tumorauslösendem Wachstum der Zellen. Das MDM2-Onkoprotein geriet anschließend sehr schnell in das Blickfeld des Interesses, als entdeckt wurde, dass es an TP53 binden³⁷ und diesen effizient inaktivieren kann³⁸.

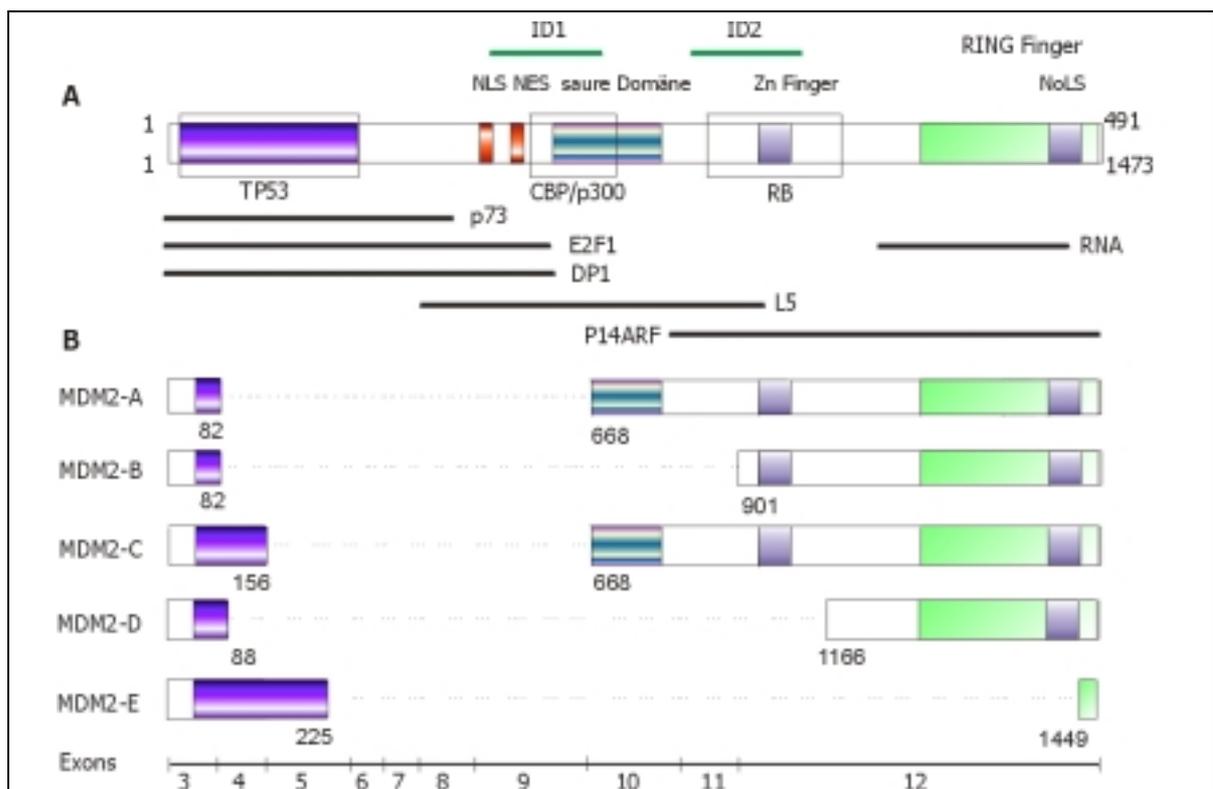


Abb. 1-1: Struktur des Onkogens *MDM2* und verschiedener Isoformen

A. Das Produkt des Onkogens *MDM2* besteht aus 491 Aminosäuren (die kodierende Region der cDNA aus 1473 Nukleotiden), die funktionellen Domänen sind durch farbige Boxen, die Bindungsstellen mit weiteren Proteinen durch horizontale Linien symbolisiert. ID1 und ID2 repräsentieren die beiden wachstumshemmenden Domänen. **B.** Durch RT-PCR konnten verschiedene alternativ (A, B, C) und aberrant (D, E) gespleißte mRNA-Transkripte detektiert werden⁴². Diesen verkürzten Transkripten fehlen Teile der TP53-bindenden Domäne, sowie der NLS und der NES-Sequenz. Die Zahlen repräsentieren jeweils das letzte und das erste in der cDNA der Spleißform enthaltene Nukleotid in Bezug auf die full-length *MDM2*-cDNA. NLS bzw. NoLS – Kernlokalisierungssequenz, NES – Kernexportsequenz.

Das humane Homolog (HDM2) wurde auf der Chromosomenregion 12q13-14 lokalisiert, einer Region, die in nahezu 1/3 aller Sarkome amplifiziert vorliegt³⁹. In der Literatur wird oftmals noch die Bezeichnung hMDM2 bzw. ebenfalls MDM2 verwendet. Im Folgenden wird daher generell von MDM2 gesprochen. Von MDM2 sind verschiedene Isoformen bekannt, die durch die Nutzung unterschiedlicher Promotoren oder durch alternatives Spleißen entstehen⁴⁰⁻⁴². Das größte, als full-length (FL) bezeichnete Transkript kodiert für ein Polypeptid, das aus 491 Aminosäuren besteht und im Polyacrylamid-Gel bei 90 kDa migriert (Abb. 1-1). Mit der N-terminalen Domäne kann MDM2 an die α -Helix der transaktivierenden Domäne von TP53 binden. Des Weiteren kann MDM2 mit vielen anderen Proteinen wechselwirken. Die am stärksten konservierte Domäne des MDM2-Proteins ist die C-terminale RING-Finger-Region, die eine Ubiquitin-Ligase-Aktivität für TP53 besitzt, wodurch es TP53 für den Abbau in den Proteasomen markiert. Somit kann MDM2 durch Bindung an TP53 nicht nur dessen transaktivierende Domäne blockieren, sondern auch die Degradation des Tumorsuppressors einleiten^{38, 43, 44}. Gleichzeitig wird durch wt-TP53 die Expression des *MDM2*-Gens

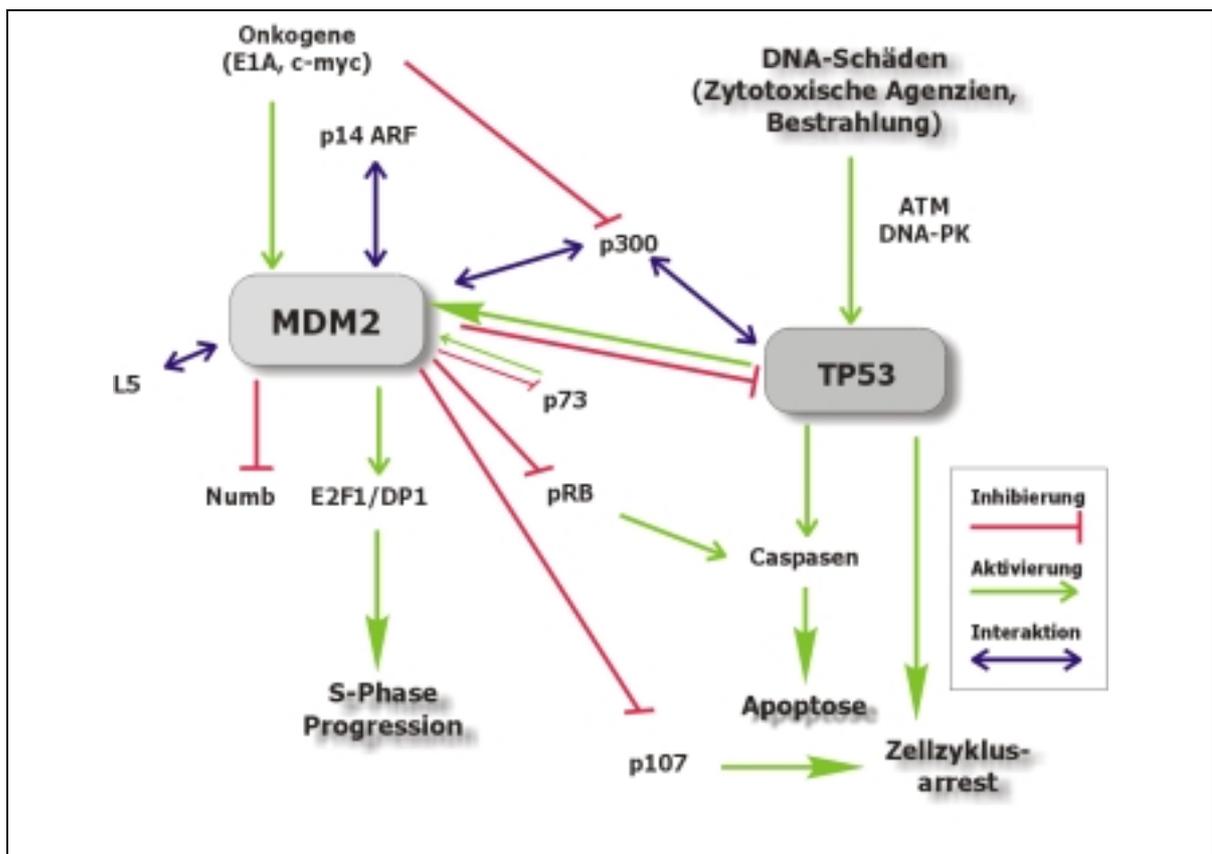


Abb. 1-2: MDM2 im Zusammenspiel mit anderen regulatorischen Proteinen

Die zentrale Interaktion ist der MDM2-TP53-autoregulatorische Feedback-Loop, über den MDM2 die TP53-Aktivität und die Proteinmenge reguliert. So beeinflusst MDM2 die TP53-vermittelten Ereignisse wie Zellzyklusarrest und Apoptose. Proteine wie p14ARF oder p300 können die Aktivität von MDM2 regulieren und auf diese Weise TP53 stabilisieren. Weitere Details s. Text.

induziert. Dies geschieht über den TP53-spezifischen Promotor P2, der im Intron I des *MDM2*-Gens lokalisiert ist ⁴⁵. Das Produkt des Onkogens *MDM2* und der Tumorsuppressor TP53 sind somit durch einen so genannten autoregulatorischen „Feedback“-Loop miteinander verbunden ⁴⁶. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass das Transkript, das vom P2-Promotor abgelesen wird, einen verkürzten 5'-untranslatierten Bereich aufweist und im Vergleich zum P1-Transkript wesentlich effektiver translatiert wird. Somit trägt die durch TP53 induzierte *MDM2*-Expression zu einem beschleunigten Abbau von TP53 bei ⁴⁷.

Unter normalen physiologischen Bedingungen bindet *MDM2* an TP53 und trägt so dazu bei, die Menge an freiem (funktionell aktivem) TP53 auf einem geringen Niveau zu halten ⁴⁸. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Beobachtung, dass *MDM2* knock-out-Mäuse sehr früh in der Entwicklung sterben, währenddessen sich so genannte „double-knockout“-Mäuse für *MDM2* und *TP53* weitestgehend normal entwickeln ^{49, 50}. Diese Ergebnisse zeigen, dass *MDM2* eine entscheidende Bedeutung bei der Regulation der TP53-Aktivität besitzt. In der Abwesenheit von *MDM2* kommt es offensichtlich zu einer aberranten Aktivierung von TP53, wodurch es schließlich zur Ausprägung eines lethalen embryonalen Phänotyps kommt. Die Überlappung der *MDM2*-bindenden und der transaktivierenden Domäne von TP53 hat zur Folge, dass von *MDM2* gebundenes TP53 transkriptionell inaktiv ist ⁴³. Außerdem kann *MDM2* direkt an TP53-sensitive Promotoren binden und so die Transkription von TP53-Zielgenen inhibieren ⁵¹. Es stellt sich die Frage, wenn *MDM2* allein durch die Bindung an die transaktivierende Domäne die TP53-Aktivität weitestgehend blockieren kann, warum induziert es anschließend durch die Ubiquitin-Ligase-Aktivität auch noch den Abbau von TP53. Eine einfache Erklärung könnte sein, dass der Abbau in den Proteasomen lediglich der zweite Schritt der TP53-Inaktivierung ist, und die Zelle auf diese Weise überflüssige *MDM2*-TP53-Komplexe „entsorgt“. Es ist aber auch denkbar, dass durch die Bindung von *MDM2* nicht alle Funktionen von TP53 inaktiviert sind. Einige Aktivitäten sind unabhängig von der TP53-Transaktivierung, z.B. Basen-Exzisions-Reparatur ⁵², die DNA-Doppelstrang-Exonuklease-Aktivität ⁵³ und auch bestimmte Wege der Apoptoseinduktion ⁵⁴. Es kann somit Situationen geben, in denen es für die Zelle vorteilhaft ist, lediglich die Transaktivierungsfunktion von TP53, nicht aber andere Aktivitäten zu inhibieren.

MDM2 bindet bevorzugt an TP53, wenn letzteres als Tetramer vorliegt ⁵⁵. In der Zelle liegt zusätzlich immer ein geringer Anteil an TP53-Monomeren vor. Dadurch wird sichergestellt, dass TP53 nicht vollständig inhibiert wird, sondern im Falle einer DNA-Schädigung (nach Bestrahlung oder Chemotherapie) sofort aktiviert werden kann. Eine weitere Möglichkeit der TP53-Aktivierung nach der Einwirkung von exogenen Stressfaktoren ist die Dissozia-

tion des MDM2-TP53-Komplexes in Folge der Phosphorylierung des Serin 20 von TP53 durch die Chk2 Kinase ⁵⁶.

Obwohl es zahlreiche experimentelle Beweise für TP53-unabhängige Funktionen von MDM2 gibt, scheinen diese jedoch nicht essenziell für die normale embryonale Entwicklung zu sein, wie das Beispiel der „double-knockout“-Mäuse zeigt ^{49, 50}. Vielmehr scheinen diese alternativen Funktionen von MDM2 erst später an Bedeutung zu gewinnen und die Tumorentwicklung voranzutreiben, denn:

1. Tumoren, die sowohl ein amplifiziertes *MDM2*-Gen als auch ein mutiertes *TP53*-Gen aufweisen, sind aggressiver als Tumoren, die jeweils nur eine Alteration zeigen ²⁹.
2. Die gewebespezifische Verteilung von *MDM2*-Amplifikationen unterscheidet sich deutlich von der für *TP53*-Mutationen ²⁰.
3. Spleißformen von MDM2, denen die TP53-bindende Domäne zumindest teilweise fehlt, besitzen weiterhin das Potenzial, Fibroblastenzellen zu transformieren ⁴².

Das Potenzial von MDM2-Veränderungen drückt sich u.a. darin aus, dass die Inzidenzrate von Sarkomen in MDM2-überexprimierenden transgenen Mäusen wesentlich höher als in TP53-null-Mäusen ist. Das gleiche Ergebnis erhält man, wenn MDM2 in TP53-null-Mäusen überexprimiert wird. Dies lässt den Schluss zu, dass andere, TP53-unabhängige Mechanismen die Bildung der Sarkome beeinflussen ⁵⁷.

Obwohl unbestritten ist, dass TP53 der wichtigste Bindungspartner für MDM2 in der Zelle ist (MDM2 wird auch als „big brother“ von TP53 bezeichnet), gibt es eine Reihe von Proteinen, die an MDM2 binden können und deren Aktivität dadurch beeinflusst wird (Abb. 1-2). Diese Interaktionen sind bis dato jedoch bei Weitem nicht so intensiv untersucht worden, wie die von MDM2 und TP53. Einige dieser Faktoren und ihre physiologischen Wirkungen seien hier stichpunktartig zusammengefasst:

- MDM2 kann die antiproliferative Wirkung des Retinoblastomgen-Produkts (Rb) unterdrücken. MDM2 bindet an Rb und verhindert so den Rb-vermittelten G₁-Zellzyklus-Arrest ⁵⁸. Weiterhin kann MDM2 auch direkt mit den durch Rb regulierten Transkriptionsfaktoren E2F1/DP wechselwirken, was zu einem Übergang der Zellen in die S-Phase führt ⁵⁹. Die Beeinflussung des Übergangs in die S-Phase ist ein weiterer Hinweis auf das onkogene Potenzial von MDM2.
- Ein weiterer Bindungspartner von MDM2 ist das Protein Numb, das ähnlich wie TP53 eine Schlüsselstellung bei der Regulation von Zellzyklus und Apoptose einnimmt. Die Bindung von MDM2 an Numb führt (wie bei TP53) zu dessen Degradation und somit

zu einer Reduzierung der steady-state-Konzentration von Numb⁶⁰. Dieses Beispiel zeigt, dass MDM2 die Stabilität regulatorischer Proteine steuert.

- Der Tumorsuppressor p14ARF, ein alternatives Produkt des TSG-Locus *p16^{Ink4a}*, ist ebenfalls ein Bindungspartner von MDM2. Die Bindung von ARF an MDM2 blockiert den MDM2-vermittelten Abbau von TP53. Dadurch kann ARF, wie auch durch die direkte Bindung an TP53, zu einer Stabilisierung von TP53 beitragen⁶¹ und als „upstream“-Aktivator von TP53 wirken. Da sich die Bindungsdomänen von MDM2 für ARF und TP53 nicht überlappen, kann es zur Bildung von ternären Komplexen aus MDM2, ARF und TP53 kommen⁶². Es ist bislang aber unklar, welche Funktionen von TP53 in diesen Komplexen blockiert sind bzw. noch ausgeführt werden können. Während TP53 durch ARF aktiviert wird, kann es aber gleichzeitig die Expression von ARF herunterregulieren⁶³. Diese Ergebnisse sprechen somit für die Existenz eines autoregulatorischen „feedback-loops“, durch den TP53 und ARF miteinander verbunden sind. Vergleichbar ist dies mit dem von MDM2 und TP53 seit langen bekannten Wechselverhältnis.
- Der transkriptionelle Koaktivator p300 kann, ebenso wie ARF, sowohl an MDM2 als auch an TP53 binden⁶⁴. Einerseits ist die Bindung von p300 an TP53 essenziell für dessen transkriptionelle Aktivität⁶⁵⁻⁶⁸, andererseits trägt die Bindung von p300 an MDM2 zur Verstärkung der TP53-destabilisierenden Wirkung von MDM2 bei. Es konnte gezeigt werden, dass mutiertes MDM2, das an TP53, nicht aber an p300 binden kann, seine Fähigkeit verliert, TP53 abzubauen⁶⁹. Ebenso sind TP53-Mutanten, die zwar MDM2, jedoch nicht p300, binden können, resistent gegenüber einem MDM2-vermittelten Abbau. Angesichts dieser Ergebnisse lässt sich schlussfolgern, dass die Wechselwirkung von MDM2, TP53 und p300 einerseits zu einer p300-abhängigen transkriptionellen Aktivität von TP53 beitragen und andererseits den MDM2-vermittelten Abbau von TP53 in den Proteasomen beschleunigen kann.

Die Umstände seiner Entdeckung als vielfach amplifiziertes Gen, das nach Überexpression in der Lage ist, Fibroblasten zu transformieren und in Mäusen das Tumorwachstum auszulösen³⁶, führte zu der Auffassung, dass es sich bei *MDM2* um ein Onkogen handelt. Weitere Hinweise auf das onkogene Potenzial von MDM2 lieferten die Befunde, dass MDM2 an den Tumorsuppressor TP53 binden³⁷ und diesen inaktivieren kann³⁸. In den letzten Jahren wurden jedoch einige Ergebnisse beschrieben, die sich nicht mit dem Bild von *MDM2* als Onkogen in Einklang bringen lassen. So konnte beispielsweise von mehreren Arbeitsgruppen unabhängig voneinander gezeigt werden, dass eine erhöhte *MDM2*-mRNA-Expression in WTS, Ovarial- und Lungenkarzinomen mit einer verbesserten Prognose für die Patienten verbun-

den ist ^{33, 70, 71}. Weiterhin wurde beobachtet, dass MDM2 in NIH-3T3 Fibroblasten den Zellzyklus beim Übergang von der G₁- zur S-Phase arretiert ⁷². Durch die Entfernung von zwei, als wachstumsinhibierende Domänen (ID) bezeichneten Sequenzen konnte dieser Arrest wieder aufgehoben werden (Abb. 1-1). Ein zusätzlicher Aspekt in diesem Zusammenhang ist die Beobachtung, dass MDM2 in der Lage ist, in wt-TP53 defizienten Zelllinien ^{73, 74} sowie in *Drosophila* (Prof. M. Oren, persönl. Mitteilung) Apoptose zu induzieren.

Eine zumindest partielle Erklärung für diese Diskrepanz zwischen onkogenen Eigenschaften auf der einen und Funktionen wie Apoptoseinduktion auf der anderen Seite könnte möglicherweise die von der Gruppe um J. Lunec nachgewiesene Existenz von alternativen Spleißformen der *MDM2*-mRNA bieten ⁴². Vor Beginn dieser Arbeit sind insgesamt 5 alternativ bzw. aberrant gespleißte mRNA-Transkripte in Blasen- und Ovarialkarzinomen beschrieben worden ⁴² (Abb. 1-1). Diesen verkürzten Transkripten fehlen unterschiedlich große Teile der TP53-bindenden und der sauren Domäne sowie die Kernlokalisierungs- und der Kernexportsequenz (NLS bzw. NES). In einem *in vitro*-Assay zeigte sich, dass alle Isoformen in der Lage sind, Fibroblastenzellen zu transformieren. Sie besitzen demnach tumorigene Eigenschaften. Bemerkenswert ist außerdem eine Korrelation zwischen dem Auftreten von Spleißformen und einem aggressiveren Tumorverhalten (höherer Tumorgrad, Tumorstadium, Invasivität) in verschiedenen Tumorarten ⁴². Die Tatsache, dass die bisher beschriebenen Isoformen von MDM2 nicht mehr an TP53 binden können, hat u.a. zur Folge, dass der autoregulatorische MDM2-TP53-feedback-Loop aus dem Gleichgewicht gerät. Dadurch wird auf diese Weise unter Umständen die Tumorbildung gefördert. Es wird auch vermutet, dass bestimmte onkogene Eigenschaften von MDM2 in der C-terminalen Region (enthält den RING-Finger) lokalisiert sind und diese in den Isoformen verstärkt zur Geltung kommen.

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

1. Ist die Expression von *MDM2*-Spleißformen auf Tumoren beschränkt oder findet man sie auch in Normalgewebe?
2. Wenn ja, haben die Produkte der alternativen Spleißformen eine normale physiologische Bedeutung, z.B. bei der Differenzierung?
3. Welche der Aktivitäten (Transformation, Apoptoseinduktion usw.) lassen sich dem „full-length“-MDM2 (FL-MDM2) bzw. den Spleißformen zuordnen?
4. Welchen Einfluss haben die Spleißformen auf die TP53-Stabilität und -Aktivität?

5. Gibt es einen Zusammenhang zwischen der Amplifikation des *MDM2*-Gens und dem Auftreten von Spleißformen?
6. Hat die Expression von *MDM2*-Spleißvarianten einen Einfluss auf die individuelle Prognose eines Patienten und das Ansprechen auf bestimmte Therapieformen?

Die oben genannten Fragen zeigen, dass die Analyse der Expression und der Funktion von alternativen Spleißformen der *MDM2*-mRNA in Tumoren im Allgemein und bei WTS im Speziellen eine außerordentliche Bedeutung hat. Gleichzeitig wird auch die Notwendigkeit deutlich, Methoden zu entwickeln, die eine schnelle Charakterisierung von Spleißformen ermöglicht, da auch von vielen anderen Onkogenen und TSG Spleißvarianten exprimiert werden ⁷⁵. Die Bearbeitung dieses Fragenkomplexes mit dem Ziel zumindest einer teilweisen Beantwortung war ein wesentliches Ziel der vorliegenden Arbeit.

1.4 Die *MDM2*-*TP53*-Interaktion als Ziel einer therapeutischen Intervention

1.4.1 Gentherapie – eine allgemeine Einführung

Der Begriff Gentherapie beinhaltet ursprünglich die Behandlung von Krankheiten durch das Ersetzen des Gens, das die Krankheit verursacht. In der heutigen Zeit ist die Definition von Gentherapie jedoch wesentlich weiter gefasst. Sie schließt außerdem sowohl das Einschleusen von genetischem Material in die Zelle ein, um eine Expressionssteigerung eines Gens zu erreichen als auch die Einführung von neuen Genen oder Substanzen, die die Expression z.B. von Onkogenen unterdrücken (z.B. durch Antisense-Oligonukleotide, Ribozyme, DNAsen). Die ersten gentherapeutischen Studien wurden zur Heilung von so genannten monogenen Erkrankungen durchgeführt, d.h. von Krankheiten, die durch ein einzelnes mutiertes Gen hervorgerufen werden. Dazu zählen u.a. Cystische Fibrose, Adenosin-Desaminase (ADA)-Mangel, Hämophilie A und B und Phenylketonurie ⁷⁶. 1990 wurde erstmals eine Gentherapie zur Heilung des ADA-Mangels durchgeführt. Dabei erfolgte ein *ex vivo* Gentransfer in Lymphozyten, so dass nach deren Reimplantation die zelluläre und humorale Immunität wieder hergestellt war ⁷⁷.

Für die erfolgreiche Therapie von Erkrankungen mit Hilfe der Gentherapie ist es von großer Bedeutung, Transfektionssysteme zu entwickeln, die einer Vielzahl von Anforderungen an die Sicherheit und die Effizienz gerecht werden müssen.

Die Anforderungen an ein ideales Gen-Transfer-System lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- hohe Gentransfer-Effizienz,
- die Möglichkeit sehr große Gene und DNA-Konstrukte gezielt (in bestimmte Zellen/Gewebe, in den Zellkern) zu transportieren,
- geringes Mutations- und Rekombinationsrisiko durch den Gentransfer
- kontrollierbare Zytotoxizität und geringe Immunogenität,
- einfache Konstruktion und Manipulierbarkeit des Transportsystems,
- sichere und einfache Applizierbarkeit.

Trotz weltweiter Anstrengungen ist es bis heute nicht gelungen, ein spezifisches Transportsystem zu entwickeln, das alle oben genannten Anforderungen erfüllt. Viele verschiedene Verfahren zum Gentransfer sind experimentell getestet worden und haben nach einem „initial proof-of-concept“ das Potenzial dem idealen Gen-Transfer-System nahe zu kommen. Im Folgenden sollen kurz die Möglichkeiten dargestellt werden, die gewünschten DNA-Konstrukte in die Zelle zu transportieren.

1.4.2 Vektorsysteme

Die Transfektion mit Genen, aber letztlich auch die Transfektion mit jeglicher extrazellulärer Nukleinsäure, wird methodisch mit viralen und nichtviralen Transfektionstechniken vorgenommen. Einige der Vor- und Nachteile der verschiedenen Vektorsysteme sind in Tabelle 1-2 zusammengefasst; die andauernde Diskussion darüber soll hier jedoch nicht weiter aufgegriffen, sondern die einzelnen Systeme kurz vorgestellt werden, um die Anforderungen an ein ideales Transportvehikel zu verdeutlichen.

Auf Grund ihres Lebenszyklus sind Säugerviren für den Einsatz als Gentransportvehikel prädestiniert. Diese Viren sind in der Lage, eine Wirtszelle zu infizieren, ihr genetisches Material in die Zelle zu transferieren und dort zu exprimieren. Ein weiterer Vorteile viraler Vektorsysteme ist die sehr hohe Transfektionseffizienz. Nichtvirale Vektoren, wie z.B. Liposomen, sind zwar apathogen, jedoch bisher ineffizienter in Bezug auf den Transport des Zielgens in den Zellkern. Es ist jedoch einschränkend zu sagen, dass die Transfektionseffizienz *per se* vom Zelltyp abhängig ist und bei anderen Zellen durchaus höher sein kann.

Gentherapeutische klinische Studien mit Retroviren machen einen Anteil von über 30 % aus, während Adenoviren das am zweithäufigsten verwendete virale Vektorsystem darstellen. Alle anderen viralen Vektoren (z.B. EBV, IFV A) spielen in der klinischen Praxis noch eine untergeordnete Rolle. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit bestand u.a. in der Etablie-

zung einer Gentransferstrategie, die die Konstruktion eines adenoviralen Vektors einschloss, mit dessen Hilfe kurze RNA-Fragmente (z.B. Antisense-Oligonukleotide [ODNs]) exprimiert werden konnten. Daher sollen Adenoviren unter dem Gesichtspunkt ihrer Eignung als Gentransfervehikel vorgestellt werden.

Tab. 1-2: Vor- und Nachteile viraler und nicht-viraler Vektorsysteme

<i>virale Vektorsysteme</i>		<i>nicht-virale Vektorsysteme</i>	
<i>Vorteile</i>	<i>Nachteile</i>	<i>Vorteile</i>	<i>Nachteile</i>
hohe Gentransfer-effizienz	Immunogenität	kaum immunogen	geringe Gentransfer effizienz
Einbau der DNA in das Wirtsgenom (Retroviren)	Pathogenität	nicht pathogen	nur transiente Expression des Zielgens
Langzeitexpression des Zielgens	Größe des therapeutischen Gens beschränkt	kostengünstig in hoher Reinheit zu produzieren	

Humane Adenoviren gehören zur Gruppe der Parvoviren, die als Erbinformation doppelsträngige DNA enthalten. Adenoviren rufen beim Menschen normalerweise Entzündungen der Schleimhäute hervor (z.B. Entzündungen des oberen Respirationstraktes), die in den meisten Fällen einer Erkältungen entsprechen^{78, 79}. Adenovirale Genvektoren (Ad Vektoren) haben sich als sehr viel versprechende Transportsysteme in Bezug auf die oben genannten Anforderungen herausgestellt. Die Gründe seien kurz zusammengefasst:

1. Ad Vektoren sind als Modellsysteme für die Genregulation in Säugerzellen sehr intensiv untersucht und charakterisiert worden,
2. Ad Vektoren haben ein für Viren mittelgroßes Genom, wodurch es möglich ist, Vektoren mit einer vergleichsweise hohen Transportkapazität zu konstruieren,
3. die Vektoren sind sehr einfach zu handhaben, sind relativ stabil und können in großen Mengen hergestellt werden (bis zu 10^{12} plaque forming units [PFU]/ml),
4. das Virusgenom muss zur Expression der eingeschleusten Gene nicht in das Wirtsgenom eingebaut werden, dadurch verringert sich die Genotoxizität (Rekombinationsrisiko) erheblich,
5. in den bisherigen Studien haben sich adenovirale Vektoren als sehr sicher herausgestellt, sie weisen nahezu keine Nebenwirkungen auf.

Rekombinante adenovirale Vektoren können sehr effizient eine Vielzahl sich teilender und nicht teilender Zellen infizieren. Einer lang anhaltenden Fremdgenexpression des gewünschten Proteins sind jedoch Grenzen gesetzt. Die Zielzellen werden zwar von einer Vielzahl an Viren infiziert, die virale Erbinformation wird aber nicht in das Genom der Wirtszelle eingebaut. Wie bereits erwähnt, ist es aus diesem Grund notwendig, das Genom der Adenoviren dem Therapieziel anzupassen.

Das adenovirale Genom hat eine Größe von etwa 36 Kilobasen. Darauf ist die Information für etwa 30 Boten-RNA-Transkripte kodiert. Man unterscheidet dabei Bereiche, die sehr früh bzw. sehr spät während der viralen Infektion exprimiert werden. Diese Regionen werden demzufolge als „early“ bzw. „major late regions“ bezeichnet.

Aktuelle Strategien zur Optimierung adenoviraler Vektorsysteme konzentrieren sich neben der Verringerung des immunogenen Potenzials hauptsächlich auf die Erhöhung der im Virusgenom zu verpackenden DNA-Fragmente. Mit Hilfe adenoviraler Vektoren ist es heute möglich, Genfragmente von bis zu 8,5 kb zu verpacken. Die Kapazität des Vektors kann weiter erhöht werden, indem man die Regionen E1 und E3 sowie E2 und E4 durch das therapeutische Gen ersetzt. In den heute verwendeten rekombinanten Ad Vektoren ergibt sich so ein Verhältnis von adenoviraler DNA und therapeutischem Gen von etwa 4,5:1. Um die Aktivierung der Immunantwort zu unterbinden, wird zumeist die E1-Region des viralen Genoms entfernt, die für die Expression viraler Gene und die Replikation von Bedeutung ist (im weiteren als „replikations-defiziente Ad“ bezeichnet). E1-deletierte Viren können sich daher in den infizierten Zellen nicht vermehren. Zur Virusexpansion, d.h. zur Erzeugung bzw. Produktion ausreichender Virusmengen, ist aus diesem Grund eine stabil mit E1-transfizierte Zelllinie, wie z.B. 293-Zellen, nötig. Die derzeit verwendeten E1-deletierten Vektoren exprimieren nach wie vor virale Antigene nach der Infektion, wodurch eine geringe Menge adenoviraler DNA repliziert wird^{80, 81}. Die Synthese viraler Proteine stimuliert wiederum die Immunantwort gegen die infizierten Zellen. Zahlreiche Arbeitsgruppen haben daher Adenoviren konstruiert, in denen zusätzlich auch bestimmte Regionen der E2 und E4 Gene deletiert sind, was zu einer abermals reduzierten Immunogenität führt^{82, 83}. Neben der Verbesserung der adenoviralen Vektoren ist es jedoch auch erforderlich, die für die Expansion replikations-defizienter Ad nötigen Zelllinien in die Optimierung mit einzubeziehen. Insbesondere bei der Überführung der Gentherapie-Protokolle in die klinische Praxis ist es unerlässlich, eine von wt-Adenoviren freie Virusproduktion zu gewährleisten.

1.4.3 MDM2 als Ziel einer Gentherapie

Mittlerweile sind für eine Reihe von Tumorentitäten charakteristische genetische Veränderungen aufgeklärt worden, die in der Tumorgenese wahrscheinlich eine wichtige Rolle spielen. Dies trifft auch auf WTS zu. Möglicherweise ergeben sich daraus neue, innovative Therapieansätze, die gezielt auf die genetischen Alterationen in malignen Zellen ausgerichtet sind. Einige dieser experimentellen Therapien haben die Restaurierung von TSG und somit ein verbessertes Ansprechen auf Bestrahlung und Chemotherapeutika zum Ziel. Ein weiterer Ansatzpunkt ist die Inaktivierung von Onkogenen, z.B. durch die gezielte Blockierung der Expression mittels AS-ODNs, Ribo-bzw. DNAsymen.

Bei der Suche nach Angriffspunkten für eine Therapie, die auf der Beeinflussung kausaler Regulationsmechanismen basiert, deutet sich für das Onkoprotein MDM2 eine zentrale Stellung an. Da das MDM2-Protein den Abbau des Tumorsuppressors TP53 beeinflusst, ist eine MDM2-Überexpression in seiner funktionellen Auswirkung mit einer Alteration des *TP53*-Gens vergleichbar. Durch die Inhibierung der MDM2-Expression kann die Menge an MDM2-Protein in der Zelle reduziert werden, was meist zu einer Erhöhung der Menge an funktionellem TP53-Protein führt. Hierdurch sollte Apoptose induzierbar und das Ansprechen eines Tumors auf eine Chemo- oder Strahlentherapie verbessert werden können.

Ein wichtiger Parameter für eine Voraussage der Effizienz einer *MDM2*-AS-Therapie sollte die Bestimmung der individuellen und tumorspezifischen Expressionsmuster für *TP53* und *MDM2* auf RNA- und Proteinniveau sowie der *TP53*-Mutationsstatus sein⁸⁴, da die potenziellen Therapieeffekte MDM2- und TP53-dosisabhängig sind.

Eine der am häufigsten angewandten Methoden zur Inhibierung der MDM2-Expression ist die Nutzung von AS-ODNs, die komplementär zur *MDM2*-mRNA sind. Durch die Bindung der AS-ODNs an die mRNA wird die Translation verhindert und die RNase H aktiviert⁸⁵.

In mehreren *in vitro* Studien konnte an Glioblastom- und Myelom-Zelllinien die Spezifität verschiedener *MDM2* AS-ODNs nachgewiesen werden^{85, 86}. Untersuchungen zeigten, dass nach Behandlung von Tumorzellen mit *MDM2*-AS-ODNs die MDM2-Proteinmenge signifikant reduziert werden konnte. Weitere Effekte der *MDM2*-AS-ODNs waren u.a. der Wachstumsarrest der Zellen in der G₁-Phase des Zellzyklus und eine deutlich verminderte Zellvitalität. Erste Versuche an WTS-Zelllinien, die von unserer AG durchgeführt wurden, ergaben, dass es in der *MDM2*-überexprimierenden Zelllinie US8-93 zur Reduzierung der Zellkoloniebildungsrate um bis zu 80 % kam⁸⁷. Die AS-bedingten, wachstumshemmenden Effekte waren jedoch stark zelltypabhängig, denn bei der ebenfalls behandelten Zelllinie LMS6-93 (ein LMS) wurde das klonogene Überleben nur um 26 % vermindert.

Aus den bisherigen Studien in Bezug auf die Behandlung von Tumorzellen mit *MDM2*-AS-ODNs lassen sich die folgenden allgemeinen Schlussfolgerungen ziehen (Übersicht in Chen *et al.* ⁸⁵):

- *MDM2*-AS-ODNs inhibieren spezifisch die *MDM2*-Expression (auch in Zellen ohne *MDM2*-Genamplifikation),
- sie stimulieren *TP53* über eine Reduktion der *MDM2*-Proteinmenge, der *MDM2*-*TP53*-Proteinkomplexe und über einen *MDM2*-mRNA-Abbau
- eine *TP53*-Reaktivierung und Inhibierung von *TP53*-unabhängigen Onkogen-Aktivitäten des *MDM2*-Genproduktes ist in Tumoren mit vorherrschender *MDM2*-Überexpression prinzipiell erreichbar
- die konventionelle Behandlung (Radiatio/Chemotherapie) von wt-*TP53*-exprimierenden Tumoren profitiert in bestimmten Fällen von einer kombinierten AS-Therapie (unabhängig vom *MDM2*-/*TP53*-Expressionsniveau), da *TP53*-stimulierte Effekte nach einer DNA-Schädigung durch *MDM2* AS ODNs verstärkt werden
- Tumorzellen mit verringertem wt-*TP53*-Protein (z.B. heterozygote frameshift-*TP53*-Mutanten) könnten parallel mit einer wt-*TP53*-Gentherapie behandelt werden und so von einer *TP53*-Aktivierung profitieren
- nichtmaligne Zellen sind toleranter gegenüber einer temporären *MDM2*-Inhibierung, was einer indirekten Selektivität der *MDM2*-AS-Therapie auf maligne Zellen gleichkommt.

Eine Weiterentwicklung der beschriebenen ODNs stellen optimierte *MDM2*-AS-ODNs (sog. „mixed-backbone oligonucleotides“, mit einer DNA/RNA-Hybridstruktur) dar, die eine verbesserte Pharmakokinetik und Bioverfügbarkeit aufweisen. Dadurch eignen sie sich besser für eine *in vivo* Applikation ⁸⁸. Diese AS-ODNs bewirkten neben einer hochspezifischen *MDM2*-Blockierung auch eine effiziente *TP53*-Aktivierung in den behandelten Zellen. Dies war mit einer Wachstumsinhibierung oder einer Apoptoseinduktion assoziiert. Die universell nachgewiesene *TP53*-Aktivierung nach einer *MDM2*-AS-Behandlung ist effizienter als die vieler DNA-schädigender Chemotherapeutika.

Erste Resultate bestätigen die Wirkung von AS-ODNs als effektive Antitumor-Agenzien auch *in vivo* ^{89, 90}. In Nacktmausmodellen wurde über eine signifikante Größenreduktion (>50%) und ein im Vergleich zu Kontrollgruppen stark verzögertes Wachstum von Xenotransplantattumoren berichtet. Zusätzlich konnte ein kooperativer antiproliferativer Ef-

fekt durch Kombination mit Cisplatin, Taxotere oder Topotecan beobachtet werden ⁸⁹. Ähnliche Effekte sind auch bei einer Kombinationstherapie von AS-ODNs und Irinotecan, einem Topoisomerase I-Inhibitor, in Mausmodellen für verschiedene Krebsarten (u.a. das Prostata- und Mammakarzinom) beobachtet worden ⁹¹. Für WTS liegen bisher keine vergleichbaren Ergebnisse vor. Die an WTS-Zellkulturen erzielte Reduzierung des klonogenen Überlebens um bis zu 80 % durch eine *MDM2*-AS-Behandlung ⁸⁷ zeigt jedoch deutlich das Ansprechen von WTS auf diese Therapie. Es schien daher dringend erforderlich, die gewonnenen Ergebnisse auf ein klinisch relevantes Tiermodell zu übertragen.

1.5 Aufgabenstellung

Aufbauend auf Arbeiten in der AG Molekularpathologie sollten WTS zunächst weiter umfassend molekular charakterisiert werden. Dabei stand die Analyse insbesondere der für WTS bedeutsamen Tumorsuppressorproteine TP53 und p14ARF sowie des Onkoproteins MDM2 in Bezug auf Alterationen der Expression bzw. auf Genebene (Überexpression, Genamplifikation, Mutationen, Mikrosatelliteninstabilitäten) im Vordergrund. Durch die Korrelation der molekularen Daten mit klinischen Parametern sollte anschließend ermittelt werden, ob bestimmte Veränderungen prognostische Relevanz besitzen und sich daraus möglicherweise Angriffspunkte für neue, therapeutische Ansätze für WTS ergeben.

Ein weiterer Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die Detektion und Charakterisierung von alternativ gespleißten Transkripten der *MDM2*-mRNA in adulten WTS. Außerdem sollte untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Spleißformen und dem *TP53*-Mutationsstatus bzw. einer TP53-Proteinüberexpression besteht. Des Weiteren erfolgte eine vergleichende Analyse von RMS im Kindes- und Erwachsenenalter in Bezug auf die Expression von *MDM2*-mRNA-Spleißformen.

Aufbauend auf den Studien von Meye *et al.*⁸⁷, in denen *in vitro* durch Behandlung mit *MDM2*-AS-ODNs eine Wachstumsinhibierung von bis zu 80 % erzielt werden konnte, sollten Strategien für eine *in vivo* Applikation zur WTS-Therapie entwickelt werden. Das Ziel war zunächst die Etablierung eines Modells zur Behandlung von WTS-Rezidiven im Peritoneum in der Nacktratte, an dem die Wirksamkeit und TP53-unabhängige Effekte der *MDM2*-AS-Konstrukte untersucht werden sollte. Dazu eignete sich die RMS-Zelllinie RD, da diese ausschließlich eine mutierte Form von TP53 exprimiert.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Konstruktion eines adenoviralen Vektors, der die Expression von sehr kurzen mRNA-Fragmenten, in diesem Fall *MDM2*-Antisense-RNA, ermöglicht. Mit Hilfe dieses Vektors sollte untersucht werden, ob durch adenoviralen Gentransfer eine höhere Transfektionsrate und somit eine stärkere Reduzierung des Tumorwachstums im Vergleich zum Einsatz von Liposomen erreicht werden kann.

Die Arbeiten sollen auch eine Grundlage für zukünftige Planungen von Kombinations-therapien von konventionellen Therapieformen (Zytostatika, Bestrahlung) mit einer Gentherapie für bestimmte WTS-Patienten sein.

2 Material

2.1 Tumormaterial und Patientengut

Die verwendeten Zelllinien, mit Ausnahme der Zelllinie 293, sind in der Abteilung Zell- und Gewebezüchtung des Institutes für Pathologie der Universität Halle-Wittenberg kultiviert worden (Tab. 2-1). Die 293-Zellen wurden zur Virusexpansion in der Abteilung Molecular Pharmacology des St. Jude Children's Research Hospital (SJCRH, Memphis, TN, USA) und in der Klinik für Neurochirurgie der Universität Halle vermehrt. Die kommerziell erhältlichen ATCC-Zelllinien (Manassas, VA, USA) wurden über WAK-Chemie (Bad Homburg) oder die „Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH“ (Braunschweig) bezogen. Die Zelllinien Rh18, 28, 30, 36, 41 sind großzügigerweise von Prof. Peter Houghton vom SJCRH zur Verfügung gestellt worden. Die genannten Linien wurden in der Abteilung Molecular Pharmacology des SJCRH aus Tumorproben als Primärkulturen etabliert.

Tab. 2-1: Verwendete Tumorzelllinien.

Bezeichnung	Ursprungsgewebe	TP53-Gen	Referenzen
RD	eRMS	mt/-	De Giovanni <i>et al.</i> ⁹² , Stratton <i>et al.</i> ⁹³
SJSA	aRMS	n.b.	Taylor <i>et al.</i> ⁹⁴
CT-TC	eRMS	mt/mt	Taylor <i>et al.</i> ⁹⁴
JR1	eRMS	mt/mt	Taylor <i>et al.</i> ⁹⁴
Rh18	aRMS	wt/wt	Taylor <i>et al.</i> ⁹⁴
Rh28	aRMS	wt/wt	Taylor <i>et al.</i> ⁹⁴
Rh30	aRMS	mt/-	Taylor <i>et al.</i> ⁹⁴
Rh36	aRMS	wt/wt	Taylor <i>et al.</i> ⁹⁴
Rh41	aRMS	mt/-	Taylor <i>et al.</i> ⁹⁴
Saos-2	OS	-/-	Masuda <i>et al.</i> ⁹⁵
US8/93	ud-WTS	wt/mt	Taubert <i>et al.</i> ⁹⁶
MCF-7	Mamma-Ca.	n.b.	Sugarman <i>et al.</i> ⁹⁷
293	HEK	n.b.	Louis <i>et al.</i> ⁹⁸

Abkürzungen: aRMS – alveoläres Rhabdomyosarkom, eRMS – embryonales Rhabdomyosarkom, Mamma-Ca. – Mammakarzinom, OS – Osteosarkom, ud-WTS – undifferenziertes Weichteilsarkom, n.b. – nicht bestimmt, HEK – human embryonic kidney cells.

Die in dieser Arbeit verwendeten Tumorproben wurden freundlicherweise von der Chirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Leipzig durch PD Dr. Peter Würfl zur Verfügung gestellt, der die betreffenden Patienten operiert hat. Von sämtlichen Patienten wurden

zusätzlich zum Tumormaterial auch Normalgewebe (Muskel) und Blutproben entnommen. Sowohl das Tumor- als auch das Normalgewebe sind bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff kryokonserviert worden. Die Verschlüsselung der Proben und die Anonymisierung der klinischen Daten erfolgten gemäß einer am Institut für Pathologie erstellten Datenbank und entsprechend ihres chronologischen Eingangs (LZ6 entspricht der 6. Tumorprobe aus der Chirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Leipzig). Die Proben wurden durch erfahrene Pathologen histologisch charakterisiert und entsprechend der gültigen WHO-Klassifikation für WTS von 1993 eingeordnet ¹.

Des Weiteren sind im Rahmen dieser Arbeit insgesamt 10 Rhabdomyosarkomproben untersucht worden, die von Patienten stammen, die am St. Jude Children's Research Hospital operiert worden sind. Für die Überlassung dieser Tumorproben danke ich dem Tumor Processing Laboratory des SJCRH, insbesondere Dr. Michael Janes.

2.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Imagemaster VDS	Amersham Pharmacia, Freiburg
Imagemaster VDS 3.0 Software	Amersham Pharmacia, Freiburg
Miniblotter	Biometra, Göttingen
Sequi-Gen Gelkammersystem	BioRad, München
PTC-200 Thermal Cycler	MJ Research (über Biozym, Hess. Oldendorf)
TrioThermoblock mit Deckelheizung	Biometra, Göttingen
Western Elektrophorese Minikammern	Biometra, Göttingen
24-Loch-Platten	Greiner, Nürtingen
CELLSTAR [®] 6-Loch-Platten	Greiner, Nürtingen
Kodak Elite II 400	Kodak, Hirrlinger, Stuttgart
PVDF-Membran (0,45 µm)	Roth, Karlsruhe
Zellkulturflaschen (25 und 75 cm ²)	Greiner, Nürtingen

2.3 Chemikalien

Acryl/Bisacrylamid 30%	Serva, Heidelberg
Agar	Life Technologies, Eggenstein
Agarose	Serva, Heidelberg
Ammoniumpersulfat	Serva, Heidelberg

Ampicillin	Serva, Heidelberg
Blueslick	Serva, Heidelberg
Borsäure	Roth,Karlsruhe
Coomassie PhastGel BlueR	Pharmacia Biotech, Freiburg
Diethylpyrocarbonat	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol	Roth, Karlsruhe
dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP,dTTP)	Promega, Heidelberg
Dulbecco´s Modifiziertes Eagle Medium	Life Technologies, Eggenstein
Effectene	Qiagen, Hilden
EDTA	Roth, Karlsruhe
Essigsäure (p.a.)	Merck, Darmstadt
Ficoll 400	Pharmacia Biotech, Freiburg
Fötales Kälberserum	BioWhittaker,
Formaldehyd (p.a.)	Merck, Darmstadt
Formamid (p.a.)	Merck, Darmstadt
Fugene	Roche, Mannheim
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
LB-Medium	Life Technologies, Eggenstein
Lithiumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Luria Agar	Life Technologies, Eggenstein
β-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Magermilchpulver Glücksklee	Nestle, Schweiz
MetaPhore Low Melting Agarose	FMC Bioproducts, Rockland, ME
Methanol 100 % (p.a.)	J.T.Baker, Deventer, Holland
MOPS	Serva, Heidelberg
Natriumdodecylsulfat	Serva, Heidelberg
Natriumdesoxycholat	Sigma, Deisenhofen
Phenol (TE-gesättigt)	Roth, Karlsruhe
Phosphorsäure 85 % (p.a.)	Sigma, Deisenhofen
Ponceau S	Roth, Karlsruhe
Polyethylenglycol 6000	Serva, Heidelberg
Rubidiumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Salzsäure (37 %)	Roth, Karlsruhe

Silbernitrat	Promega, Heidelberg
TEMED	Serva, Heidelberg
Tris	Roth, Karlsruhe
Trizol	Roth, Karlsruhe
Trypsin	Serva, Heidelberg
Tween 20	Serva, Heidelberg
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosid (X-Gal)	Sigma, Deisenhofen

Alle weiteren, hier nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), Sigma (Deisenhofen) bzw. Serva (Heidelberg) bezogen und hatten den Reinheitsgrad p.a. Zur Herstellung von Puffern wurde bidestilliertes Wasser verwendet.

2.4 Antikörper

In dieser Arbeit verwendete Primärantikörper sind in Tabelle 2-2 aufgeführt.

Tabelle 2-2: In dieser Arbeit verwendete Primärantikörper.

<i>Antigen</i>	<i>Klon</i>	<i>Firma</i>	<i>Referenzen</i>
TP53	DO-1	Oncogene Science, Manhasset, N.Y., U.S.A.	
	DO-7	Medac, Hamburg	
	Pab1801	Oncogene Science	
MDM2	1B10	Oncogene Science	
	IF-2	Oncogene Science	
	N20	Santa Cruz Biotechnologies	
	C18	Santa Cruz Biotechnologies	
	2A10	A.J. Levine (Rockefeller Universität, NY)	Chen <i>et al.</i> ⁹⁹
	4B2	A.J. Levine (Rockefeller Universität, NY)	Chen <i>et al.</i> ⁹⁹
	2A9	A.J. Levine (Rockefeller Universität, NY)	Chen <i>et al.</i> ⁹⁹
p14ARF	N20	Santa Cruz Biotechnologies	
Actin	AC41	Sigma, Deisenhofen	

Die jeweils verwendeten Sekundärantikörper (Kaninchen Anti-Ziege-IgG, Kaninchen Anti-MausIgG [p0161], Ziege anti-Maus-IgG [p0448]) wurden bei der Fa. Dako, Hamburg, bezogen.

2.5 Enzyme

Protease-Inhibitor-„Cocktail“	Sigma, Deisenhofen
RNasin RNase Inhibitor	Promega, Heidelberg
Restriktionsendonucleasen (<i>XhoI</i> , <i>NsiI</i> , <i>DdeI</i> , <i>HindIII</i> , <i>DsaI</i> , <i>MseI</i>)	New England Biolabs, Schwabach
SuperScript™ Reverse Transkriptase	Life Technologies, Eggenstein
T7-RNA-Polymerase	New England Biolabs, Schwabach
HotStarTaq™-DNA-Polymerase	Qiagen, Hilden
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Schwabach

2.6 Kits

ECL-Western Blotting Reagenz	Amersham, Freiburg
LSAB Kit	DAKO, Hamburg
MasterPure complete DNA/RNA Purification Kit	Epicentre, Madison, WI, USA
Protein Assay Kit	Sigma, Deisenhofen
Qiagen Plasmid Maxi-Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
ThermoSequenase Sequencing Kit	Amersham, Freiburg
TOPO-TA Cloning Kit	Invitrogen, Groningen, Niederlande

2.7 Plasmide

Die zur Klonierung verwendeten Vektoren sind in Tabelle 2-3 aufgeführt. Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Plasmide sind im Anhang detailliert beschrieben.

Tabelle 2-3: Verwendete Vektoren.

<i>Plasmid</i>	<i>Eigenschaften</i>	<i>Referenz</i>
TOPO-TA pCR 2.1	Klonierungsvektor, enthält überhängende T-Enden zur direkten Klonierung von PCR-Produkten	Invitrogen
pSP6mU6 [§]	enthält das U6-Gen, in das über die <i>XhoI</i> - und <i>NsiI</i> -Schnittstellen kurze Oligonukleotide kloniert werden können	Potter <i>et al.</i> ¹⁰⁰
pAVS6aCla [§]	Shuttle-Vektor, enthält eine <i>ClaI</i> -Schnittstelle zur Subklonierung des <i>ClaI</i> -Fragments aus dem pSP6mU6-Vektor	Potter <i>et al.</i> ¹⁰⁰

[§] – die Vektoren pSP6mU6 und pAVS6aCla wurden freundlicherweise von Dr. Phillip Potter vom St. Jude Children's Research Hospital (Memphis, TN, USA) zur Verfügung gestellt. Beide Vektoren sind durch Patente der Fa. Gene Therapy Systems Inc. (USA) geschützt.

2.8 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit eingesetzten Bakterienstämme und Adenoviren sind in Tabelle 2-4 aufgeführt.

Tabelle 2-4: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme.

<i>Bakterienstamm</i>	<i>Genotyp</i>
GM2163 ^{&}	F- dcm-6 dam-13::Tn9 araC14 leuB6 fhuA13 lacY1 tsx-78glnV44(0c) galT22 LAM- mcrA0 hisG4(0c) rfbD1 rpsL136(strR) xylA5 mtl-12 thi-1 mcrB9999 hsdR2
TOP10	F- mrcA Δ(mrr-hsdRMS-mrcBC) φ80LacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 raD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG
Add327 [§]	Adenovirus Typ 5

[&] – Der *E.coli*-Stamm GM2163 wurde freundlicherweise von Dr. Renate Langhammer (Institut für Genetik, Universität Halle-Wittenberg) überlassen. [§] – Die genomische DNA des Adenovirus Add327 wurde freundlichst von Dr. Linda Harris vom St. Jude Children's Research Hospital (Memphis, TN, USA) zur Verfügung gestellt.

2.9 Oligonukleotide und „Mixed Backbone Oligonucleotids“ (MBOs)

Alle nachfolgend aufgeführten Oligonukleotide sowie die MBOs wurden von den Firmen Amersham (Freiburg) und Tibmolbiol (Berlin) hergestellt und HPLC-gereinigt geliefert. In dieser Arbeit verwendete PCR- und Sequenzierprimer sind in Tabelle 2-5 aufgeführt, die MBOs entsprechend in Tabelle 2-6.

Tabelle 2-5: Oligonukleotide, die für RT-PCR-Reaktionen, PCR-Reaktionen, sowie Sequenzierreaktionen eingesetzt wurden.

<i>Name</i>	<i>Sequenz 5' → 3'</i>	<i>Orientierung</i>	<i>Referenz</i>
MDM2-1	5'-TCTGTACCTACTGATGTGGTGC-3'	sense	Bartel <i>et al.</i> ¹⁰¹
MDM2-2	5'-AGAAGTTGATGGCTGAGAAT-3'	antisense	Bartel <i>et al.</i> ¹⁰¹
MDM2-5	5'-CTGGGAGTCTTGAGGAAT-3'	sense	Sigalas <i>et al.</i> ⁴²
MDM2-6	5'-CAGGTTGTCTAAATTCCTAG-3'	antisense	Sigalas <i>et al.</i> ⁴²
MDM2-7	5'-GCTGACTATTGGAAATGCAC-3'	sense	Schlott <i>et al.</i> ¹⁰²
MDM2-8	5'-ATTGGTTGTCTACATACTGGGC-3'	antisense	Schlott <i>et al.</i> ¹⁰²
MDM2-9	5'-CGCGAAAACCCCGGCAGGCAAATGTGCA-3'	sense	Sigalas <i>et al.</i> ⁴²
MDM2-10	5'-CTCTTATAGACAGGTCAACTAG-3'	antisense	Sigalas <i>et al.</i> ⁴²
GAPDH-1	5'-CCAAGGTCATCCATGACAAC-3'	sense	Bartel <i>et al.</i> ¹⁰¹
GAPDH-2	5'-AGCTTGACAAAGTGGTCGTT-3'	antisense	Bartel <i>et al.</i> ¹⁰¹
Prot-1	5'-TCATCCTCAGTCCTAATGC-3'	sense	Bartel <i>et al.</i> ¹⁰¹

Tabelle 2-5 Forstsetzung

Name	Sequenz 5' → 3'	Orientierung	Referenz
Prot-2	5'-AGACCCCAAGAAAGAAATGG-3'	antisense	Bartel <i>et al.</i> ¹⁰¹
ARF-3	5'-GGTTTTCGTGGTTCACATCCC GCG-3'	sense	Esteller <i>et al.</i> ¹⁰³
ARF-4	5'-CAGGAAGCCCTCCCGGGCAGC-3'	antisense	Esteller <i>et al.</i> ¹⁰³
D12S83SE	5'-TTTTTGG AAGTCTATCAATTTGA-3'-3'	sense	Schuster, K. ¹⁰⁴
D12S83AS	5'-ATAGCAGAGAAAGCCAATTCA-3'	antisense	Schuster, K. ¹⁰⁴
D12S80SE	5'-CCAGCCTGGAATGATATGTA-3'	sense	Schuster, K. ¹⁰⁴
D12S80AS	5'-GAATGTCAATGGACCAGATG-3'	antisense	Schuster, K. ¹⁰⁴
AdITR	5'-CGTTTACGTGGAGACTCGC-3'	sense	Potteret <i>al.</i> ¹⁰⁰
mU6SP6	5'-TGAAAGGTGTTTTTCAGTGGTTA-3'	antisense	Potteret <i>al.</i> ¹⁰⁰

RT-PCR: Reverse Transkription – Polymerasekettenreaktion

Tabelle 2-6: MDM2-Antisense-, Mixed Backbone und Kontrolloligonukleotide, sowie Nukleotide zur Viruskonstruktion

Name	Sequenz 5' → 3'	Referenz
Anti-Kondo	5'-GsAsCATGTTGGTATTGCACsAsT-3'	Kondo <i>et al.</i> ⁸⁶
Sense-Kondo	5'-CsTsGTACAACCATAACGTGsTsA-3'	Kondo <i>et al.</i> ⁸⁶
Anti-Wang	5'-GsAsTCACTCCCACCTTCAAsGsG-3'	Wang <i>et al.</i> ⁹⁰
Mismatch-Wang	5'-GsAsTGACTCACACCATCATsGsG-3'	Wang <i>et al.</i> ⁹⁰
AS-forward [§]	5'-TCGAGTAGACTACTACTCTTGCCACAGTCGAAGTGCA-3'	diese Arbeit
AS-reverse	5'-GTTCCACTGTGGACAAGAGTGAGTGTCTAC-3'	diese Arbeit
MM-forward [§]	5'-TCGAGAAGAGACTGACTGTTGACCAGAGTCGAAGTCA-3'	diese Arbeit
MM-reverse	5'-CTTCGACTCTGGTCAACTGAGTCTCTTC-3'	diese Arbeit

s – Thioatbindungen; AS – antisense; MM – mismatch; [§] die Antisense-Oligonukleotide enthalten am 5'-Ende zwei Basen, die komplementär zur Schnittstelle des Restriktionsenzym *XhoI* und am 3'-Ende zwei Basen, die komplementär zur *NsiI*-Schnittstelle sind.

2.10 Versuchstiere

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

3 Methoden

3.1 Isolierung von Nukleinsäuren

3.1.1 Präparation von Gesamt-RNA

Die Gesamt-RNA wurde mit Hilfe der Trizol-Methode (Life Technologies) oder des RNeasy RNA-Isolations-Kits der Fa. Qiagen entsprechend der Vorgaben der Hersteller isoliert. Alle zur RNA-Isolation verwendeten Lösungen wurden mit DEPC (0,01%) behandelt bzw. steril angesetzt. Gewebeproben wurden unverzüglich in flüssigem Stickstoff aufgenommen und bis zur Weiterbearbeitung darin gelagert. Das Gewebe wurde in flüssigem Stickstoff fein pulverisiert und in 600 µl Lysepuffer aufgenommen (RLT, Fa. Qiagen). Stand nur wenig Gefriermaterial zur Verfügung, wurden jeweils zehn ca. 50-µm dicke Gefrierschnitte angefertigt und direkt in 600 µl Lysepuffer aufgenommen. Anschließend erfolgte die Homogenisierung der Proben, entweder mit Hilfe eines Ultraturrax oder mit QiaShredder-Säulen. Wurde hingegen RNA aus Zellkulturen isoliert, wurde das Zellpellet direkt im Lysepuffer gelöst. Eine Homogenisierung war in diesem Falle nicht erforderlich. Die Isolierung der RNA erfolgte schließlich durch die Aufbringung des Homogenats auf die RNeasy-Säulen und nachfolgende Zentrifugation (10.000 U/min für 1 min). Zur Elution wurden entweder 50 µl DEPC-H₂O oder Elutionspuffer verwendet. Die Lagerung der Gesamt-RNA erfolgte kurzzeitig bei -20 °C, über einen längeren Zeitraum jedoch bei -70 °C. Generell wurden häufige Auftau-/Einfrierzyklen vermieden.

3.1.2 Konzentrationsbestimmung

Zur Konzentrationsbestimmung wurden die RNA-Proben geeignet verdünnt (üblicherweise 1:50) und im Spektralphotometer vermessen. Es ist jeweils bei 260 und 280 nm die Extinktion gemessen worden. Die Konzentration errechnet sich aus folgender Beziehung: 1 OD_{260 nm} entspricht 40 µg RNA/ml. Die Reinheit der Präparation ergibt sich aus dem Quotienten der OD_{260 nm} / OD_{280 nm} und liegt bei hoher Reinheit zwischen 1,8 und 2.

3.1.3 RNA-Gelelektrophorese

Die Überprüfung der Integrität der gewonnenen, in DEPC-H₂O gelösten RNA wurde mittels denaturierender Formaldehyd-Gelelektrophorese durchgeführt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einem 1 %igen (w/v) Agarose-Formaldehydgel (1X MOPS, 1,5 %

Formaldehyd [v/v])¹⁰⁵. Vor dem Auftragen wurden die Proben 10 min bei 65 °C in RNA-Probenpuffer denaturiert, sofort auf Eis gestellt und durch Elektrophorese in 1X MOPS-Puffer, bei 90 V über einen Zeitraum von ca. 2 h aufgetrennt.

10X MOPS:	10	mM	EDTA
	50	mM	Natriumacetat
	200	mM	MOPS (pH 7,0)

RNA-Probenpuffer:	720	µl	Formamid
	260	µl	Formaldehyd (37 %, w/v)
	160	µl	10X MOPS
	80	µl	Glycerol
	80	µl	Bromphenolblau
	100	µl	Ethidiumbromid (10 µg/ml)
	100	µl	Aqua bidest.

3.1.4 Isolierung von genomischer DNA aus Paraffinmaterial

Die Isolierung genomischer DNA aus Paraffinmaterial umfasste die Schritte Entparaffinierung, Proteinase-K-Verdau und DNA-Extraktion. Die hier beschriebene Methode ist nach Wright und Manos¹⁰⁶ und Lahiri und Nurnberger¹⁰⁷ modifiziert worden.

1. 3 – 5 ca. 20 µm dicke Paraffinschnitte in 1 ml Xylol aufnehmen
2. 30 min bei Raumtemperatur (RT) schütteln
3. 5 min bei 12.000 U/min zentrifugieren, den Überstand verwerfen
4. die Schritte 1 bis 3 wiederholen
5. zweimal mit 1 ml Ethanol abs. waschen und jeweils 5 min bei 12.000 U/min zentrifugieren, anschließend das Pellet trocknen
6. das Pellet über Nacht (ÜN) mit 400 µl Verdau-Puffer bei 37 °C inkubieren
7. Inkubation für 10 min bei 95 °C (Heizblock oder Wasserbad)
8. Zentrifugation für 30 s, den Überstand auf zwei 1,5-ml-Reaktionsgefäße verteilen
9. jeweils 400 µl Salzpuffer und 12,5 µl SDS (20 %, w/v) zugeben und gut mischen

10. Inkubation für 10 min bei 55 °C, anschließend auf RT abkühlen
11. Zugabe von 150 µl 6 M NaCl, gut mischen (vortexen)
12. für 5 min bei 12.000 U/min zentrifugieren (4 °C)
13. den Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführen
14. gleiches Volumen Isopropanol zugeben
15. Fällung der DNA bei –20 °C ÜN oder bei –70 °C für 1 h
16. für 5 min bei 12.000 U/min zentrifugieren (4 °C), Überstand verwerfen
17. DNA-Pellet mit eiskaltem 70 %igem EtOH waschen, trocknen und in 50 µl Bidest. aufnehmen

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung erfolgte wie unter 3.1.2 beschrieben durch die Messung der Adsorption bei 260 und 280 nm, wobei 1 OD_{260nm} 50 µg/ml doppelsträngiger DNA entspricht.

Verdau-Puffer: 50 mM Tris-HCl (pH 8,5)
 1 mM EDTA
 0,5 % Tween 20
 200µg/ml Proteinase K

Salzpuffer: 10 mM Tris-HCl (pH 7,6)
 10 mM KCl
 10 mM MgCl₂
 0,4 M NaCl
 2 mM EDTA

3.1.5 Isolierung von genomischer DNA aus peripherem Blut

Die Isolierung von genomischer DNA aus peripheren Blutlymphozyten erfolgte nach einer von Miller *et al.*¹⁰⁸ beschriebenen Methode, die z.T. modifiziert worden ist. Es kam ausschließlich frisch gewonnenes EDTA-Blut von gesunden Spendern oder Tumorpatienten zum Einsatz. Die Blut-DNA der gesunden Spender diente für diverse Methoden, wie z.B. PCR und Sequenzierung, als Kontrolle („Normal-DNA“). Außerdem wurde die DNA aus den Lymphozyten von Tumorpatienten als Referenz-DNA bei Mikrosatellitenuntersuchungen eingesetzt.

1. 10 ml EDTA-Blut in ein 50 ml FALCON-Röhrchen geben
2. mit 40 ml 4 °C kaltem Triton-Lyse-Puffer auffüllen und schwenken
3. Inkubation für 15 min im Eisbad, dabei das Röhrchen gelegentlich schwenken

4. Zentrifugation für 10 min bei 2300 U/min in 4 °C kalter Zentrifuge
5. den Überstand vorsichtig abnehmen (das Pellet ist sehr locker)
6. das Pellet 2 – 3 mal mit 0,95 %iger NaCl-Lösung waschen
7. zum Pellet 3 ml Kern-Lysepuffer, 25 µl Puffer A (enthält Proteinase K) sowie 115 µl 20 % SDS (w/v) geben
8. kräftig schütteln bis die Lösung klar ist (1 h bei 50 °C oder ÜN bei 37 °C)
9. 1 ml 6 M NaCl zugeben, 15 s kräftig schütteln
10. bei 4500 U/min und 4 °C für 15 min zentrifugieren, den Überstand in ein neues Röhrchen überführen
11. den Zentrifugationsschritt wiederholen bis der Überstand klar ist
12. durch Zugabe von 2 Vol. eiskaltem EtOH (96 %) die DNA ausfällen, dazu das Röhrchen leicht schwenken bis die DNA als weiße Flocke sichtbar ist
13. ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß mit 1 ml eiskaltem 70 %igem EtOH vorbereiten
14. mit einer blauen Pipettenspitze die Flocke in das 1,5 ml-Reaktionsgefäß mit dem 1 ml eiskalten 70 %igem EtOH überführen und waschen
15. bei 12.000 U/min und 4 °C für 15 min zentrifugieren
16. das Pellet vakuumtrocknen und in einer geeigneten Menge Bidest. oder TE-Puffer aufnehmen (ca. 100 – 1000 µl)
17. Konzentration und Reinheit wie unter 3.1.4 beschrieben bestimmen

Triton-Lysepuffer: 0,32 M Saccharose
 (pH 7,5) 5 mM MgCl₂ x 6 H₂O
 10 mM Tris (pH 7,5)
 1 % Triton X-100

Kern-Lyse-Puffer: 10 mM Tris-HCl (pH 8,2)
 0,4 M NaCl
 2 mM EDTA (pH 8,0)

Puffer A: 0,1 M NaCl
 (pH 7,5) 50mM Tris-HCl/NaCl
 5 mM EDTA (pH 8,0)
 20mg Proteinase K

3.1.6 Isolierung von Plasmid-DNA

3.1.6.1 Minipräparation

Einzelkolonien einer Agarplatte wurden in 5 ml LB-Medium mit Antibiotikazusatz (Ampizillin 50 µg/ml) ÜN bei 37 °C im Schüttelinkubator (200 U/min) inkubiert. 2 ml einer Kultur wurden bei 5.000 U/min (SIGMA 3K30) abzentrifugiert und die Plasmid-DNA nach Herstellerangaben mit dem Endotoxin Free Plasmid Mini Kit (Qiagen) isoliert. Die Integrität der isolierten Plasmide wurde durch Agarose-Gelelektrophorese (1 % Agarose) und durch Spaltung mittels geeigneter Restriktionsenzyme überprüft.

3.1.6.2 Maxi- und Megapräparation

100 ml LB-Medium (500 ml bei Megapräparationen) mit Antibiotikazusatz (Ampizillin 50 µg/ml) wurden mit 1 ml (5 ml) der oben erwähnten Übernachtskultur angeimpft 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.

3.1.7 Isolierung viraler DNA aus Zellkulturüberständen

Die Isolierung viraler DNA aus Zellkulturüberständen lysierter 293-Zellen erfolgte mit Hilfe des MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit (Epicentre, Madison, WI, USA). Dieser Kit erlaubt die Isolierung von DNA aus flüssigen Proben durch die Verwendung eines 2X-Lysepuffers.

1. mischen von 150 µl Probe (Zellkulturüberstand) mit 150 µl 2X Lysepuffer (enthält Proteinase K), dabei kräftig schütteln
2. Inkubation für 15 min bei 65 °C, danach sofort auf Eis (ca. 5 min)
3. Zugabe von 150 µl MPC Protein Precipitation Reagent, für 10 s kräftig vortexen
4. Zentrifugation (10.000 U/min) zur Pelletierung der Zelltrümmer
5. den klaren Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführen
6. DNA durch Zugabe von 500 µl Isopropanol fällen, das Reaktionsgefäß dazu 30 – 40 x schwenken

7. Zentrifugation bei 4 °C für 10 min (10.000 x g)
8. das DNA-Pellet zweimal mit 70 %igem Ethanol waschen, jeweils kurz zentrifugieren, wenn sich das Pellet gelöst hat
9. nach Vakuumtrocknen das Pellet in 35 µl TE-Puffer aufnehmen
10. Messung der DNA-Konzentration wie unter 3.1.4 beschrieben

3.2 Reverse Transkription, Polymerasekettenreaktion und Sequenzierung

3.2.1 Reverse Transkription

Die Expression der gesuchten mRNA in einem bestimmten Gewebe (Tumor- oder angrenzendes Normalgewebe) wurde mittels reverser Transkription der Gesamt-RNA in cDNA mit anschließender Polymerasekettenreaktion nachgewiesen. Die Umschreibung der RNA erfolgte standardmäßig mit Zufallsprimern (Random Hexamer Primers, Life Technologies) in 0,5 ml Reaktionsgefäßen in einem Thermocycler (TrioThermoblock, Biometra, wenn nicht anders angegeben). Die cDNA-Synthese erfolgte mittels Superscript™ II Kit entsprechend der Herstellerangaben in 20 µl-Ansätzen.

Zunächst wurden je Ansatz 250 – 2500 ng Gesamt-RNA, die erforderliche Menge DEPC-H₂O und 100 ng/µl Random Primer gemischt und 10 min bei 70 °C zur Denaturierung der RNA inkubiert. Anschließend wurden auf Eis 9 µl eines RT-Mastermix zugegeben, der sich wie folgt zusammensetzte: 4 µl 5X Reaktionspuffer, 2 µl 100 mM DTT, 2 µl 100 mM dNTPs sowie 1 µl Superscript™ II (200 Units/µl).

Der Ansatz wurde zur Primeranlagerung zunächst für 10 min bei 20 °C inkubiert, die cDNA-Synthese erfolgt anschließend bei 42 °C für 90 min, gefolgt von einem Denaturierungsschritt für 2 min bei 95 °C. Die erhaltene cDNA diente nun als „template“ in den folgenden PCR-Reaktionen und wurde bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C gelagert.

3.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

3.2.2.1 PCR zum Nachweis der *MDM2*-Transkripte

Zum Nachweis eines spezifischen *MDM2*-Transkripts wurde eine von Sigalas *et al.*⁴² beschriebene „nested“-PCR-Strategie angewendet und teilweise modifiziert. Im ersten Schritt erfolgte die Amplifizierung der cDNA unter Verwendung von 2 µl (1/10) des unter 3.2.1 er-

haltenen cDNA-Ansatzes mit den Primern MDM2-5 und MDM2-6, die nahezu die gesamte cDNA überspannen (Abb. 3-1). Ein 50 µl-Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen: 1X Reaktionspuffer, 2,5 mM MgCl₂, dNTP-Mix (je 10 mM), je 25 pmol Primer, 2,5 U HotStar-Taq (Qiagen), 1X Q-Solution sowie Bdest ad 50 µl. Die PCR-Amplifikation mit den äußeren Primern wurde mit dem nachfolgend beschriebenen Temperaturprofil durchgeführt:

Schritt 1:	15:00 min	95 °C	Denaturierung	
Schritt 2:	0:30 min	55 °C	Primer-Anlagerung	← 35 x
Schritt 3:	4:30 min	72 °C	Synthese	
Schritt 4:	0:30 min	95 °C	Denaturierung	
Schritt 5:	10:00 min	72 °C	abschließende Synthese	
Schritt 6:	∞	4 °C		

Für die zweite PCR („nested PCR“) mit den inneren Primerpaaren MDM2-9/ MDM2-10 bzw. MDM2-1/ MDM2-8 diente 1/10 des ersten PCR-Ansatzes als DNA-Matrize. Die Amplifikation folgte generell dem gleichen, weiter oben beschriebenen Protokoll, mit der Ausnahme, dass bei Verwendung der Primer MDM2-1 und MDM2-8 die Primer-Anlagerungstemperatur 58 °C betrug. Die Produkte der zweiten PCR wurden elektrophoretisch aufgetrennt (3.3.1) und dokumentiert. Die Größenbestimmung der Banden erfolgte mit Hilfe der Auswertesoftware VDS Imagemaster 3.0 (Amersham Pharmacia).

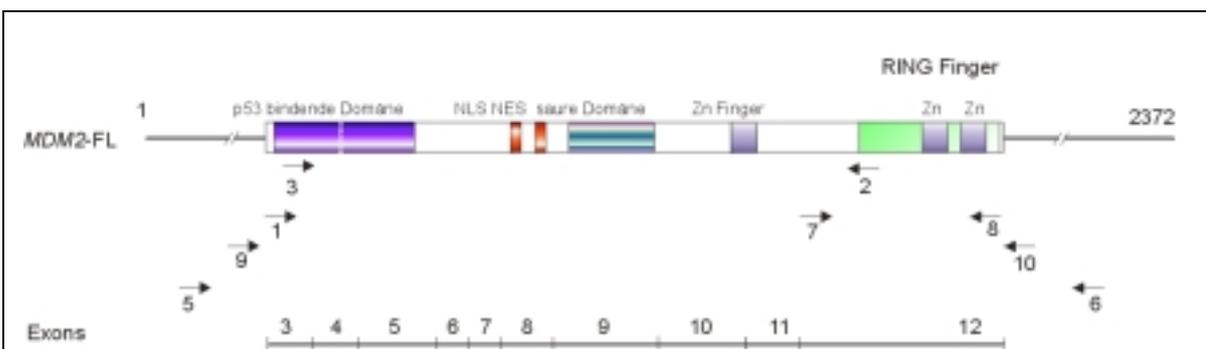


Abb. 3-1: Bindungsstellen der MDM2-spezifischen Primer

Es sind die Bindungsstellen und die Orientierung der in Tabelle 2-5 beschriebenen MDM2-spezifischen Primer auf der *MDM2*-cDNA dargestellt. Ein Pfeil markiert die Lage der Primerbindungsstelle, die Richtung des Pfeils gibt die Orientierung des Primers an. Die durchgezogene, horizontale Linie entspricht der gesamten cDNA (2372 bp), die Box stellt den translatierten Bereich und die Domänen des MDM2-Proteins dar (oben). Die Nummerierung zeigt die Exon-Struktur des translatierten Bereichs (unten). *MDM2*-FL – *MDM2*-Full-length cDNA.

3.2.2.2 Multiplex-PCR zum Nachweis der Amplifikation des *MDM2*-Gens

Zum Nachweis der Amplifikation des *MDM2*-Gens wurden jeweils 50 ng genomischer DNA des Tumors und aus peripheren Blut-Lymphozyten des Patienten mit Primern für das *MDM2*-Gen (*MDM2*-7/*MDM2*-8) sowie Primern für das *Prothrombin*-Gen (*prot*-1/*prot*-2) in einer Multiplex-PCR amplifiziert. Das *Prothrombin*-Gen ist ein Gen, das als „singel copy“-Gen vorliegt (Dr. Th. Köhler, persönl. Mitteilung), daher eignet es sich als Referenzgen zum Nachweis der Amplifikation eines anderen Gens. In Vorversuchen wurde mit Hilfe von Kontroll-DNA gesunder Blutspender die optimale Menge an Ausgangs-DNA sowie die optimale Zyklenzahl während der PCR ermittelt, um zu vermeiden, die Plateauphase zu erreichen, in der die Menge an PCR-Produkt ab einer bestimmten Zyklenzahl konstant bleibt.

Das PCR-Protokoll, das zur Koamplifikation des *MDM2*- und des *Prothrombin*-Gens genutzt wurde, hatte folgendes Temperaturprofil:

Schritt 1:	15:00	min	95 °C	Denaturierung	
Schritt 2:	0:30	min	55 °C	Primer-Anlagerung	
Schritt 3:	1:30	min	72 °C	Synthese	
Schritt 4:	0:30	min	95 °C	Denaturierung	
Schritt 5:	10:00	min	72 °C	abschließende Synthese	
Schritt 6:	∞		4 °C		

Die Konzentrationen der einzelnen Komponenten des PCR-Ansatzes sind in Kap. 3.2.2.1 aufgeführt. Die Produkte wurden in einem 1,5 %igen Agarose-Gel (NuSieve) elektrophoretisch aufgetrennt und die Banden mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht (3.3.1). Die Gelbilder sind elektronisch erfasst worden (VDS Imagemaster 3.0), mit deren Hilfe eine spätere densitometrische Auswertung erfolgte.

3.2.2.3 PCR mit weiteren Primern

Die PCR-Bedingungen für weitere Primerpaare (Annealingtemperatur, $MgCl_2$ -Konzentration, Anzahl der Zyklen usw.) orientierten sich weitestgehend an dem unter 3.2.2.1 beschriebenen Protokoll. In Abhängigkeit von der zu erwartenden Fragmentlänge wurde die Synthesezeit adaptiert.

3.2.2.4 Sequenzierreaktion

Zur Sequenzierung von DNA wurden der Thermosequense und der Thermosequense II Kit der Firma Amersham Pharmacia verwendet, denen das Prinzip des Cycle Sequencing zugrunde liegt.

Der Sequenzierungsansatz enthielt 8 µl Reaktionsmix (Thermosequense) bzw. je 4 µl Reaktionsmix A und B (Thermosequense II), 10 pmol des spezifischen Primers, 250 ng Plasmid-DNA oder 100 ng gereinigtes PCR-Produkt (3.3.1) in einem Reaktionsvolumen von 20 µl. Folgendes Temperaturprofil wurde 35x wiederholt: 30 s 96 °C (Denaturierung), 30 s 55 °C (Primeranlagerung) und 4 min bei 60 °C (Syntheseschritt). Die DNA wurde durch Zugabe von 2 µl einer 1,5 M Na-Acetat, 250 mM EDTA-Lösung (Kit-Komponente) und 60 µl EtOH (96 %) gefällt und durch Zentrifugation bei RT mit 15.000 U/min für 30 min pelletiert. Nach einem Waschschrift (70 % EtOH) und anschließender Trocknung ist das Pellet in 4 µl Formamid-Gellade-Puffer (Kit) aufgenommen worden. Die Analyse der Proben erfolgte in einem ABI Prism 373 DNA-Sequencer (Perkin Elmer) am Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung der Universität Halle-Wittenberg (Direktor: Prof. H. Pauer). Die Sequenzierung der Proben zur Detektion von *TP53*-Mutationen wurde am Humangenetischen Institut des Universitätsklinikums Leipzig von Frau Dr. Barbara Thamm durchgeführt.

3.3 DNA-Arbeiten

3.3.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Analyse von PCR-Produkten und Plasmiden erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung in Abhängigkeit von der zu erwartenden Fragmentlänge in 1 – 2 %igen Agarosegelen (jeweils 100 ml 0,5X TBE-Puffer versetzt mit 5 µl Ethidiumbromidstammlösung [10 mg/l]). Die Elektrophorese wurde in Gelkammern der Fa. Bioplex mit 0,5X TBE als Laufpuffer durchgeführt. Dazu wurden die Proben entweder in 10X Bromphenolblau-Puffer bzw. 6X Xylencyanol-Puffer aufgenommen und vor dem Einfüllen in die Geltaschen für 10 min bei 65 °C erhitzt. Die Trennung erfolgte mit 10 V/cm. Nach dem Gellauf wurden die Banden mittels UV-Licht sichtbar gemacht und mit dem Geldokumentationssystem Imagemaster 3.0 (Amersham Pharmacia) ausgewertet. DNA-Längenstandards dienten der Größenbestimmung der DNA-Fragmente.

50X TBE: (pH 7,5)	0,32	M	Saccharose
	5mM		MgCl ₂ x 6 H ₂ O
	10mM		Tris
	1%		Triton X-100 (v/v)
10X Bromphenolblaupuffer:	20	%	Ficoll 400 (w/v)
	0,05	M	EDTA
	0,25	%	Bromphenolblau (w/v)
	5,7	%	Eisessig (v/v)
6X Xylencyanolpuffer: (pH 7,5)	15	%	Ficoll 400 (w/v)
	0,25	%	Xylencyanol (w/v)

3.3.2 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen

Zur Isolierung von PCR-Produkten bzw. Restriktionsansätzen wurden zunächst 4/5 des Ansatzes auf einem Agarosegel aufgetrennt (3.3.1). Anschließend ist die gewünschte Bande auf einem UV-Tisch mit einem sterilen Einmalskalpell aus dem Gel ausgeschnitten worden. Die Reinigung erfolgte schließlich mit dem QiaQuick Gelextraction Kit (Qiagen) entsprechend der Angaben des Herstellers, mit der Ausnahme, dass zum Schmelzen der Agarose der Puffer QX1 aus dem QiaEx Gelextraction Kit angewendet wurde.

3.3.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese von PCR-Produkten

Die Analyse von Mikrosatelliteninstabilitäten erfolgte durch die Auftrennung der PCR-Produkte in einem 6,7- bzw. 8 %igem Polyacrylamidgel mit anschließender Silberfärbung des Gels.

3.3.3.1 Gellauf

Vor dem Zusammenbau der Gelkammer sind die Platten, Spacer und Kämmen intensiv mit 70 %igem Ethanol gereinigt worden. Die Pufferkammer wurden zudem mit Blueslick™ behandelt, wodurch ein späteres Ablösen des Gels von der Glasplatte erleichtert wird. Anschließend ist die Gelkammer entsprechend der Herstellerangaben zusammengebaut worden. Die Gellösung (ca. 100 ml) wurde sterilfiltriert und unter Vakuum entgast. Unmittelbar vor dem Gießen mischt man ca. 80 ml entgaste Gellösung mit 1 ml 10 % APS (w/v) und 3 ml 10 % TEMED (v/v). Nach der Polymerisation des Gels (ca. 1 h) erfolgte der Vorlauf des Gels bei 100 Watt, um das Gel auf ca. 50 °C zu erhitzen.

Die mit Isopropanol gefällten PCR-Produkte (zwischen 14 und 25 µl) wurden in 8 µl Probenpuffer aufgenommen, unmittelbar vor dem Auftragen durch Erhitzen denaturiert und bis zum Auftragen auf das Gel auf Eis gelagert.

Der Gellauf erfolgt bei 80 Watt und einer Geltemperatur von 50 °C. Die Laufzeit richtete sich nach der Länge des untersuchten PCR-Produkts und lag bei der Analyse der Mikrosatelliten D12S80a und D12S83a bei 120 min.

Gellösung:	8 %ig	6,7 %ig
	113,4 g	113,4 g Harnstoff
	108 ml	117ml Bidest. H ₂ O
	27 ml	27ml 10X TBE
	53,8 ml	45ml Acrylamid/Bisacrylamid (29/1) 30 %ig

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

3.3.3.2 Silberfärbung

Nach Beendigung des Gellaufs löst man vorsichtig die Pufferkammer von der Glasplatte und spannt einen Färberahmen aus Plexiglas auf die Glasplatte. Die Banden wurden mittels Silberfärbung sichtbar gemacht.

1. das Gel kurz mit Bidest. abspülen
2. 5 min mit 10 %igem Ethanol spülen
3. 3 min mit 1 %iger Salpetersäure (15 ml 65 %ige Salpetersäure auf 1 l Bidest.) inkubieren und kurz mit Bidest. abspülen
4. 20 min Färbung mit 0,2 % AgNO₃ (dazu das Gel abdecken)
5. kurz mit Bidest. abspülen
6. zum Entwickeln: die Natriumcarbonat-Formalin-Lösung (Kit) mehrmals wechseln
7. Abstoppen: 2 min mit 10 %iger Essigsäure spülen und 2 min mit Bidest. spülen

Anschließend das Gel auf Filterpapier übertragen, mit Folie abdecken und für 1 h bei 80 °C unter Vakuum trocknen.

3.4 Klonierung von DNA-Fragmenten

3.4.1 Enzymatische Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Für die hydrolytische Spaltung von doppelsträngiger DNA unter Verwendung von Endonukleasen wurden die vom jeweiligen Hersteller empfohlen Temperatur- und Salzbedingungen gewählt.

3.4.2 Ligation von PCR-Produkten in TOPO-TA Vektoren

Zur direkten Klonierung von PCR-Produkten in den pCR 2.1-Vektor wurde der TOPO-TA-Cloning Kit der Fa. Invitrogen genutzt, der aufgrund der überhängenden Thymidinbasen eine hocheffiziente Ligation ermöglicht. Für jeden Ansatz sind jeweils 4 µl gereinigtes PCR-Produkt verwendet worden. Die Klonierung erfolgte nach Herstellerangaben.

3.4.3 Ligation von Oligonukleotiden

Vor der Ligation der Oligonukleotide (ODNs) *MDM2-AS* und *MDM2-MM* (Mismatch-Kontrolle) erfolgte die Bindung der einzelnen ODNs aneinander zu einem doppelsträngigen DNA-Fragment: für *MDM2-AS* die ODNs *MDM2-AS forward* und *MDM2-AS-reverse*, im Falle von *MDM2-MM* die ODNs *MDM2-MM forward* und *MDM2-MM reverse*. Dazu wurden die zueinander komplementären ODNs im gleichen molaren Verhältnis gemischt, der Ansatz auf 65 °C erwärmt und mit einer Rate von 0,5 °C/min schrittweise auf RT abgekühlt. Der Vektor pSP6mU6 ist mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *NsiI* entsprechend der Angaben des Herstellers sequentiell verdaut worden. Der Ligationsansatz bestand aus einem Aliquot der (200 ng) doppelsträngigen ODNs, 100 ng des geöffneten Vektors sowie 5 U T4-DNA-Ligase. Die Inkubationszeit betrug 4 h bei einer Temperatur von 16 °C.

3.4.4 Herstellung RbCl₂-kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung RbCl₂-kompetenter Zellen wurden 100 ml LB-Medium mit 1 ml einer *E. coli*-Zellkultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Das nach Zentrifugation (1.000 x g bei 4 °C) gewonnene Zellpellet wurde auf Eis für 15 min gekühlt, in 0,4 Volumen TFBII resuspendiert, weiter 15 min auf Eis inkubiert und wie oben beschrieben zentrifugiert. Nach Resuspendierung der Zellen in 0,04 Volumen TFBII und

Inkubation für 15 min auf Eis wurden 200 µl Aliquote in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

TFBI:	100	mM	RbCl ₂ (pH 5,8)
	30	mM	KCl
	10	mM	MnCl ₂
	15	% (v/v)	Glycerol

TFBII:	10	mM	RbCl ₂
	10	mM	MOPS (pH 6,5)
	75	mM	CaCl ₂
	15	% (v/v)	Glycerol

3.4.5 Transformation von *E. coli*-Zellen

Ein 100 µl-Aliquot chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen (TOP10 bzw. GM2163) wurde auf Eis aufgetaut und unter vorsichtigem Mischen mit 8 µl des Ligationsansatzes (2 µl bei TOP10-Zellen) für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem 2-minütigen Hitzeschock bei 42 °C wurden die Bakterien sofort für 2 min auf Eis gekühlt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 900 µl LB-Medium (SOC-Medium für TOP10-Zellen, Kit-Komponente) und eine Inkubationszeit von 1 h bei 37 °C unter leichtem Schütteln (200 U/min). 50, 200 und 750 µl (25 und 100 µl bei TOP10) des Transformationsansatzes wurden auf Selektionsagar ausplattiert und ÜN bei 37 °C inkubiert.

Positive Transformanden wurden durch die Zugabe von 50 µg/ml Ampizillin selektiert. Bei Verwendung von TOP10-Zellen erfolgte zusätzlich eine Blau/Weiß-Selektion mit X-Gal (40 µg/ml).

3.4.6 Selektion positiver Transformanden

Zur Selektion positiver Transformanten wurde ein Teil der Kolonie mit einem sterilem Zahnstocher gepickt, in 20 µl H₂O überführt, der Ansatz mit PCR-Puffer (1X), MgCl₂ (2,5 mM), den entsprechenden Primern (25 pmol), Q-Solution (1X) und 2,5 U HotStarTaq™ supplementiert (Gesamtansatz 50 µl). Die Amplifikation erfolgte wie unter 3.2.2.1 beschrieben, mit der Modifikation, dass der erste Denaturierungsschritt für 20 min statt für 15 min durchgeführt wurde.

Die PCR Produkte wurden in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und analysiert. Von Kolonien, die ein Plasmid mit dem gewünschten Insert enthielten, wurde mit einem sterilen Zahnstocher ein Teil der Kolonie zur Anzucht einer Übernachtskultur in LB-Medium (supplementiert mit 50 µg/ml Ampizillin) gepickt. Von diesen ÜN-Kulturen wurden anschließend wie unter 3.1.6.1 beschrieben die Plasmide isoliert und durch PCR und Sequenzierung analysiert.

3.5 Splice Capture Assay zur Identifizierung neuer Spliceformen

Der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Splice Capture Assay erlaubt die schnelle Identifizierung, Isolierung und Charakterisierung neuer Spleißformen der *MDM2*-mRNA. Dieser Assay kombiniert die Erstellung einer (RT)-PCR-Bibliothek der Spleißformen („Capture“) mit der Restriktionsanalyse der PCR-Produkte durch die Restriktionsendonucleasen *MseI*, *HindIII*, *DsaI* und *BsrI* (Abb. 3-2). Die ausgewählten Enzyme erzeugen jeweils ein spezifisches Spaltmuster der *MDM2*-cDNA, da sie unterschiedlich viele Erkennungssequenzen in verschiedenen Domänen aufweisen.

Im Einzelnen umfasst der Splice Capture Assay folgende Schritte:

1. Umschreibung der Gesamt-RNA des Tumor- bzw. Normalgewebes in cDNA mit Zufallsprimern (3.2.1)
2. PCR-Amplifikation der cDNA mit spezifischen Primern für *MDM2* (3.2.2.1)
3. direkte Klonierung der PCR-Produkte in den pCR-2.1-TOPO-Vektor (3.4.2)

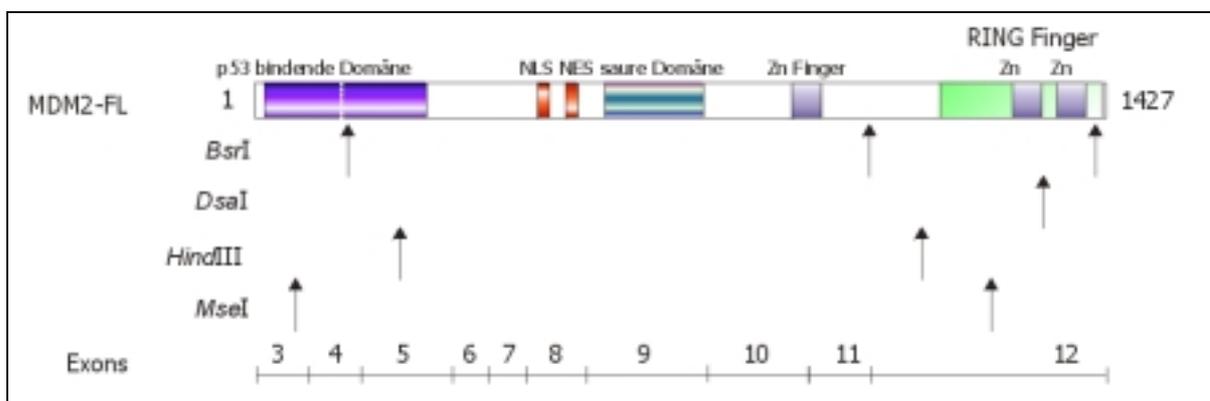


Abb. 3-2: Erkennungs- und Spaltstellen der verwendeten Restriktionsenzyme

Die Abbildung zeigt die Erkennungsstellen der beim Splice Capture Assay benutzten Restriktionsenzyme (*DsaI*, *MseI*, *HindIII*, *BsrI*) auf dem durch die Primer MDM2-1 und MDM2-8 amplifizierten PCR-Produkt. Durch die Verwendung mehrerer Enzyme entsteht für jede Spleißform ein charakteristisches Spaltmuster, das Rückschlüsse auf die in der Spleißform enthaltenen Domänen zulässt.

4. Transformation von *E. coli*-Zellen und Selektion positiver Transformanden (3.4.5.)
5. Isolierung der Plasmide, anschließend erneute PCR mit den o.g. Primern (3.1.6.1)
6. Restriktionsverdau der PCR-Produkte mit bis zu 4 verschiedenen Restriktionsenzymen (*DdeI*, *MseI*, *HindIII*, *BsrI*) (3.4.1)
7. Auftrennung im Agarosegel und Färbung mit Ethidiumbromid (3.3.1)
8. densitometrische Analyse des Spaltmusters mit Hilfe der Software VDS Imagemaster 3.0 (Amersham Pharmacia)

Anschließend wurden sowohl die Spaltmuster der bekannten und charakterisierten Spleißformen, die durch den Verdau mit den jeweiligen Restriktionsenzymen erhalten worden waren, als auch die Muster anderer bzw. neuer Spleißformen miteinander verglichen und analysiert. Durch die Anwendung des Splice Capture Assays war es möglich, vor der Sequenzanalyse der PCR-Fragmente Informationen über die fehlenden Exonen in der untersuchten Spleißform zu erhalten.

3.6 Northern Blot Analysen

Zur Analyse der *MDM2*-mRNA-Expression in WTS mittels Northern Hybridisierung wurden jeweils 5 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die Gelelektrophorese, der Transfer auf die Blot-Membran sowie die Hybridisierung erfolgten nach Standardmethoden¹⁰⁵. Als Sonde diente die gesamte kodierende Region der *MDM2*-cDNA.

3.7 Western Blot Analysen

3.7.1 Isolierung von Proteinen aus Gewebe und Zellkulturen, Proteinbestimmung

Die Isolierung von Proteinen aus Zellkulturen und Gefrierproben erfolgte anhand von Standardprotokollen¹⁰⁵. Dazu wurde das Zellpellet oder bis zu 10 jeweils 20 µm dicke Gefrierschnitte in Laemmli-Puffer aufgelöst. Das Zellhomogenat ist anschließend 10 min auf 95 °C erwärmt und kurz mit Ultraschall behandelt worden (2 x 10 s). Die löslichen Proteine wurden durch Zentrifugation (10 min, 12.000 U/min) gewonnen. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der Protein Assay Kit (Sigma) entsprechend der Herstellervorgaben genutzt. Die Lagerung der aliquotierten Proben erfolgte bis zur Verwendung bei -20 °C.

3.7.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte in SDS-Polyacrylamid-Gelen in einer Gelapparatur der Fa. Biometra. Die Gele wurden in Abhängigkeit von der Größe des untersuchten Proteins als 10 – 12,5 %ige Trenngele und 5 %ige Sammelgele mit einer Dicke von 1 mm gegossen. Die Proben sind vor dem Auftragen jeweils so verdünnt worden, dass 30 µg Protein in 20 µl Laemmli-Puffer gelöst waren. Anschließend wurden die Proben mit Auftragspuffer versetzt, auf das Gel aufgetragen, 10 – 30 min bei 18 mA im Sammelgel und 90 – 120 min bei 35 mA im Trenngel aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn die Bromphenolblau-Bande das untere Ende des Gels erreicht hatte. Zur Größenbestimmung wurde ein Protein-Molekulargewichtsmarker mitgeführt (Fa. Life Technologies).

Sammelgelpuffer: 1 M Tris/HCl (pH 6,8)

Trenngelpuffer: 1 M Tris/HCl (pH 8,8)

Lauf-Puffer: 25 mM Tris
192 mM Glycin
0,1 % SDS

3.7.3 Übertragung von Proteinen auf eine PVDF-Membran

Nach dem Gellauf wurden die aufgetrennten Proteine durch Semi-Dry-Blotting in einer Fastblot Transferkammer (Fa. Biometra) auf eine PVDF-Membran (0,45 µm Porengröße, Millipore) übertragen. Die Membran wurde vor dem Blotten zunächst in Methanol aktiviert, anschließend kurz mit Bidest abgespült und in Transferpuffer präinkubiert. Zum Blotten wurden 5 Lagen in Transferpuffer getränktes Filterpapier, die befeuchtete PVDF-Membran, das PAA-Gel (Sammelgel vorher abtrennen) und wiederum 5 Lagen Filterpapier luftblasenfrei in die Blotapparatur geschichtet. Der Transfer erfolgte bei 500 mA für 60 min bei Proteinen mit einer Größe von etwa 20 kDa und bei 540 mA für 70 min bei Proteinen mit einer Größe bis zu 90 kDa. Die Transfereffizienz wurde durch reversible Färbung der Membran mit Coomassie-Blau-Lösung bestimmt.

3.7.4 Immunfärbung mit spezifischen Antikörpern

Zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurde der Blot für 1 h in 5 % Trockenmilch in PBS-Tween unter leichtem Schütteln inkubiert und anschließend 3 x mit PBS-Tween gewa-

schen. Der Antikörpernachweis erfolgte im Miniblotssystem der Fa. Biometra, das eine unabhängige Analyse der einzelnen Gelspuren erlaubt (2 x 16 Spuren). Die spezifischen Antikörper wurden in PBS-Tween verdünnt (Tab. 3-1) und der Blot unter leichtem Schütteln bei RT 1 h inkubiert und anschließend 1 x 15 min und 2 x 5 min mit PBS-Tween gewaschen. Die entsprechenden sekundären, mit Peroxidase konjugierten Antikörper wurden ebenfalls in PBS-Tween laut Herstellerangaben verdünnt (Tab. 3-1), der Blot wiederum für 1 h unter leichtem Schütteln bei RT inkubiert und anschließend 1 x 30 min und 2 x 15 min gewaschen. Zum Nachweis der Antikörperbindung wurde das ECL Western Blotting Detecting System (Amersham Pharmacia) nach Angaben des Herstellers verwendet. Dazu wurden die Lösungen A und B zu gleichen Teilen (je 7 ml) gemischt und die Membran damit für 1 min benetzt. Zur Detektion der Chemieluminiszenz wurde der Blot in Folie eingeschweißt und für 30 s bis 30 min auf Kodak Biomax-Filme gelegt. Die Intensität der Banden wurde densitometrisch nach Einscannen des entwickelten Films mit Hilfe der Software VDS Imagemaster 3.0 (Fa. Amersham) ermittelt.

Zur Quantifizierung der Proteinbanden wurden die Intensitäten der Banden wie oben beschrieben gemessen und gegen die Intensität der TP53-Bande der Zelllinie RD (10 µg) standardisiert, die auf dem gleichen Gel aufgetragen worden ist. Anschließend ist dieser Wert durch die Intensität der Actin-Bande der jeweiligen Probe geteilt worden, deren Wert ebenfalls gegen die TP53-Bande normiert wurde. Die erhaltenen Werte für die Proteinexpression wurden entsprechend einer semiquantitativen Skala als keine, schwache, erhöhte und starke Expression eingeteilt.

Tab. 3-1: Verdünnungen der in dieser Arbeit verwendeten Primär- und Sekundärantikörper

<i>Antigen</i>	<i>Antikörper/Klon</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Antigen</i>	<i>Antikörper/Klon</i>	<i>Verdünnung</i>
TP53	DO-7	1:500	MDM2	4B2	1:1000
	Pab1801	1:500		2A9	1:1000
MDM2	1B10	1:500	p14ARF	C18	1:100
	IF-2	1:500	Actin	AC41	1:3000
	N20	1:100		Anti-Ziege	1:2000
	C18	1:100		p0161	1:2000
	2A10	1:1000		p0448	1:2000

3.8 Immunhistochemie

Immunhistochemische Untersuchungen wurden entweder an Paraffin- oder Acetonfixierten Kryoschnitten durchgeführt. Die verwendeten Antikörper sind in Tab. 2-2 beschrieben. Das nachfolgend dargestellte Protokoll kann für Paraffin- und Gefrierschnitte gleichermaßen verwendet werden (bei Gefrierschnitten entfällt die Entparaffinierung).

1. Anfertigung von 4- μ m Paraffinschnitten
2. Schnitte auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger (Superfrost, Fa. Menzel) aufziehen
3. Objektträger 15 min bei 60 °C inkubieren
4. Entparaffinierung im Xylolbad (2 x 5 min)
5. Schnitte in absteigender Alkoholreihe rehydrieren (2 x 3 min 99 % Ethanol, 2 x 1 min 95 % Ethanol, 2 x 1 min 70 % Ethanol)
6. Objektträger für 5 min in PBS pH 7,4 spülen
7. 30 min in 2 % H₂O₂-Lösung inkubieren (Abweichungen sind möglich und müssen für jedes Gewebe individuell ermittelt werden)
8. gilt nur für den MDM2-AK 1B10: den Objektträger in Zitronensäure-Puffer bei Überdruck kochen
9. 5 min Inkubation in 6 %iger Trägerproteinlösung zur Blockierung unspezifischer Bindungen
10. vorsichtig die Trägerproteinlsg. vom Präparat abtupfen
11. Auftragen des Primär-Antikörpers (50 μ l einer 5 mg/ml AK-Lsg. [1:200 verdünnen] je Objektträger)
12. Inkubation in feuchter Kammer 1 h bei RT oder ÜN bei 4 °C
13. zweimal für 5 min mit PBS pH 7,4 spülen
14. 10 min mit biotinyliertem Sekundär-AK bei RT inkubieren (Anti-Maus- oder Anti-Kaninchen-Ig)
15. zweimal für 5 min mit PBS pH 7,4 spülen
16. 10 min mit Peroxidase-konjugierter Streptavidin-Lösung bei RT inkubieren
17. zweimal für 5 min mit PBS pH 7,4 spülen

18. 3 – 5 min mit AEC enthaltender Chromogen-Lsg. (DAKO) inkubieren, zweimal für 5 min mit PBS pH 7,4 spülen
19. mit Hämatoxilin gegenfärben und bläuen
20. Eindecken der Schnitte mit Gelatine (Merck)

Die gefärbten Präparate wurden von jeweils zwei Begutachtern unabhängig voneinander ausgewertet. Im Falle von unterschiedlichen Ergebnissen in der Begutachtung wurde die Färbung für die fraglichen Proben an neuen Schnitten des gleichen Präparats wiederholt. Eine Probe wurde dann als positiv bewertet, wenn mindestens 10 % der Tumorzellen eine signifikante Färbung aufwiesen ³¹.

1X PBS (pH 7,4):	120	mM	NaCl
	2,7	mM	KCl
	7	mM	Na ₂ HPO ₄
	3	mM	NaH ₂ PO ₄

3.9 Zellkultur

Die Anzucht eukaryotischer Zellen erfolgte als adhärenente „Monolayer“ in Dulbecco´s Modifizierten Eagle Medium bei 37 °C, 5 % (v/v) CO₂ und maximaler Luftfeuchtigkeit in sterilen 25 ml- oder 250 ml-Zellkulturflaschen. Für spezielle Anwendungen (z.B. Transfektionsversuche) wurden die Zellen in 6- oder 24-Loch-Mikrotiterplatten bzw. 100-mm-Petrischalen kultiviert. Das Zellkulturmedium enthielt, wenn nicht gesondert angegeben, keine Antibiotika.

Konfluent gewachsene Zellen wurden nach Trypsinierung im Verhältnis 1/3 passagiert. Dazu wurde das Medium abgegossen, die Zellen mit PBS pH 7,4 (Kap. 3.7) gewaschen und 5 min bei 37 °C mit Trypsin inkubiert, die Reaktion durch Zugabe von Zellkulturmedium abgestoppt, die Zellen abzentrifugiert (500 x g für 5 min) und nach Resuspendierung in frischem Medium in neue Flaschen umgesetzt. Da die für die Virusexpansion genutzten 293-Zellen sehr empfindlich sind, sollte die Inkubationszeit mit Trypsin bei diesem Zelltyp nicht länger als 1 min betragen. Für Transfektionsversuche wurden die Zellen vor dem Aussäen mit Hilfe eines Coulter Zellzählgerätes ausgezählt und mit der entsprechenden Zelldichte in 100 mm Petrischalen eingesetzt.

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen nach Trypsinierung in 1 ml Einfriermedium aufgenommen, in 2 ml-Gefrieröhrchen überführt, 24 h bei -20 °C, 24 h bei -80 °C und anschließend bis zur Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zellkulturmedium: DMEM (HEPES-gepuffert; Life Technologies)

10	% (v/v)	Fötales Kälberserum
2	mM	Na-Pyruvat

Trypsinlösung: 0,1 % (w/v) Trypsin
1 X PBS pH 7,4

Einfriermedium: 50 ml DMEM
10 ml FKS
7,5 ml DMSO

3.10 Arbeiten mit Adenoviren

Alle Arbeiten in Verbindung mit Adenoviren wurden in der Abteilung Molecular Pharmacology des St. Jude Children's Research Hospital (Memphis, TN, USA) im Labor von Dr. Linda Harris durchgeführt.

Für die Konstruktion eines adenoviralen Vektors ist es zunächst erforderlich, das gewünschte Gen in ein adenovirales Plasmid – hier pAVS6a.Cla (Tab. 2-3) – zu klonieren, das ein homologes Rekombinationsfragment (HRF) enthält. Dieses Plasmid kann mit replikationskompetenter adenoviraler DNA rekombinieren. Das hier für die Konstruktion der Add/327-MDM-AS und Add/327-MDM-MM beschriebene Protokoll kann mit entsprechenden Modifikationen auch leicht auf andere Adenoviren übertragen werden.

Des Weiteren umfasst die Herstellung eines adenoviralen Vektors die folgenden Arbeitsschritte:

1. Expansion und Reinigung des replikationskompetenten Adenovirus Add/327 (3.8.1)
2. DNA-Präparation des replikationskompetenten Adenovirus (3.1.7)
3. Entfernen der E1-Region aus dem adenoviralen Genom durch Restriktionsverdau mit *ClaI*
4. Kotransfektion des adenoviralen Plasmids pAVS6a.Cla mit der adenoviralen DNA
5. Isolieren, Expandieren und Charakterisieren (DNA-Isolation und PCR) der entstandenen Plaques
6. die positiven Plaques expandieren und reinigen, den Reinigungsschritt mindestens zweimal wiederholen
7. weitere Expansion des Virus

8. auf Kontamination mit replikationskompetentem Adenovirus prüfen (PCR für die Gene E1a)
9. wenn das E1a-Gen noch vorhanden ist, die Schritte 5 – 8 wiederholen
10. liegt keine wt-Kontamination vor, das Virus titrieren

3.10.1 Expansion und Reinigung von Adenoviren

Zur Expansion des Adenovirus *Add327* wurden zunächst 293-Zellen in 25 T162 Zellkulturflaschen bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % angezüchtet. Die Infektion der Zellen mit dem Virus erfolgte in Infektionsmedium; dazu verdünnt man 1 µl der Virusstammlösung in 4 ml Infektionsmedium (für 25 Flaschen benötigt man 25 µl Viruslösung in 100 ml Infektionsmedium). Das alte Kulturmedium wurde durch jeweils 4 ml des Infektionsmediums ersetzt und die Flaschen für 2 h im Brutschrank (37 °C, 10 % CO₂) inkubiert. Da die 293-Zellen sehr empfindlich sind, sollte man nicht mehr als 3 Flaschen gleichzeitig aus dem Brutschrank nehmen. Anschließend wurden je Flasche 20 ml des regulären Mediums (DMEM mit 10 % FKS) hinzugefügt. Es folgte eine Inkubationszeit von 2 – 4 Tagen. Die Zellen wurden geerntet, sobald bei den meisten Zellen Anzeichen der bevorstehenden Lyse erkennbar waren (die Zellen vergrößern sich und zeigen eine abgerundete Form). Es ist wichtig, das Zellwachstum genau zu überwachen, da die Zellen geerntet werden sollen, bevor die Lyse der Zellen einsetzt und so die Viren in das Medium abgegeben werden.

Die Zellen wurden durch leichtes Klopfen der Flasche und wiederholtes Auf- und Abpipettieren des Mediums von der Flasche gelöst, in ein 50-ml-Falcon-Röhrchen überführt und abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Prozedur mit den restlichen Flaschen wiederholt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt belässt man ca. 5 ml des Überstandes, um die Zellen resuspendieren zu können. Das Pellet kann bei –70 °C eingefroren oder weiter bearbeitet werden.

Infektionsmedium: DMEM mit 2 % FKS

Die Reinigung des Adenovirus erfolgte durch zweimalige Zentrifugation mit einem CsCl-Gradienten in einer Ultrazentrifuge (L8M Beckman Zentrifuge).

1. Lyse der Zellen durch mind. 5-maliges Auftauen/Einfrieren des Zellpellets (Einfrieren auf Trockeneis für 5 min, Auftauen bei 37 °C im Wasserbad für 2 min)

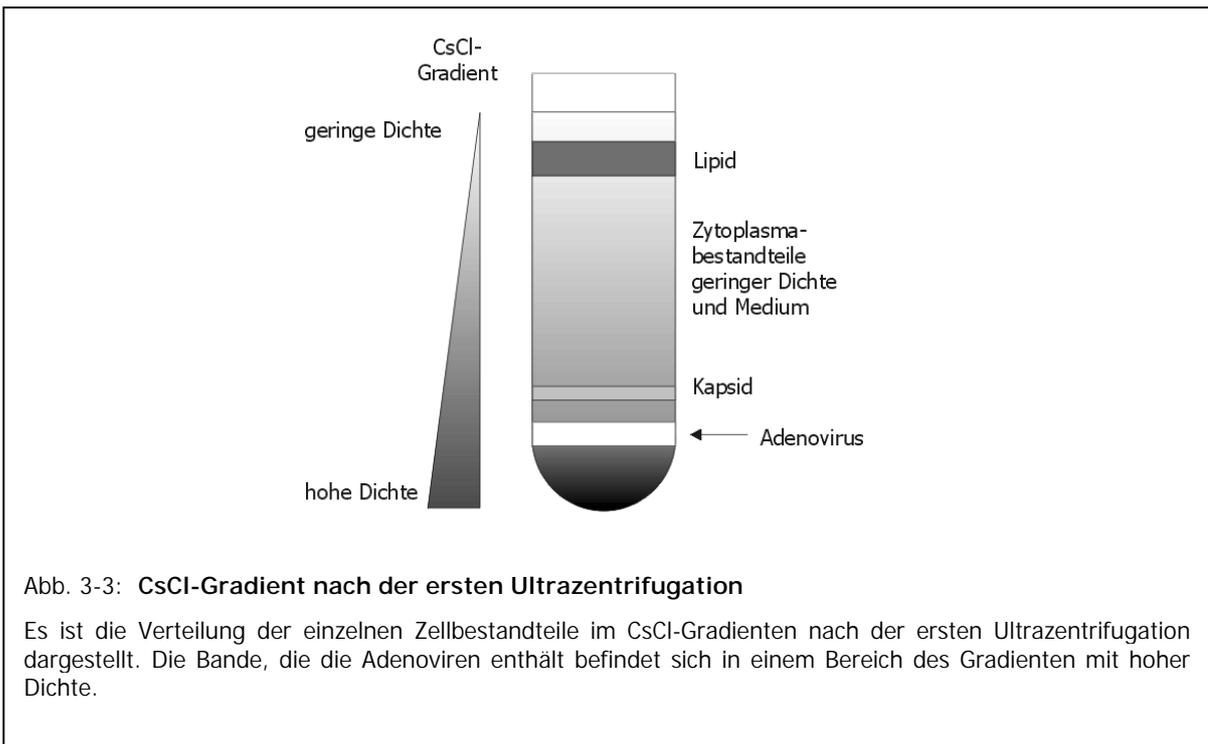


Abb. 3-3: CsCl-Gradient nach der ersten Ultrazentrifugation

Es ist die Verteilung der einzelnen Zellbestandteile im CsCl-Gradienten nach der ersten Ultrazentrifugation dargestellt. Die Bande, die die Adenoviren enthält befindet sich in einem Bereich des Gradienten mit hoher Dichte.

2. Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 9000 U/min für 5 min entfernen
3. den Überstand (enthält die Viren) abnehmen und mit PBS auf 4,5 ml auffüllen
4. in ein SW41 Röhrchen zunächst 2,5 ml CsCl-Lösung geringer Dichte einfüllen (1,25 g/ml)
5. darunter eine Schicht CsCl-Lösung hoher Dichte legen (1,4 g/ml)
6. auf den Gradienten vorsichtig (!) das Zelllysate pipettieren
7. für 1 h bei 35.000 U/min und 20 °C zentrifugieren
8. die oberen Phasen vorsichtig entfernen (Abb. 3-3) ohne die Bande mit den Viren zu zerstören
9. die die Viren enthaltende Bande vorsichtig mit einer Kanüle aufziehen
10. in ein SW41 Röhrchen 8 ml einer 1,3 g/ml CsCl-Lösung füllen und die Virus-Lösung aus der ersten Zentrifugation darüberschichten
11. bei 35.000 U/min und 20 °C für mind. 18 h zentrifugieren
12. die distinkte Bande mit dem Virus mit einer Kanüle vorsichtig absaugen
13. das Volumen des gereinigten Virus bestimmen, Glycerol bis zu einer Konzentration von 10 % (v/v) zugeben
14. Virus in Slide-A-Lyzer™ Kassette gegen 4 l Dialysepuffer bei 4 °C dialysieren

1X Dialysepuffer: 10 mM Tris (pH 6,8)
1 mM MgCl₂
10 % (v/v) Glycerol

3.10.2 Kotransfektion eukaryontischer Zellen

Alle Transfektionsexperimente wurden in endotoxinfreien 100 mm-Petrischalen durchgeführt. Da 293-Zellen sehr empfindlich gegen pH-Schwankungen sind, wurde mit HEPES-gepuffertem DMEM-Medium gearbeitet.

Einen Tag vor der Transfektion wurden 5 – 8 x 10⁶ 293-Zellen in 100 mm Petrischalen in regulärem DMEM-Medium (10 % FKS) ausgesät, so dass am nächsten Tag etwa eine Konfluenz von 80 % erreicht wurde. 3 h vor der Transfektion ist das Medium gewechselt worden. Zur Transfektion wurden 6 µg pAVS6a.Cla und 3 µg mit *Cla*I-verdaute adenovirale DNA gemischt. Gleichzeitig wurden 27 µl Fugene[®] in 263 µl serumfreiem DMEM verdünnt. Nach einer 5-minütigen Inkubationszeit ist das verdünnte Fugene-Reagenz tropfenweise in das Reaktionsgefäß mit der DNA überführt und weitere 15 min inkubiert worden. Anschließend wurde das Gemisch gleichmäßig, tropfenweise auf die Zellen verteilt. Am nächsten Tag wurde das Medium nochmals gewechselt. Zur Bildung der Plaques überschichtete man die Zellen schließlich mit 1 % Seaplaque Agarose und 1X DMEM supplementiert mit 10 % FKS sowie Fungizone[®] und Penicillin/Streptomycin (2 % Seaplaque-Agarose und 2X DMEM vor der Überschichtung mischen). Nach einer Woche wurde die Überschichtung wiederholt. Nach etwa 14 Tagen sind die Platten auf sich bildende Plaques hin untersucht worden.

3.10.3 Isolierung der Plaques

Das Isolieren der Plaques erfolgte mit Hilfe einer Pasteur-Pipette. Dazu wurde mit der Pipette in die Agarose gestochen und das Agarosestückchen angesaugt. Anschließend ist die Agarose mit ca. 250 µl DMEM-Medium aus der Pipette ausgespült worden. Vor der Lagerung bei –70 °C erfolgte die vollständige Lyse der 293-Zellen durch 5-maliges Einfrieren in Trockeneis und Auftauen bei 37 °C.

3.10.4 Charakterisierung der Plaques

Zur Isolation der viralen DNA wurde der Virus zunächst in kleinem Maßstab expandiert. Dazu sind 1 x 10⁶ 293-Zellen in 2 ml regulärem DMEM mit 10 % FKS in einer 6-Loch-Platte

ausgesät worden. Am nächsten Tag erfolgte die Zugabe von 100 µl der Viruslösung des jeweiligen Plaques. Nach vollständiger Lyse aller Zellen, wurde der Überstand inklusive der abgeschwommenen Zellen gewonnen und in ein 15 ml-Falcon-Röhrchen überführt. Vor der Weiterverarbeitung wurden die Zellen durch mehrmaliges Einfrieren/Auftauen (s. oben) vollständig lysiert. Anschließend ist die virale DNA wie unter 3.1.7 beschrieben mit Hilfe des MasterPure complete DNA/RNA Purification Kits der Fa. Epicentre isoliert worden.

Mit Hilfe einer PCR unter Benutzung der Primer mU6SP6 und AdITR (Tab. 2-5) und anschließender Sequenzierung (3.2.2.4) wurde die virale DNA der einzelnen Plaques auf das Vorhandensein der jeweiligen Sequenz (MDM2-AS bzw. MDM2-Mismatch-Kontrolle) geprüft. Die als positiv eingestuften Plaques wurden anschließend weiter aufgereinigt, indem mit dem Zellkulturüberstand der lysierten 293-Zellen des jeweiligen Plaques (s. oben) die Schritte, die in den Punkten 3.8.3. und 3.8.4 beschrieben sind, mindestens zweimal wiederholt worden sind.

Nach dem zweiten Reinigungsschritt wurden die Viren wie unter 3.8.1 beschrieben in einer T162-Flasche expandiert und über einen CsCl-Gradienten gereinigt. Auf die sich anschließende DNA-Isolation (3.1.7) folgte die Charakterisierung der viralen DNA in Bezug auf das Vorhandensein der E1A und E2B-Region der viralen wt-DNA¹⁰⁹. Wies die virale DNA keine Kontamination mit DNA des Wildtyps auf, konnte der Virus in großem Maßstab expandiert (3.8.1) und titriert werden.

3.11 MDM2-AS-Behandlung von xenotransplantierten WTS in Nacktratten

3.11.1 Xenotransplantation von humanen WTS in Nacktratten

Alle Tierexperimente wurden entsprechend eines vorliegenden und genehmigten Tierversuchsantrages (TVV-Nr.: 16/98, Regierungspräsidium Leipzig) unter Leitung von Prof. Dr. M. Schönfelder und PD Dr. Peter Würfl im Tierstall des Instituts für Immunologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig (Direktor Prof. Dr. Alber) unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Alle Experimentatoren sind vor den Versuchen über den sachgemäßen Umgang mit Versuchstieren geschult worden und besaßen die erforderlichen Qualifikationen.

Für die Xenotransplantation wurden den ca. 8 Wochen alten Nacktratten (Rh-nu/nu) durchschnittlich 5×10^6 Einzelzellen der Zelllinie RD, die zuvor *in vitro* kultiviert, trypsinisiert und in PBS gewaschen worden sind, in einem Volumen von 0,5 ml serumfreiem RPMI Zellkulturmedium intramuskulär an beiden Flanken in Narkose injiziert (Einmal-Spritzen mit Kanülen-Ø 1 mm). In den nächsten Wochen wurde das Tumorwachstum durch Ausmessen



Abb. 3-4: Xenotransplantattumor der Zelllinie RD auf einer Nacktratte

A. Zur Etablierung eines Xenotransplantattumors wurden 5×10^6 Einzelzellen der RD-Linie in die hintere Flanke injiziert. Weitere Einzelheiten s. Text. **B.** Nach der operativen Entfernung aus der Flanke des Tieres wurde der Xenotransplantattumor homogenisiert, um jedem Versuchstier die qualitativ vergleichbare Tumormasse zu implantieren. Die Abbildung zeigt ein Tumorstück direkt nach der Entnahme (links) sowie kleinere Stücke nach der Homogenisierung, wie sie schließlich implantiert worden sind (rechts)

nülen-Ø 1 mm). In den nächsten Wochen wurde das Tumorstück durch Ausmessen des Tumordurchmessers überwacht und dokumentiert. Erreichte der durchschnittliche Tumordurchmesser einen Wert von etwa 25 mm (Abb. 3-4), diente der Tumor als Gewebespender für eine weitere Xenotransplantation auf Nacktratten im Rahmen der *in vivo* Gentherapiestudien mit *MDM2*-Antisense-Oligonukleotiden (*MDM2*-AS ODNs). Dazu wurden die Tiere eingeschläfert und der Tumor aus den Flanken der Tiere präpariert. Zunächst wurden dem explantierten Tumorgewebe sichtbare nekrotische Bereiche entfernt und das verbleibende Gewebe vorsichtig mit einem Skalpell in etwa $1 - 2 \text{ mm}^3$ große Stücke zerkleinert (Abb. 3-5). Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass allen Tieren der Versuchsreihe Tumormaterial eines klonalen Ursprungs und vergleichbarer Qualität transplantiert werden konnte. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Gewebestücke für max. 2 h in einer feuchten Kammer auf Eis gelagert.

Die Implantation des Tumorgewebes erfolgte am narkotisierten Tier durch eine maximal 1,5 cm lange Inzision in der Bauchdecke. Das Tumorgewebe ist stets gleichmäßig auf alle 4 Quadranten des Peritoneums verteilt worden. In einer ersten Versuchsreihe wurden den Tieren jeweils 1 g, in einer zweiten Versuchsreihe jeweils 0,5 g zerkleinertes Tumorgewebe implantiert (3.10.2). Der Wundverschluss erfolgte schichtweise durch resorbierbare Nähte.

3.11.2 Nichtviraler Gentransfer *in vivo*

Die Applikation der potenziell therapeutisch wirksamen Oligonukleotide erfolgte kontinuierlich durch osmotische Alzet[®]-Minipumpen (Alza-Pharmaceuticals). Diese Pumpen haben

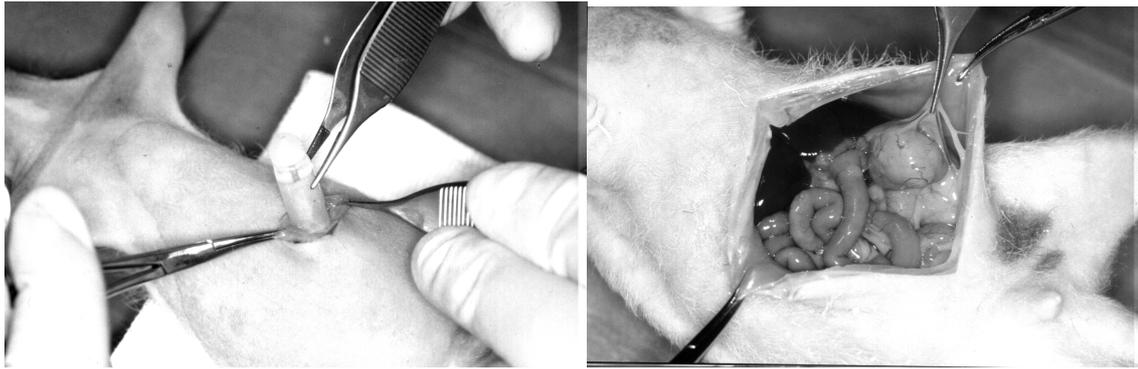


Abb. 3-5: **Implantation der osmotischen Minipumpe, Dokumentation des Tumorwachstums**

A. Sieben Tage nach Implantation des Tumorgewebes wurden den Versuchstieren die osmotischen Minipumpen eingesetzt (weitere Erläuterungen s. Text). **B.** Nach Beendigung der *MDM2*-Antisense-Therapie wurden die Tiere eingeschläfert und das Wachstum der Tumoren im Peritoneum dokumentiert. Die Abbildung zeigt einen Tumor der Sense-Kontrollgruppe 14 Tage nach Implantation des Tumorgewebes.

ein Volumen von 200 μl und erreichen eine Pumprate von 1 $\mu\text{l}/\text{h}$ über einen Zeitraum von einer Woche. Die Länge der Pumpen beträgt 30 mm, der Durchmesser 7 mm bei einem Gewicht von 1,1 g.

Die lyophilisierten *MDM2*-AS ODNs bzw. Kontroll-Oligonukleotide wurden in 0,9 %iger NaCl-Lösung („physiologische Kochsalzlösung“) aufgenommen, und zwar so, dass die entsprechende ODN-Menge genau in 200 μl gelöst war.

3.11.2.1 Versuchsreihe 1

24 Ratten (8 Wochen alt) wurden randomisiert in 4 Gruppen geteilt (7 Tiere je Gruppe, 5 Tiere je Kontrollgruppe). Jedem Tier sind 1 g Tumorgewebe in das Peritoneum implantiert worden (s. 3.10.1). Gleichzeitig erfolgte die Implantation der osmotischen Pumpen, die je nach Gruppeneinteilung mit 100 μg *MDM2*-AS ODN⁹⁰, mit 200 μg *MDM2*-AS2 ODN⁸⁶, mit 200 μg *MDM2*-SE ODN (Sense-Kontrolle) sowie mit bidestilliertem Wasser als Kontrolle gefüllt waren (Abb. 3-5).

Während der Therapie wurde sowohl das Gewicht der Tiere als auch das Tumorwachstum überwacht und dokumentiert. Zwei Wochen nach Versuchsbeginn (d.h. ebenso zwei Wochen nach Einsetzen der Pumpen) wurden die Tiere eingeschläfert. Alle makroskopisch sichtbaren Tumore wurden nach ausgiebiger Inspektion der gesamten Bauchhöhle vollständig entfernt und Anzahl und Gewicht bestimmt (Abb. 3-5). Von den Tumoren wurden Proben sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren bzw. für die immunhistochemische Evaluierung in Formalin fixiert.

3.11.2.2 Versuchsreihe 2

24 Ratten (8 Wochen alt) wurden in dieser Versuchsreihe randomisiert in 4 Gruppen eingeteilt (7 Tiere je Gruppe, 5 Tiere je Kontrollgruppe). Den Tieren sind – wie unter 3.10.1 beschrieben – 500 mg Tumorgewebe in das Peritoneum implantiert worden. Eine Woche später erfolgte die Implantation der osmotischen Pumpen, die entsprechend der Gruppeneinteilung mit 100 µg bzw. 200 µg *MDM2*-AS ODN, mit 200 µg *MDM2*-SE ODNs (Sense-Kontrolle) sowie mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllt waren (Abb. 3-5). Während der Therapie wurde sowohl das Gewicht der Tiere als auch das Tumorstadium überwacht und dokumentiert. Eine Woche nach Einsetzen der Pumpen (2 Wochen nach Versuchsbeginn) wurden die Tiere eingeschläfert. Alle makroskopisch sichtbaren Tumore wurden nach ausgiebiger Inspektion der gesamten Bauchhöhle vollständig entfernt und Anzahl und Gewicht bestimmt (Abb. 3-5). Von den Tumoren und verschiedenen inneren Organen (Leber, Milz, Muskel) wurden Proben sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren bzw. für die immunhistochemische Evaluierung in Formalin fixiert.

Die Auswertung der Proben umfasste die Bestimmung der Mitoserate (Anzahl der Mitosen per High Power Field) und den immunhistochemischen Nachweis der *MDM2* und TP53-Proteinexpression (3.6, 3.7).

3.12 Statistik

Die statistische Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte mit Hilfe der Software SPSS 9.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Als signifikant eingestuft wurden alle Werte bei einer Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$.

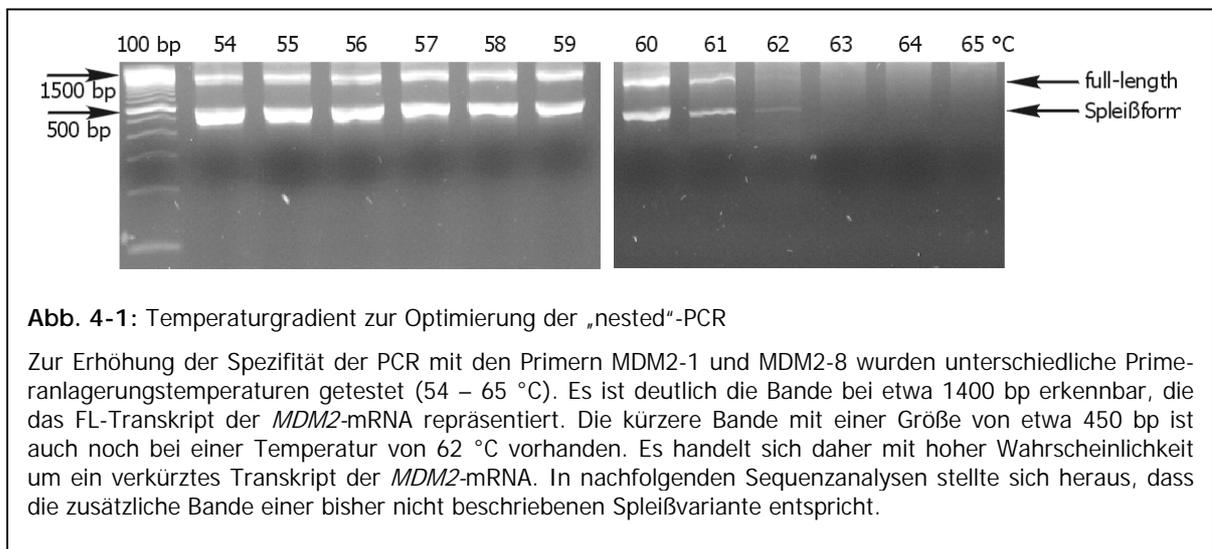
4 Ergebnisse

4.1 mRNA- und Proteinexpressionsstudien von MDM2 und p14ARF in WTS

4.1.1 RT-PCR zum Nachweis der *MDM2*-mRNA Expression

Von Sigalas *et al.*⁴² konnten 1996 u.a. in Blasen Tumoren insgesamt 5 verschiedene Transkripte der *MDM2*-mRNA nachgewiesen werden. Vorarbeiten aus unserer Arbeitsgruppe zeigten an ausgewählten WTS-Zelllinien, dass ebenfalls Transkripte verschiedener Größe im Northern Blot detektierbar waren¹¹⁰. Es sollte daher die Frage geklärt werden, ob auch in WTS-Tumorproben Spleißvarianten der *MDM2*-mRNA nachweisbar sind.

Für die Analyse stand von 87 Patienten Tumorgewebe zur Verfügung, aus dem Gesamt-RNA isoliert und mittels einer sensitiven RT-PCR-Methode untersucht wurde. Die Umschreibung der Gesamt-RNA in cDNA erfolgte generell mit Zufallsprimern, da bei der Verwendung von genspezifischen sowie Oligo-dT-Primern selbst bei Positivkontrollen (Zelllinie K562) keine *MDM2*-cDNA in der PCR amplifiziert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Für den Nachweis der *MDM2*-Transkripte in den Tumorproben wurden zunächst die Primer MDM2-2 und MDM2-3 ausgewählt (s. auch 2.9, 3.2.2.1), die den größten Teil des kodierenden Bereiches der *MDM2*-mRNA überspannen. Der Nachweis gestaltete sich bei Verwendung dieses Primerpaares sehr schwierig, die erzielten Ergebnisse waren nicht reproduzierbar (Daten nicht gezeigt). Daraufhin wurde eine „nested“-PCR durchgeführt. Die von Sigalas *et al.*⁴² beschriebene RT-PCR ist dazu teilweise modifiziert worden. Bei der „nested“-PCR wurde die cDNA in einem ersten Schritt mit den Primern MDM2-5 und MDM2-6 amplifiziert. Diese Primer binden im 5'- bzw. 3'-untranslatierten Bereich der *MDM2*-mRNA. Anschließend erfolgte eine zweite PCR-Amplifikation mit den Primern MDM2-1 und MDM2-8, die innerhalb

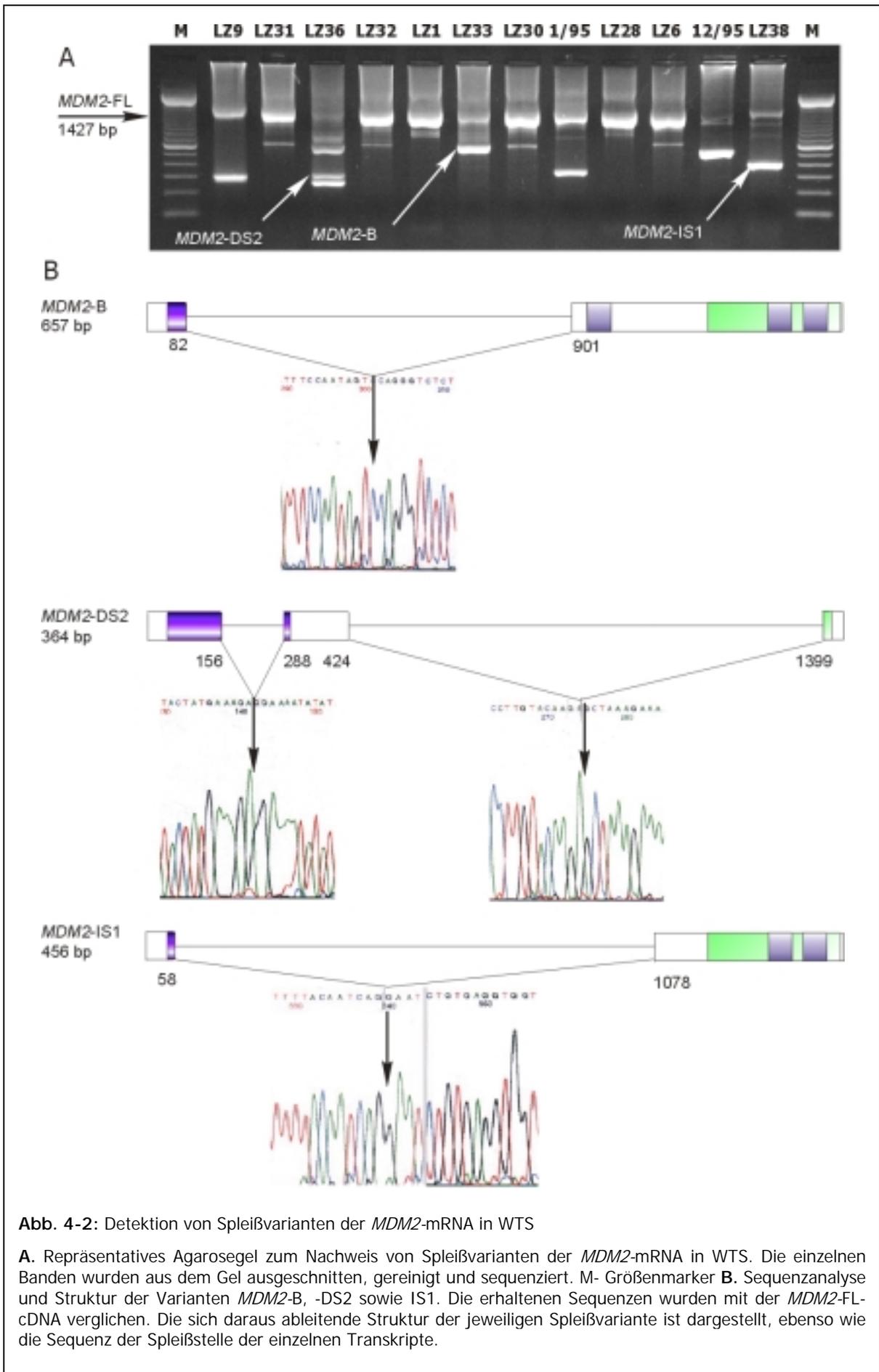


der von den Primern MDM2-5 und MDM2-6 amplifizierten Sequenz binden. Dadurch gelang es, Transkripte nachzuweisen, die in sehr geringer Kopienzahl vorkommen. Außerdem wurde durch die Verwendung von zwei Primerpaaren die Spezifität der amplifizierten Produkte sichergestellt. Dies ist in der Abb. 4-1 exemplarisch für die Probe LZ38 dargestellt. Nach der zweiten PCR mit den Primern MDM2-1 und MDM2-8 war neben der Bande für das „full-length“-Transkript (FL, 1427 bp) eine weitere Bande mit einer Größe von etwa 460 bp detektierbar. Diese Bande trat auch bei der Erhöhung der Annealing-Temperatur auf. Erst bei einer Temperatur von 62 °C sind sowohl die Bande für das FL- als auch die für das kürzere Fragment nicht mehr nachweisbar. Bei der nachfolgenden Sequenzanalyse der Bande stellte sich heraus, dass es sich hier um eine noch nicht beschriebene Spleißvariante der *MDM2*-mRNA handelt. Als Annealing-Temperatur der inneren Primer wurde 58 °C festgelegt.

4.1.2 Detektion verkürzter Transkripte der *MDM2*-mRNA in WTS

Mittels der unter 4.1.1 beschriebenen „nested“-PCR zum Nachweis der *MDM2*-mRNA-Expression konnten insgesamt 87 Proben von WTS-Patienten untersucht werden. Bei 85 von 87 Proben (98 %) war eine Bande, die dem FL-Transkript entsprach, mit einer Größe von 1427 bp nachweisbar. Die Integrität der Gesamt-RNA wurde durch den Nachweis der Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase-mRNA (GAPDH) überprüft. In allen Fällen war ein PCR-Produkt in der erwarteten Länge detektierbar (Daten nicht gezeigt).

Neben der Bande, die das FL-Transkript repräsentiert, waren in 51 von 85 Proben (60 %) zusätzlich kürzere Banden unterschiedlicher Länge nachweisbar. Die Anzahl der zusätzlichen Banden variierte zwischen den einzelnen Tumorproben. Während in einigen Proben eine weitere Bande mit stärkerer Intensität als die FL-Bande auftrat (z.B. in den Proben LZ33, 12/95, LZ38), so waren in anderen Proben eine Vielzahl von Banden mit geringerer Intensität detektierbar (Abb.4-2A). In jedem Fall wurden möglichst alle einzelnen Banden, die vermutlich verkürzte Transkripte der *MDM2*-mRNA repräsentieren, aus dem Agarosegel unter UV-Licht ausgeschnitten und gereinigt. Es gelang, von 47 der 51 Proben einzelne Banden zu charakterisieren und eindeutig Spleißformen der *MDM2*-mRNA zuzuordnen, d.h. 55 % aller von uns untersuchten WTS-Proben exprimierten *MDM2*-mRNA-Spleißvarianten. In allen untersuchten WTS-Proben konnten insgesamt 13 verschiedene Transkripte der *MDM2*-mRNA, einschließlich der FL-Form, nachgewiesen werden. Davon sind zwei Formen (*MDM2*-A und *MDM2*-B) bereits beschrieben worden⁴². Die anderen 10 Formen wurden im Rahmen dieser Studie erstmalig detektiert, charakterisiert und bezeichnet.



4.1.3 Detektion von *MDM2*-Spleißformen in Normalgewebe und Lymphozyten

Von 10 Patienten konnte auch an den Tumor grenzendes Normalgewebe (Muskel) mit in die Untersuchungen einbezogen werden. Als weitere Kontrolle stand Gesamt-RNA aus Blutlymphozyten gesunder Spender sowie eine Knochenmarksprobe zur Verfügung.

Die Gesamt-RNA aus dem Normalgewebe war von 7 Proben auswertbar, in den anderen Fällen konnte kein GAPDH-Transkript nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Von den 7 Normalgewebeproben wurde in 4 Fällen das FL-Transkript der *MDM2*-mRNA nachgewiesen (Abb. 4-3). Davon wiesen 3 zusätzliche verkürzte Banden im Agarosegel auf. In nur einem Fall konnte lediglich die Expression des FL-Transkripts gezeigt werden. Überraschenderweise exprimierten 3 der untersuchten Normalgewebeproben kürzere Varianten der *MDM2*-mRNA, jedoch nicht das FL-Transkript. Einige der Banden konnten nach der Reinigung aus dem Gel reamplifiziert und anschließend sequenziert werden. Dabei konnte eine neue *MDM2*-Spleißform (*MDM2*-N) identifiziert werden.

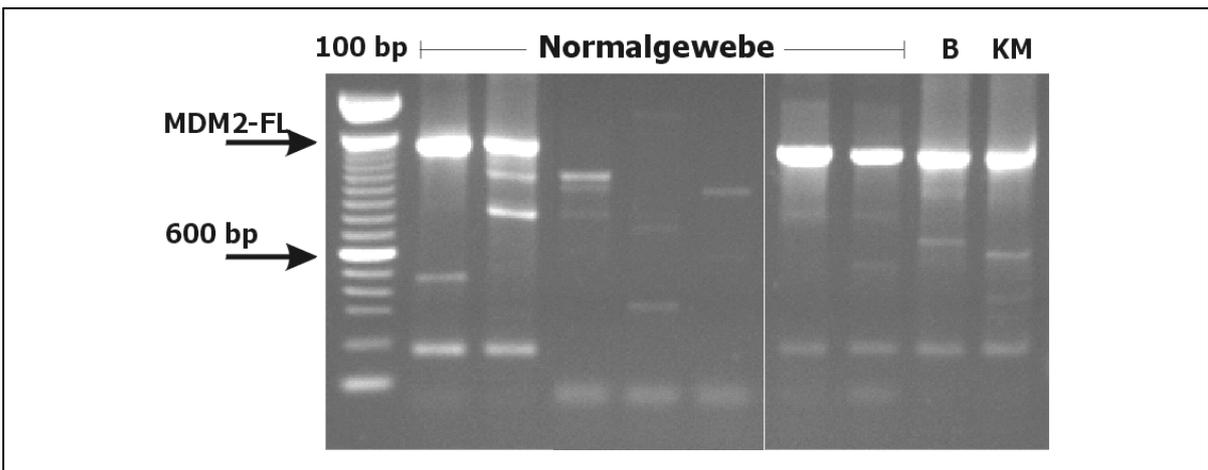


Abb. 4-3: Detektion verkürzter Transkripte der *MDM2*-mRNA in Normalgewebe und Blut

Sowohl in Normalgewebe (Muskel), in Lymphozyten als auch im Knochenmark konnten neben der FL-Variante auch verkürzte Transkripte der *MDM2*-mRNA nachgewiesen werden. Interessanterweise wurden in drei Normalgewebeproben ausschließlich die Spleißvarianten, nicht aber die FL-Variante exprimiert. 100 bp - Molekulargewichtsmarker, B – periphere Blutlymphozyten, KM – Knochenmark.

In den untersuchten Blut- und Knochenmarkproben konnte zusätzlich zum FL-Transkript jeweils eine kürzere Bande detektiert werden (Abb. 4-3). Die Sequenzanalyse ergab, dass es sich in beiden Fällen um bislang noch nicht beschriebene, aberant gespleißte Spleißvarianten der *MDM2*-mRNA handelt. Die in den Normalgewebeproben und in den Lymphozyten entdeckten Spleißformen werden ausführlich im Kapitel 4.1.4 und in Tab. 4-1 beschrieben.

4.1.4 Charakterisierung der Spleißvarianten der *MDM2*-mRNA

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

MDM2-A, *MDM2-B* und *MDM2-KB2*

Die beiden Varianten A (891 bp) und B (657 bp) sind mittlerweile bereits in einer Vielzahl von Tumoren detektiert worden, z.B. in Ovarial- und Blasen Tumoren⁴², in Mammakarzinomen¹¹¹, in Leukämien⁴² sowie in Astrozytomen und Glioblastomen¹¹². Die Variante B konnte zudem in Liposarkomen¹¹³, in Tumoren der Lunge¹¹⁴ sowie in Riesenzelltumoren des Knochens¹¹⁵ detektiert werden. In den hier untersuchten WTS-Proben konnte die Variante A in 7 von 47 Fällen (15 %), die Variante B in 17 von 47 Fällen (36 %) nachgewiesen werden. Die Spleißform *MDM2-B* ist somit neben der FL-Form die am häufigsten auftretende Variante der *MDM2*-mRNA.

Sowohl die Variante A als auch die Variante B sind alternativ gespleißte Formen der FL-mRNA (Abb. 4-4, Tab. 4-1), d.h. das Spleißen erfolgte an Exon/Intron-Grenzen. In der Variante A wurden die Exone 4 – 9 gespleißt. Die Sequenz des Exons 10 schließt sich direkt an die des Exons 3 an. Der Leserahmen bleibt dabei intakt. Der Variante B fehlen zusätzlich die Exone 10 und 11. Auch in diesem Fall kommt es nicht zu einer Verschiebung des Leserahmens. Durch das Spleißen der Exone 4 – 9 (bzw. 4 – 11) gehen in beiden Spleißformen große Teile der TP53-bindenden Domäne verloren (Abb. 4-4). Des Weiteren fehlen sowohl die Kernlokalisationssequenz (NLS) als auch die Kernexportsequenz (NES). Während die saure Domäne in der Variante A teilweise noch vorhanden ist, fehlt sie in Variante B vollständig. Die Sequenzen, die die Zink-Finger- und die RING-Finger-Domäne am C-terminalen Ende der cDNA kodieren, sind sowohl in der Spleißform A als auch in der Form B vorhanden. Die Isoform KB2 (Genbank-Eintrag: AJ278975) ist – vergleichbar mit den Varianten A und B – ebenfalls eine alternativ gespleißte Variante der *MDM2*-mRNA (Abb. 4-4, Tab. 4-1). Ihr fehlen die Exons 5 – 11. Diese Spleißform wurde bislang noch nicht in der Literatur beschrieben. In dieser Studie konnte sie in zwei WTS, einem Fibrosarkom und einem MFH, nachgewiesen werden¹⁰¹. Der offene Leserahmen wird durch den unmittelbaren Übergang vom Exon 4 auf das Exon 12 nicht beeinflusst.

Tab. 4-1: Zusammenfassung charakteristischer Eigenschaften der Spleißvarianten der *MDM2*-mRNA in WTS. Die in dieser Arbeit erstmalig beschriebenen Transkripte sind durch Fettdruck hervorgehoben.

Spleißvarianten	alternativ/ aberrant gespleißt	Sequenz	fehlende Sequenz	Verschiebung des Leserahmens
<i>MDM2-A</i>	alternativ	5'-CCCTG GATCT-3'	Δ82 – 666	nein
<i>MDM2-B</i>	alternativ	5'-CCCTG GACTA-3'	Δ82 – 900	nein
<i>MDM2-KB2</i>	alternativ	5'-AAGAG GACTA-3'	Δ157 – 900	nein
<i>MDM2-KB3</i>	aberrant	5'-TATCT TGCCC-3'	Δ180 – 1421	ja
<i>MDM2-JN1</i>	aberrant	5'-AGTTA TGGCC-3'	Δ112 – 1375	ja
<i>MDM2-MH</i>	alt./ab.	5'-AAGAG CTGGA-3'	Δ157 – 1038	nein
<i>MDM2-DS2</i>	alt./ab.	5'-AAGAG CAGGA-3' 5'-AGAGC AGCTA-3'	Δ157 – 287 Δ425 - 1398	ja
<i>MDM2-DS3</i>	aberrant	α-Exon zwischen Exon 4 und 5	Δ165 - 1433	ja
<i>MDM2-IS1</i>	aberrant	5'-GATTC CCTGA-3'	Δ59 - 1077	nein
<i>MDM2-PM2</i>	alt./ab.	5'-AAGAG GTGAA-3'	Δ157 – 1230	nein
<i>MDM2-EU2</i>	aberrant	5'-GAGAC CCAAG-3'	Δ79 – 1256	nein
<i>MDM2-FB60</i>	alternativ	5'-AAAGA AATCA-3' 5'-AAGAG GATCT-3'	Δ157 – 340 Δ425 - 666	ja
<i>MDM2-FB29</i>	alternativ	5'-CCCTG AATCA -3' 5'-GACAG GATCT-3'	Δ82 – 340 Δ505 - 666	ja
<i>MDM2-BL</i>	aberrant	5'- CCAAGT GCAGC-3'	Δ179 - 1216	nein
<i>MDM2-N</i>	aberrant	5'- CCAAGT ACTAT -3'	Δ179 - 901	nein

MDM2- PM2, MDM2- EU2 und MDM2- KB3

Bei den drei Varianten *MDM2-KB3* (219 bp), *MDM2-PM2* (393 bp, AJ278977) und *MDM2-EU2* (297 bp, AJ278978) handelt es sich um aberrant gespleißte Transkripte der *MDM2*-mRNA, d.h. das Spleißen erfolgte nicht an Exon/Intron-Grenzen, sondern an Sequenzen, die innerhalb von Exons lokalisiert sind (Abb. 4-4, Tab. 4-1). Die Spleißform KB3 ist in ähnlicher Form bereits in Mammakarzinomen¹¹¹ und in Glioblastomen¹¹⁶ nachgewiesen worden. Die Varianten PM2 und EU2 wurden bislang nur in WTS detektiert¹⁰¹.

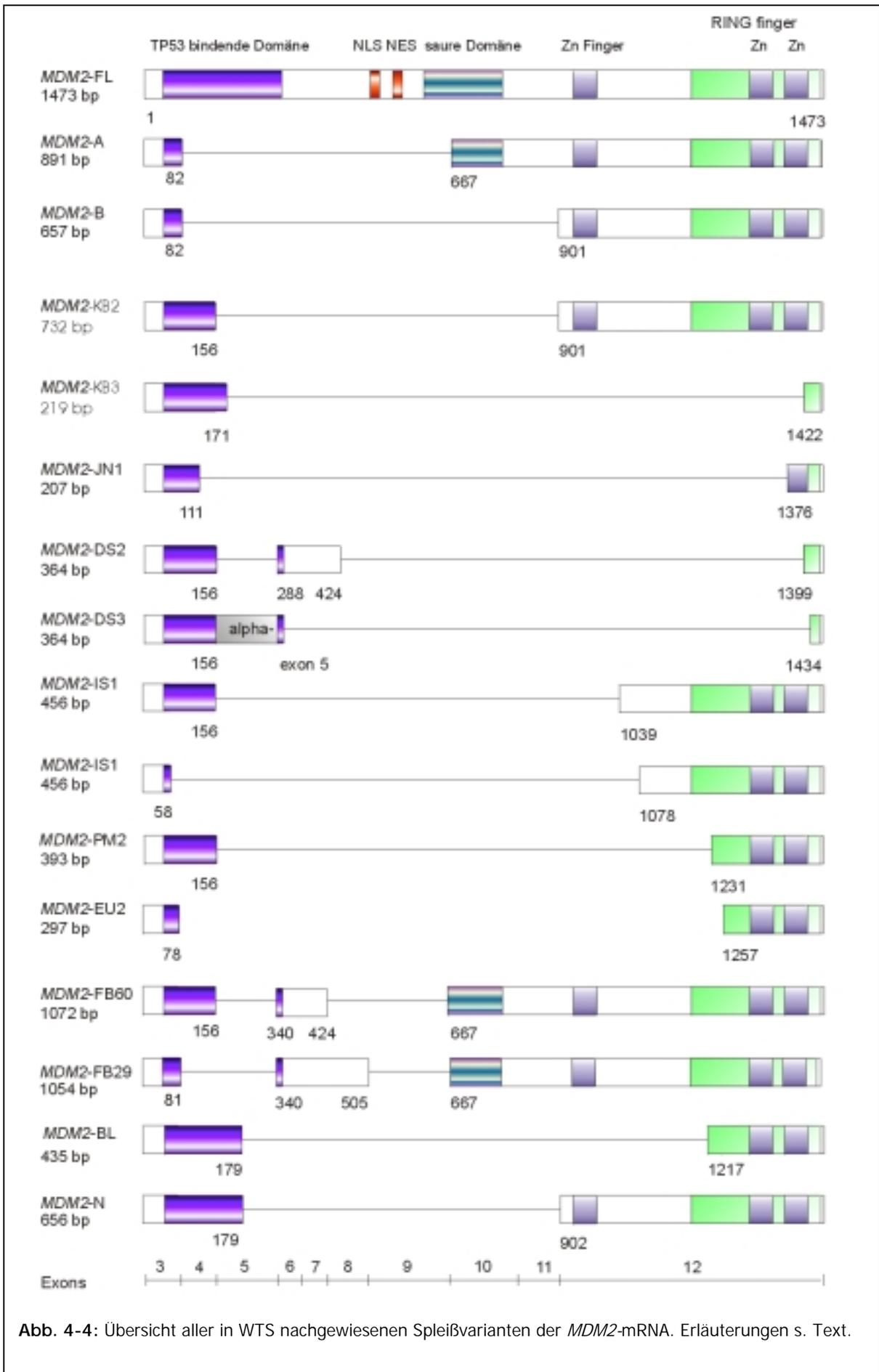


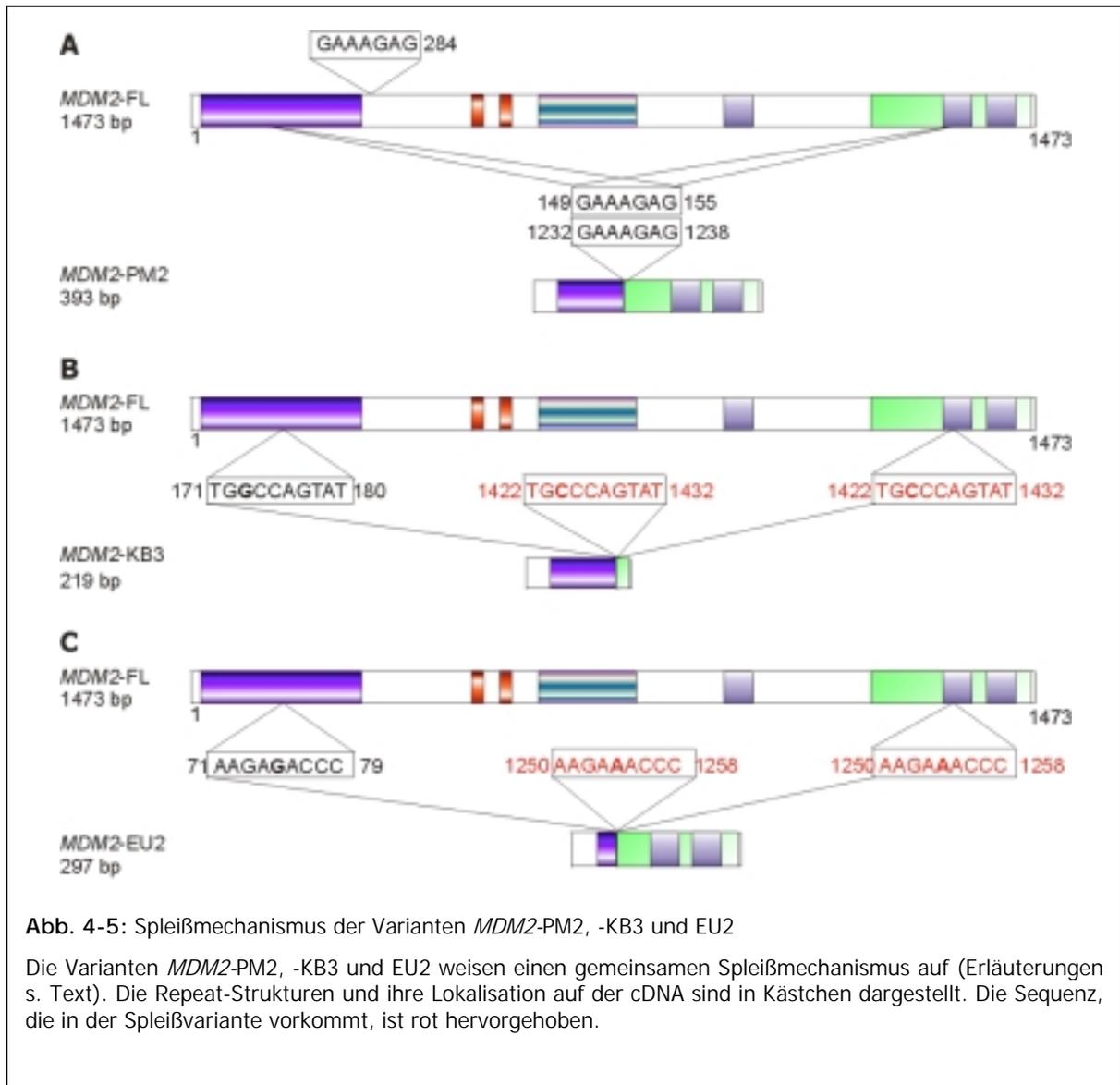
Abb. 4-4: Übersicht aller in WTS nachgewiesenen Spleißvarianten der *MDM2*-mRNA. Erläuterungen s. Text.

Diese drei Varianten weisen einen interessanten gemeinsamen Spleißmechanismus auf (Abb. 4-5). Die Spleiß-Donor- und Akzeptorstellen, die sich innerhalb von Exonen befinden, weisen eine exakte Sequenzhomologie auf. Hierbei handelt es sich um Sequenzen mit einer Länge von 7 – 10 bp, die bis zu 4 mal in der *MDM2*-cDNA vorhanden sind (Abb. 4-5A). Die Variante PM2 (393 bp) setzt sich aus 148 Nukleotiden des 5'-Endes der kodierenden Region der *MDM2*-mRNA (Exon 3 und 4) und 244 Nukleotiden des 3'-Bereiches von Exon 12 zusammen. Der Leserahmen bleibt auch nach dieser Spleißsequenz intakt. Der Spleißform PM2 fehlen neben 50 % der TP53-bindenden Domäne auch die NLS und die NES-Domänen, die saure Region und der Zn-Finger. Die N-terminale RING-Finger-Domäne ist weitestgehend erhalten. Die Donorsequenz innerhalb des Exons 4 endet mit der Basenfolge 149-GAAAGAG-156. Diese Sequenz ist in der *MDM2*-cDNA noch zweimal vorhanden. u.a. im Exon 12, wo sich die Spleiß-Akzeptorstelle befindet (1232-GAAAGAG-1258). In der cDNA der Spleißvariante PM2 lautet die Sequenz: 5'-actatGAAAGAGtttgaa-3' (die Repeatsequenz in Großbuchstaben).

Die Variante EU2 ist ebenfalls das Produkt eines aberranten Spleißvorgangs an Donor- und Akzeptorsequenzen innerhalb von Exonen. Die mRNA besteht aus 71 Nukleotiden des Exons 3 sowie 223 Nukleotiden des 3'-Bereiches von Exon 12. Das Spleißen erfolgte an einer 9-bp-Sequenz 71-AAGAGACCC-79 im Exon 3 und an einer 9-bp-Sequenz 1250-AAGAAACCC-1258 im Exon 12 (Abb. 4-5 C). Dieses Sequenzmotiv kommt in der *MDM2*-mRNA insgesamt zweimal vor. Es ist unklar, an welcher Sequenz das Spleißen genau erfolgte. Sequenzanalysen der cDNA der Variante EU2 zeigen, dass der Bereich zwischen den Nukleotiden 70 und 1249 herausgespleißt wurde, da die Sequenz in der Spleißvariante identisch mit der im Exon 12 ist (5'-AAGAAACCC-3').

Ähnlich verhält es sich mit der Spleißform KB3. Diese mRNA setzt sich aus den Exonen 3 und 4 sowie den ersten 15 Basen des Exons 5 zusammen. Daran schließen sich 51 nt des 3'-Endes des Exons 12 an. Das Spleißen erfolgte hier ebenfalls an einer 10-bp langen Sequenz, die zweimal im kodierenden Bereich der *MDM2*-mRNA vorhanden ist (Abb. 4-5B). Sequenzanalysen der cDNA zeigten, dass in der mRNA der Variante KB3 der Bereich zwischen den Nukleotiden 171 und 1421 des kodierenden Bereiches herausgespleißt worden ist, da die Sequenz in der Spleißform (5'-TGCCAGTAT-3') den Basen 1422 – 1432 der *MDM2*-mRNA entsprechen (in der Abb. 4-5 rot dargestellt). Die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz zeigt, dass der Leserahmen verschoben wurde. Dadurch kommt es zur Bildung eines irregulären Stop-Kodons. Die in Mammakarzinomen nachgewiesene als „219-bp-mdm2“ bezeichnete Form¹¹¹ ist mit der hier beschriebenen Spleißvariante nahezu identisch. Die Sequenz der Spleißregion lautet in diesem Fall jedoch 5'-TGCCAGTAT-3', d.h. dass hier die

Basen 182 – 1432 gespleißt wurden. Die in Glioblastomen gefundene *MDM2*-Spleißvariante LN18¹¹⁶ weist im Gegensatz zu KB3 und „219-bp mdm2“ noch beide 10-bp-Sequenzen auf.



MDM2-JN1, *MDM2*-MH, *MDM2*-IS1, *MDM2*-BL und *MDM2*-N

Bei den Spleißvarianten *MDM2*-JN1, *MDM2*-MH, *MDM2*-IS1 (AJ278976), *MDM2*-BL und *MDM2*-N handelt es sich um aberrant gespleißte mRNA-Formen. Das Spleißen erfolgte an Spleißdonor- und Akzeptorstellen innerhalb von Exonen. Es lassen sich jedoch keine mehrfach auftretenden Sequenzmotive erkennen, wie dies bei den Varianten EU2, KB3 und PM2 der Fall ist.

Allen Varianten fehlen große Teile der TP53-bindenden Domäne, die NLS- und die NES-Sequenz, sowie die saure Domäne (Abb. 4-4). Mit Ausnahme der Variante *MDM2*-N weisen

die Spleißformen auch Verluste von Teilbereichen des Exons 12 auf. Durch das Spleißen der in Abb. 4-4 dargestellten Bereiche kommt es im Fall der Variante *MDM2-JN1* zu einer Verschiebung des offenen Leserahmens. Die Folge ist die Bildung eines vorzeitigen Stoppkodons direkt im Anschluss an die Spleißstelle. In den weiteren Varianten bleibt der Leserahmen der *MDM2*-mRNA auch nach dem Zusammenfügen der Teilsequenzen intakt.

MDM2-DS3

Die Variante *MDM2-DS3* (306 bp) weist mehrere Besonderheiten im Vergleich zu den bisher beschriebenen mRNA-Spleißformen auf (Abb. 4-4). Die DS3-mRNA besteht aus den Exons 3 und 4, 23 Nukleotiden des 5'-Bereiches des Exons 5 sowie 39 nt des 3'-Bereiches des Exons 12. Zwischen den Exons 4 und 5 befindet sich jedoch noch zusätzlich eine Sequenz mit einer Länge von 87 nt, die noch nicht in den Sequenzdatenbanken veröffentlicht worden ist. Vermutlich handelte es sich hier um ein bislang unentdecktes Exon des *MDM2*-Gens. Hinweise darauf ergaben sich aus den Übergangsbereichen zwischen Exon 4 und dieser Sequenz bzw. zu Exon 5 (Exon 4 GAG|GAC – 87 bp – GAG|GTT Exon 5), die den GT-AG-Regeln für das mRNA-Spleißen entsprechen¹¹⁷. Durch Arbeiten von Veldhoen *et al.* über *MDM2* in Hunden konnte die Existenz eines neuen Exons, des so genannten α -Exons, des *MDM2*-Gens unabhängig von unseren Studien bestätigt werden¹¹⁸. Veldhoen und Mitarbeitern gelang es weiterhin, die Expression einer *MDM2 α* -mRNA in humanen Lymphozyten nachzuweisen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch unabhängig davon erstmalig die Expression einer *MDM2*-mRNA-Spleißform, die das α -Exon enthält, in einem Tumor bewiesen werden. Darüber hinaus ist aber nicht bekannt, ob in WTS die von Veldhoen *et al.*¹¹⁸ beschriebene *MDM2 α* -mRNA exprimiert wird. Des Weiteren ist bemerkenswert, dass das Spleißen wie bei der Variante KB3 beschrieben, an der 10-bp Sequenz 171-TGGCCAGTAT-180 erfolgte. Im Gegensatz dazu kommt in der Spleißvariante DS3 die Sequenz 5'-TGGCCAGTAT-3' vor (vgl. *MDM2-KB3*). Dies lässt den Schluss zu, dass wie bei den Spleißformen „219-bp mdm2“¹¹¹ und LN18¹¹⁵ der Bereich zwischen den Nukleotiden 181 und 1432 in Bezug auf die *MDM2*-mRNA herausgespleißt wurde.

MDM2-FB60* und *MDM2-FB29

Die Besonderheit der Spleißformen *MDM2-FB60* und *MDM2-FB29* besteht in der Tatsache, dass durch alternatives Spleißen zwei Sequenzabschnitte der *MDM2*-mRNA deletiert worden sind. Im Vergleich zur FL-*MDM2*-mRNA fehlen der Form *MDM2-FB60* das Exon 4 sowie weiterhin die Exons 6 bis 8. Im Fall der Spleißvariante FB29 wurden die Exon 3 und 4

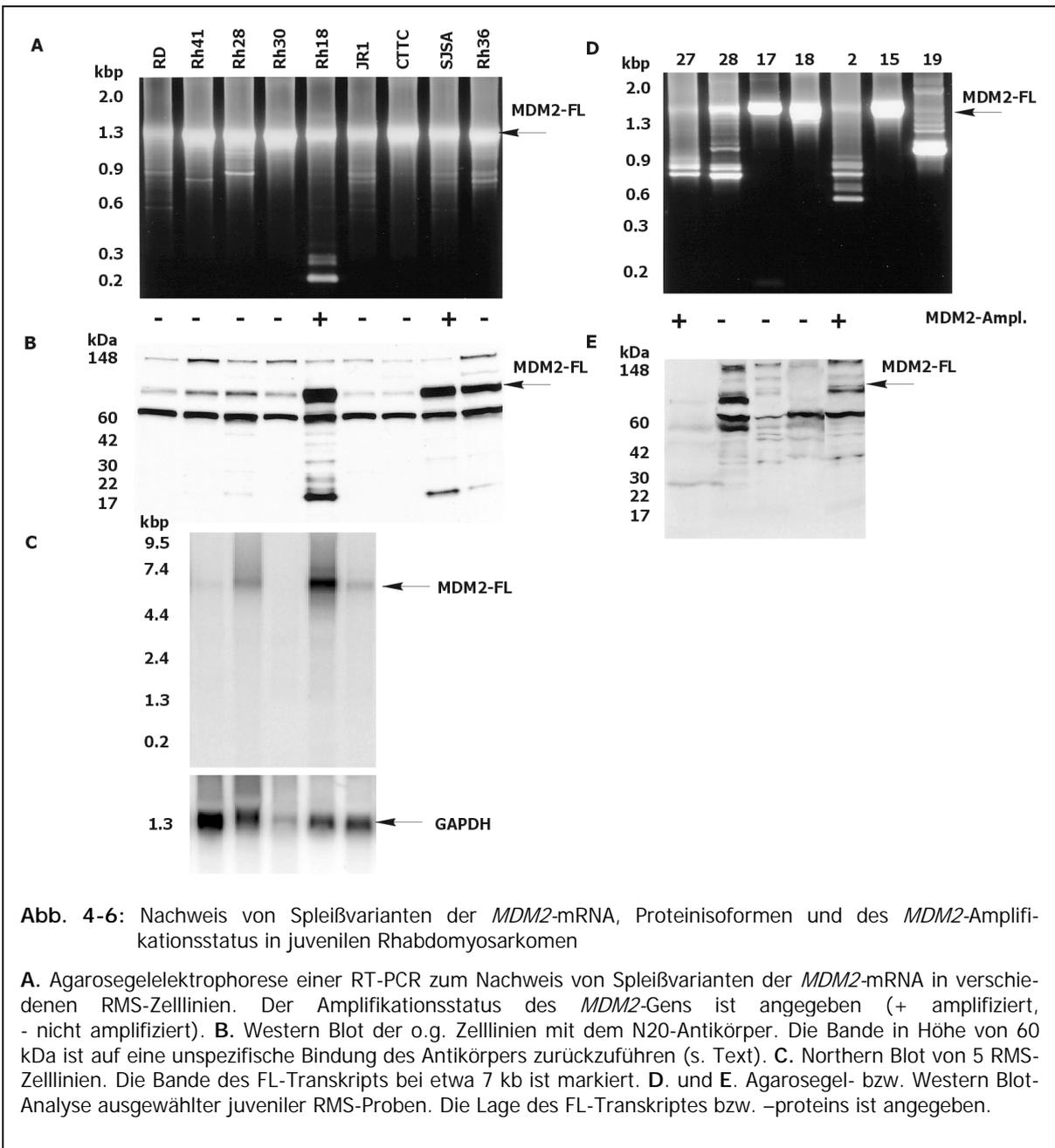
sowie 7 und 8 herausgespleißt. Obwohl in beiden Varianten das Spleißen an regulären Spleißstellen erfolgte, kommt es in der abgeleiteten Proteinsequenz zu Verschiebungen des offenen Leserahmens. Die hypothetischen Proteine sind sehr stark verkürzt, da durch das Zusammenfügen von Exon 4 und 6 (*MDM2*-FB60) sowie 3 und 6 (*MDM2*-FB29) ein frühes Stopp-Kodon entsteht.

4.1.5 Expression von *MDM2*-Spleißvarianten in juvenilen Rhabdomyosarkomen

Die im Kap. 4.1.1 beschriebene „nested“-RT-PCR wurde angewandt, um in kindlichen RMS-Zelllinien und -Tumorproben die Expression von Spleißformen der *MDM2*-mRNA zu untersuchen. Insgesamt standen für die Analyse 8 RMS Zelllinien sowie 11 primäre RMS-Proben zur Verfügung. Nach der Auftrennung im Agarosegel wurden so viele Fragmente wie möglich ausgeschnitten, isoliert und sequenziert.

Die Abb. 4-6 fasst die Daten der RT-PCR und der Western Blot-Analyse der RMS Zelllinien zusammen. In allen Zelllinien konnte die FL-*MDM2*-mRNA detektiert werden. In 6 der 8 Linien traten zusätzlich kürzere PCR-Produkte auf. Durch die Sequenzierung und den Vergleich der Sequenzen mit der FL-*MDM2*-cDNA konnte eine Vielzahl der Banden eindeutig als Spleißvarianten der FL-*MDM2*-mRNA identifiziert werden, 5 der gefundenen Formen sind bereits in anderen Tumorarten beschrieben worden^{42, 101}. Eine Übersicht der Spleißvarianten in RMS Zelllinien ist in Abb. 4-7 dargestellt. Die stärkste Bande eines PCR-Produkts wurde in der Zelllinie Rh18 gefunden (Abb. 4-6). Das 284 bp Fragment stammt von einer neuen Spleißform, die als FB30 bezeichnet wurde, und interessanterweise auch in der Tumorprobe #9 gefunden wurde (Abb.4-6, Tab. 4-2). Es ist bislang unklar, ob die in der RT-PCR nachgewiesenen Spleißformen überhaupt translatiert werden. Diese Frage lässt sich schwer beantworten, da *MDM2* auf Grund der Aminosäuresequenz ein Molekulargewicht von 54 kDa besitzt, im Western Blot jedoch bei 90 kDa eine Bande aufweist. Bei der Zelllinie Rh18 ist es aber denkbar, dass das 20 kDa-Protein der Spleißvariante FB30 entspricht (Abb. 4-6). Da im Western Blot nur sehr wenig zusätzliche Banden erkennbar sind, ist es sehr wahrscheinlich, dass die durch die Spleißvarianten kodierten Proteine nur in sehr geringen Konzentrationen vorliegen.

Die Daten, die von den primären RMS erhalten wurden, unterschieden sich von denen der RMS-Zelllinien. In den Proben der Primärtumoren traten mehrere PCR-Produkte mit einer starken Intensität auf (Abb. 4-6, Tab. 4-2). Des Weiteren wurden im Western Blot zahlreiche zusätzliche Banden detektiert. Dies lässt den Schluss zu, dass in den RMS viele der Spleißvarianten translatiert werden. Wie bereits erwähnt, ist es nicht möglich festzustellen, ob eine

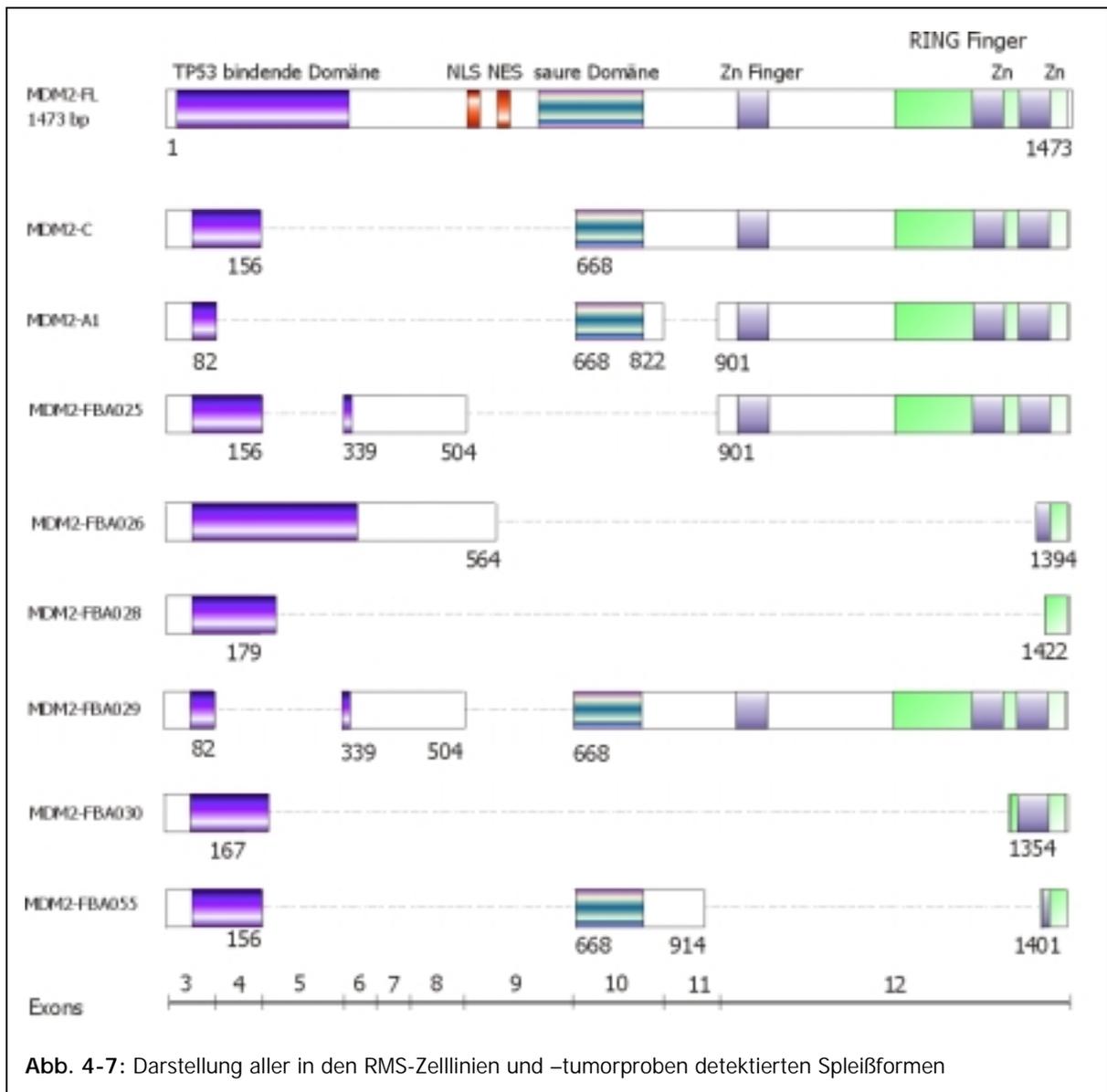


Bande in der RT-PCR mit einer bestimmten Bande im Western Blot übereinstimmt. Die Daten zeigen jedoch eindeutig, dass MDM2-Isoformen in RMS exprimiert werden.

Die Menge an exprimiertem MDM2-Protein korrelierte nicht mit dem Auftreten einer Amplifikation des *MDM2*-Gens. Die Tumorprobe #27 mit einem amplifizierten *MDM2*-Gen exprimiert nur geringe Mengen an MDM2-Protein, während die Tumorprobe #28 eine erhöhte MDM2-Proteinexpression, jedoch keine Amplifikation des *MDM2*-Gens aufwies. Die Menge an MDM2-FL-Protein im RMS-Probe #28 entspricht etwa der in der Probe #2, in der wiederum eine Amplifikation des *MDM2*-Gens detektiert werden konnte (Abb. 4-6). In einer RMS-Tumorprobe (#19) konnte keine *MDM2*-FL-mRNA durch die RT-PCR nachgewiesen werden. Insgesamt wurden in 6 von 8 (75 %) RMS-Zelllinien sowie in 9 von 11 (82 %) juvenilen RMS

Spleißformen der *MDM2*-mRNA detektiert. Dieser Prozentsatz ist höher als für RMS im Erwachsenenalter (25 %, 1 von 4) und WTS allgemein (54 %, 47 von 87). Im Gegensatz dazu betrug die Amplifikationsfrequenz nur 12 % (1 von 8) bei den Zelllinien und 27 % (3 von 11) bei den Tumorproben. 2 der 11 RMS wurden auf Grund der Amplifikation des *MDM2*-Gens ausgewählt. Von den übrigen 9, zufällig ausgewählten Proben, wies eine Probe ein amplifiziertes *MDM2*-Gen auf (#27, Daten nicht gezeigt). Von 3 Tumoren mit *MDM2*-Genamplifikationen exprimierten 2 alternative Spleißformen, von den 8 Tumoren ohne Amplifikation konnten in 6 *MDM2*-Spleißvarianten gefunden werden. In dieser Untersuchung gab es keine Assoziation zwischen dem *TP53*-Genstatus und der Expression von Spleißvarianten, diese wurden sowohl in Tumoren mit als auch ohne *TP53*-Mutationen gefunden (Tab. 4-2).

Die durchgeführten RT-PCR-Analysen erlauben keine Aussagen bezüglich der Mengenverhältnisse der Spleißformen zur FL-mRNA. Es ist denkbar, dass die kürzeren Transkripte



effektiver amplifiziert werden und das *MDM2*-FL-Fragment daher unterrepräsentiert ist. In Northern-Blot-Analysen der Gesamt-RNA aus 5 RMS-Zelllinien konnte lediglich das FL-Transkript der *MDM2*-mRNA nachgewiesen werden (Abb. 4-6).

Tab. 4-2: Expression von *MDM2*-mRNA-Spleißvarianten in juvenilen RMS

Die Tabelle fasst alle Daten bezüglich der Expression von *MDM2*-mRNA-Spleißvarianten in juvenilen RMS zusammen. ALV – alveoläre RMS, EMB – embryonale RMS

Zelllinien	Histologie	wt- <i>TP53</i>	Amplifikation <i>MDM2</i>	Anzahl Spleiß- Varianten	MDM2-Isoformen
Rh18	RMS-ALV	ja	ja	1	FL, FB30
Rh28	RMS-ALV	ja	nein	1	FL,C
Rh30	RMS-ALV	nein	nein	0	FL
Rh36	RMS-EMB	ja	nein	1	FL, A
Rh41	RMS-ALV	nein	nein	1	FL, A
JR1	RMS-EMB	nein	nein	1	FL, A
CTTC	RMS-EMB	nein	nein	0	FL
RD	RMS-EMB	nein	nein	1	FL, B

Tumoren	Histologie	wt- <i>TP53</i>	Amplifikation <i>MDM2</i>	Anzahl Spleiß- Varianten	MDM2-Isoformen
#27	RMS-EMB	ja	ja	2	FL, KB2, B
#26	RMS-EMB	ja	nein	1	FL
#28	RMS-EMB	ja	nein	2	FL, FB25, FB26
#17	RMS-EMB	nein	nein	1	FL, FB28
#18	Mixed	ja	nein	1	FL, FB28
#9	RMS-EMB	ja	nein	2	FL, FB29, FB30
#29	RMS-EMB	nein	nein	2	FL, A1, B
#15	RMS-poordf	ja	nein	0	FL
#19	RMS-EMB	ja	nein	1	A
#6	RMS-EMB	ja	ja	0	FL
#2	RMS-ALV	ja	ja	3	FL, A, B, FB55

In den RMS-Zelllinien und –gewebeproben wurden insgesamt 11 verschiedene Spleißvarianten der *MDM2*-mRNA detektiert. 5 dieser Spleißformen (A, A1, B, C, KB2 [s. Kap.

4.1.4]) sind bereits in anderen Tumorarten nachgewiesen worden^{42, 101}. Die weiteren 6 Spleißformen (*MDM2*-FB25 [Genbank-Eintrag: AF385322], -FB26 [AF385323], -FB28 [AF385324], -FB29 [AF385325], -FB30 [AF385326], -FB55 [AF385327]) wurden von uns erstmals beschrieben. Wie auch bei WTS des Erwachsenenalters waren die drei Varianten A, B und KB2 die am häufigsten exprimierten Formen. 7 der gefundenen Spleißformen waren alternativ gespleißt, d.h. an Exon/Intron-Grenzen. Der Leserahmen wurde dadurch nicht verschoben. Die Spleißvarianten FB25, FB26, F28 und FB29 dagegen sind Produkte eines aberranten Spleißprozesses. Durch die daraus resultierende Verschiebung des Leserahmens der mRNA weisen die abgeleiteten Proteinsequenzen eine veränderte Aminosäuresequenz am C-Terminus auf. Häufig sind die Proteine durch die Bildung eines frühen Stopp-Kodons weiter verkürzt.

Mit der Ausnahme der Spleißform FB26 weisen alle hier gefundenen Varianten teilweise Verluste von Sequenzen der TP53-bindenden Domäne auf. Mit der Spleißvariante FB26 wurde von uns zum ersten Mal eine *MDM2*-Spleißvariante beschrieben, die eine vollständige, intakte TP53-bindende Domäne aufweist. Es ist jedoch noch unklar, ob diese Isoform auch an TP53 binden kann.

4.1.6 Korrelation der Expression von *MDM2*-Spleißvarianten mit klinischen Parametern

Nur 25 % (1 von 4) der untersuchten adulten RMS, 30 % (7 von 23) der Liposarkome und 28 % (2 von 7) der Leiomyosarkome exprimierten Spleißvarianten der *MDM2*-mRNA. Dagegen konnten in 50 % (3 von 6) der Fibrosarkome sowie in 57 % (4 von 7) der neurogenen Sarkome verkürzte Transkripte der *MDM2*-mRNA detektiert werden. In den malignen fibrösen Histiozytomen exprimierten 9 von 14 Tumoren (64 %) *MDM2*-Spleißformen. Dieser Wert ist signifikant höher als für Liposarkome ($p=0,03$, χ^2 -Test).

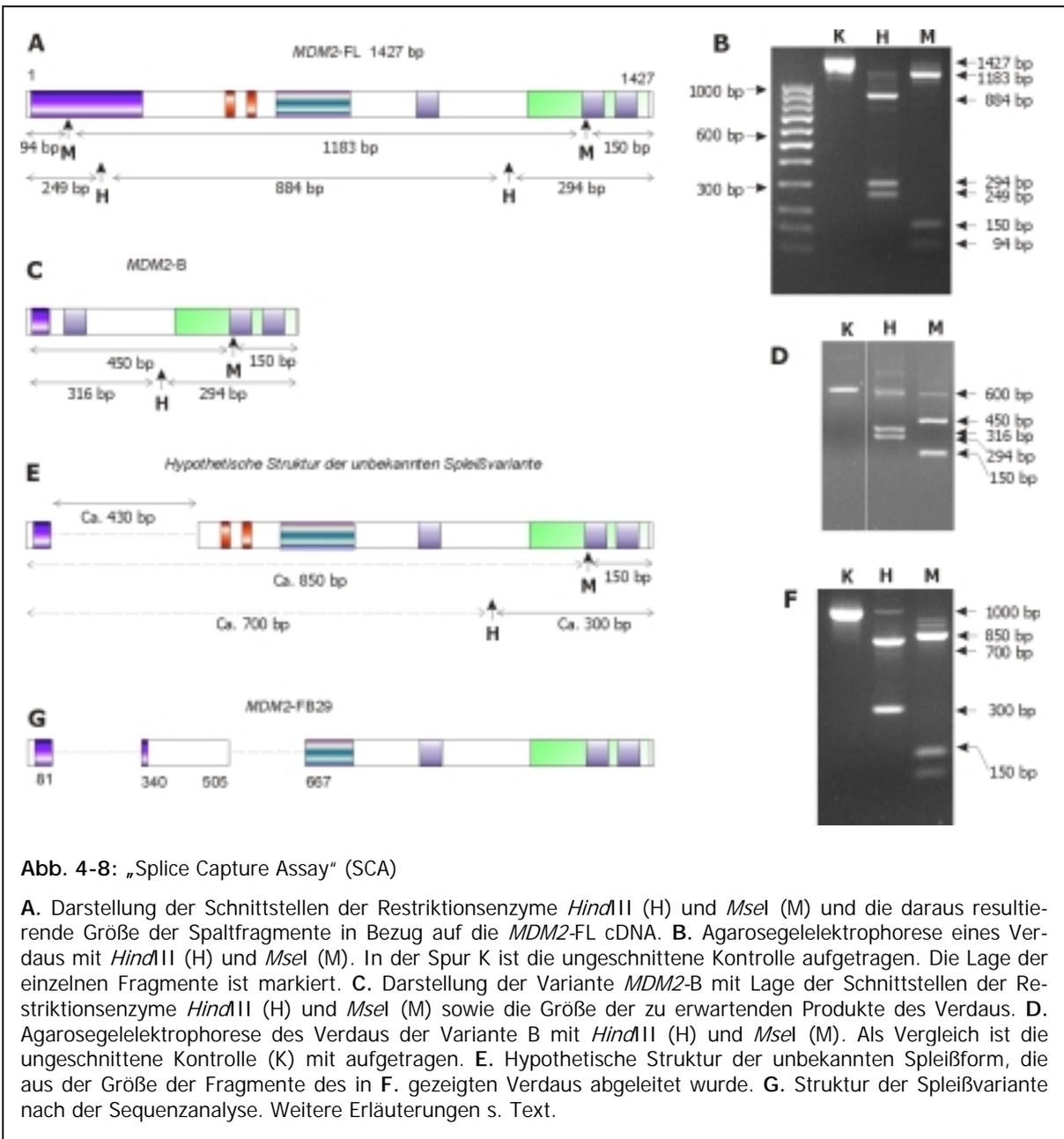
Des Weiteren wurde geprüft, ob das Auftreten von Spleißformen mit dem Tumorstadium korreliert. 30 % (4 von 13) der Tumoren im Stadium 1 waren positiv in Bezug auf die Expression von Spleißvarianten, während etwa 65 % (26 von 40) der Tumoren im Stadium 2 bzw. 3 verkürzte Transkripte der *MDM2*-mRNA exprimierten ($p=0,03$, χ^2 -Test). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Spleißformen häufiger in Tumoren in einem fortgeschrittenem Stadium vorkommen. In einer Kaplan-Meier-Analyse wurden die mittleren Überlebenszeiten für Patienten in Bezug auf das Vorkommen von *MDM2*-Spleißformen berechnet. Dabei stellte sich heraus, dass Patienten, in deren Tumor eine oder mehrere Spleißformen gefunden wurden, eine mittlere Überlebenszeit von 68 Monaten nach Diagnosestellung hatten. Für

Patienten, in deren Tumor nur die FL-Form nachgewiesen wurde, betrug die mittlere Überlebenszeit 57 Monate ($p=0,39$, log-Rank-Test). Beschränkt man die Berechnung nur auf Patienten der Stadien 2 und 3, so zeigt sich, dass der Effekt der Spleißformen auf die Prognose von WTS-Patienten weitaus geringer ist ($p=0,69$). Diese Daten zeigen, dass die Expression von alternativen oder aberrant gespleißten *MDM2*-mRNA-Transkripten zwar häufiger in Tumoren mit fortgeschrittenem Stadium vorkommt, jedoch kein unabhängiger prognostischer Faktor für WTS ist.

4.1.7 „Splice Capture Assay“ (SCA)

Wie bereits im Kapitel 4.1.2 beschrieben, weisen 60 % der untersuchten Tumorproben zusätzlich zur FL-Form der *MDM2*-mRNA verkürzte Banden nach einer RT-PCR mit *MDM2*-spezifischen Primern auf. Bei über 90 % dieser Fälle gelang es, zumindest eine dieser kürzeren Banden nach einer Sequenzanalyse als *MDM2*-Spleißform zu identifizieren. Auf Grund der geringen Größenunterschiede der einzelnen Fragmente (Abb. 4-2), war es nicht möglich, die Banden im Agarosegel bereits bekannten Spleißvarianten zuzuordnen. Des Weiteren verbargen sich hinter einer Bande im Agarosegel oft mehrere Fragmente. Dadurch gestaltete sich die Reamplifikation der Banden und die anschließende Sequenzanalyse schwierig. Die Ergebnisse waren zum großen Teil nicht reproduzierbar. Es bestand daher die Notwendigkeit, eine Methode zu nutzen, die es ermöglicht, schnell und kostengünstig Informationen über die Zusammensetzung der vermutlichen Spleißformen zu erhalten. Nach der Sequenzanalyse von etwa zwei Dritteln der PCR-Produkte und der Identifizierung von bereits bekannten bzw. neuen Spleißvarianten war es möglich, diese Spleißformen mit Hilfe geeigneter Restriktionsenzyme und des entstehenden Spaltmusters einer jeden Variante genau zu charakterisieren. Anschließend konnten nun die Spaltmuster potenzieller neuer mit denen bereits bekannter Spleißvarianten verglichen werden. Der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte so genannte Splice Capture Assay (SCA) bietet die Möglichkeit, durch die Auswahl geeigneter Restriktionsenzyme, die in den Spleißformen enthaltenen Sequenzen exakt vorauszusagen. Das Prinzip des SCA ist in Kap. 3.5 ausführlich dargestellt. Im Folgenden sollen anhand einiger Beispiele die Leistungsfähigkeit des Assays aufgezeigt werden.

Für den SCA wurden Restriktionsenzyme ausgewählt, die innerhalb des durch die Primer MDM2-1 und MDM2-8 amplifizierten Bereiches der *MDM2*-cDNA bis zu zweimal schneiden und/oder ein charakteristisches Spaltmuster ergeben. Diese Kriterien treffen u.a. auf die



Enzyme *Hind*III und *Mse*I zu (Abb. 3-2, 4-8). Die *MDM2*-FL-cDNA wurde mit den genannten Enzymen inkubiert. Nach Auftrennung des Reaktionsansatzes im Agarosegel wurde das erwartete Spaltmuster erhalten (Abb. 4-8). Durch *Hind*III erhält man insgesamt drei Fragmente mit einer Länge von 884, 294 und 249 bp. Das Vorhandensein des 249-bp-Fragments ist ein Indiz für eine vollständig vorhandene TP53-bindende Domäne. Das 294-bp-Fragment tritt nur auf, wenn das Exon 12, wie in diesem Fall, vollständig vorhanden ist. Die Größe des dritten Fragments (884 bp) lässt Rückschlüsse über die Größe des Bereiches zu, der zwischen den beiden Schnittstellen fehlt. Bei der FL-cDNA ist dieses Fragment 884 bp groß. Inkubiert man das PCR-Produkt der *MDM2*-FL-cDNA mit *Mse*I, so sind ebenfalls 3 Fragmente mit einer Länge von 1183, 150 bzw. 94 bp sichtbar. Die Existenz der einzelnen Spaltprodukte lässt

ebenso Rückschlüsse auf das Vorhandensein der Schnittstellen und somit auf die Sequenz der Spleißvariante zu.

Bei der Analyse der Spleißvariante *MDM2-B* mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *MseI* erhält man das auf Grund der Sequenz vorhergesagte Bandenmuster (Abb. 4-8). Durch das Herausspleißen der Exons 4 – 12 fehlt je eine Schnittstelle für *HindIII* bzw. *MseI*. Dadurch ergeben sich für die Spaltung mit den einzelnen Enzyme die nachfolgend aufgeführten Fragmente (s. auch Abb. 4-8):

HindIII - 316 bp, 294 bp

MseI - 460 bp, 150 bp

Im Umkehrschluss lässt sich aus der Kenntnis der Länge der Spaltfragmente und der Lage der Schnittstellen die Sequenz des PCR-Produkts ableiten.

Das Potenzial des SCA zeigte sich bei der Analyse einer bislang unbekanntem Spleißform der *MDM2*-mRNA, deren Sequenz zunächst aus den Daten des SCA abgeleitet und später durch Sequenzierung bestätigt werden konnte. Bei der RT-PCR wurde in einer WTS-Probe neben der Bande der *MDM2*-FL-cDNA noch eine weitere Bande mit einer Länge von etwa 1000 bp detektiert. Diese Bande wurde aus dem Gel isoliert und mit den Primern *MDM2-1* und *MDM2-8* reamplifiziert. Da hier eine distinkte Bande amplifiziert werden konnte, wurde das PCR-Produkt nach erneuter Reinigung aus dem Gel direkt im SCA eingesetzt. Dazu ist das PCR-Produkt wie im Kap. 3.5 beschrieben mit den Enzymen *HindIII* und *MseI* verdaut und die Reaktionsansätze anschließend im Agarosegel aufgetrennt worden (Abb. 4-8). Der Verdau mit *HindIII* ergab zwei Fragmente mit einer Länge von ca. 700 bzw. 300 bp, der Verdau mit *MseI* zwei Fragmente mit einer Länge von 850 und 150 bp Länge. Die kleineren Fragmente der jeweiligen Restriktionsverdau (300 bp bzw. 150 bp) entsprechen den 3'-Fragmenten, die durch die Schnittstellen der Enzyme *HindIII* (294 bp) bzw. *MseI* (150 bp) im Exon 12 entstehen. Im Gegensatz dazu sind durch die Inkubation mit den Restriktionsenzymen nicht die 249-bp (*HindIII*) bzw. 94 bp- (*MseI*) -Fragmente entstanden (s. vorn). Es lassen sich aus den gewonnenen Ergebnissen folgende Schlüsse ziehen:

- Die Schnittstellen sowohl für *HindIII* als auch für *MseI* im Exon 12 sind vorhanden.
- Dagegen fehlen die Schnittstellen für die beiden Enzyme im Exon 4 (*MseI*) und Exon 5 (*HindIII*).
- Die Differenz zwischen dem PCR-Produkt der FL-Form (1427 bp) und der vorliegenden Variante (ca. 1000 bp) beträgt somit etwa 430 bp.

Der unbekanntenen *MDM2*-Spleißform fehlt nach Auswertung der vorliegenden Ergebnisse eine Sequenz von etwa 430 bp Länge, die die Exons 3 und 4 einschließt (Abb. 4-8). Eine anschließende Sequenzanalyse konnte die vorhergesagte Struktur weitestgehend bestätigen. Es handelt sich hierbei um die als *MDM2*-FBA029 bezeichnete alternative Spleißform der *MDM2*-mRNA. Dieser Spleißvariante fehlen die Exons 3 und 4, sowie 7 und 8 (Kap. 4.1.4).

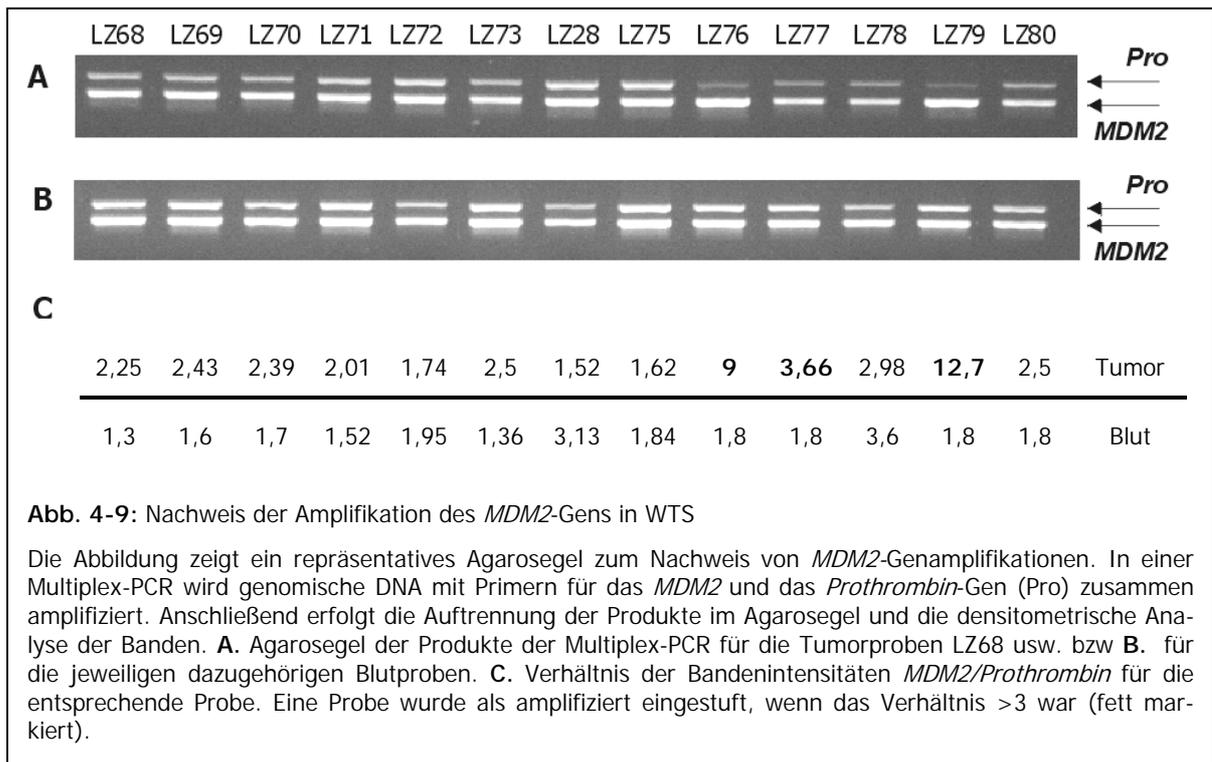
4.1.8 Nachweis der Amplifikation des *MDM2*-Gens

Von insgesamt 75 Tumorproben konnte der *MDM2*-Genstatus mittels einer semiquantitativen Multiplex-PCR¹¹⁶ untersucht werden, von 63 Patienten stand auch Referenz-DNA von Lymphozyten aus dem peripheren Blut zur Verfügung. Die Methode beruht auf der gleichzeitigen Amplifikation des *MDM2*-Gens und eines so genannten „single copy“-Gens in einer PCR-Reaktion. In diesem Fall wurde das *Prothrombin*-Gen ausgewählt, von dem bekannt ist, dass nur zwei Allele im Genom vorhanden sind (Dr. Th. Köhler, persönl. Mitteilung). In Vorversuchen wurden die optimalen Reaktionsbedingungen ermittelt, insbesondere die Zyklenzahl. Für die Multiplex-PCR des *MDM2*- und *Prothrombin*-Gens wurde eine optimale Zyklenzahl von 30 ermittelt (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt konnte in 28 % (21 von 75) der untersuchten WTS-Proben eine Amplifikation des *MDM2*-Gens detektiert werden¹⁰¹. Eine Probe wurde als amplifiziert eingestuft, wenn die Intensität der *MDM2*-Bande im Agarosegel mindestens 3 mal stärker war als die der *Prothrombin*-Bande. Einzelne Proben wiesen ein bis zu 12-fach amplifiziertes *MDM2*-Gen auf (Abb. 4-9). Eine detailliertere Analyse ergab, dass 53 % der Tumoren im Stadium 1 (10 von 19), 24 % der Tumoren im Stadium 2 (5 von 21) sowie 15 % der Tumoren im Stadium 3 (3 von 20) ein amplifiziertes *MDM2*-Gen besitzen. Währenddessen konnte in keinem der Tumoren im Stadium 4 eine Amplifikation des *MDM2*-Gens nachgewiesen werden. Das häufigere Vorkommen von *MDM2*-Genamplifikationen in Stadium 1-Tumoren gegenüber Tumoren im Stadium 4 erwies sich als statistisch signifikant ($p=0,022$; χ^2 -Test). Die Analyse der Amplifikation des *MDM2*-Gens in den WTS-Proben ergab weiterhin, dass das Auftreten der Amplifikation mit dem Tumorgrad korreliert: während in 9 von 16 Fällen (57 %) der Grad 1-Tumoren ein amplifiziertes *MDM2*-Gen aufwiesen, so war dies nur in 9 von 50 (18 %) der Grad 2 und 3-Tumoren der Fall ($p=0,003$, χ^2 -Test).

Betrachtet man die einzelnen WTS-Entitäten, so zeigt sich, dass die Amplifikationsfrequenz in Fibrosarkomen mit 50 % (3 von 6) deutlich höher als in den anderen untersuchten Tumorarten ist. Zum Beispiel weisen nur etwa 11 % der MFH (2 von 17, $p=0,05$, χ^2 -Test), 20 % der neurogenen Sarkome sowie 35 % der Liposarkome (7 von 20, $p=0,07$, χ^2 -Test)

ein amplifiziertes *MDM2*-Gen auf. Im Gegensatz dazu konnte in keinem der untersuchten Rhabdomyosarkome eine Amplifikation des *MDM2*-Gens nachgewiesen werden. Dies stimmt mit Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Taylor *et al.*⁹⁴ überein, die eine Amplifikationsfrequenz von 20 % für juvenile RMS beschreiben. Auf Grund der geringen Fallzahlen für die weiteren WTS-Entitäten war eine Berechnung nicht sinnvoll.



Es war weiterhin von Interesse, zu prüfen, ob die Amplifikation des *MDM2*-Gens eine erhöhte *MDM2*-mRNA-Expression zur Folge hat. In einer umfangreichen Studie unserer Arbeitsgruppe wurde in 85 WTS-Proben die Menge der *MDM2*-mRNA mit Hilfe einer sensitiven Real-Time-PCR-Methode ermittelt³³. Dabei stellte sich heraus, dass die Menge der *MDM2*-mRNA ein unabhängiger prognostischer Faktor für WTS ist. Überraschenderweise war jedoch die erhöhte Expression (>100 zmol *MDM2*-mRNA/amol *GAPDH* mRNA) mit einer besseren Überlebensprognose im Vergleich zu einer geringen Expression (<50 zmol *MDM2*-mRNA/amol *GAPDH* mRNA) verbunden. Wir fanden, dass die Amplifikation des *MDM2*-Gens signifikant mit einer erhöhten Expressionsrate der mRNA des *MDM2*-Gens korreliert ($p=0,007$, χ^2 -Test). In allen Tumoren mit einer Amplifikation wurde gleichzeitig eine erhöhte mRNA-Expression detektiert, wohingegen keine Probe mit einer geringen Menge an *MDM2*-mRNA ein amplifiziertes *MDM2*-Gen aufwies.

Von ausgewählten Tumorentitäten konnten Daten der komparativen genomischen Hybridisierung (CGH) unserer Arbeitsgruppe mit in die Auswertung einbezogen werden (Dr. H. Schmidt, persönl. Mitteilung). Durch die CGH können relative Zugewinne und Verluste an gesamtgenomischer DNA, bezogen auf ganz bestimmte Abschnitte chromosomaler Regionen, durch den Vergleich unterschiedlich markierter DNA aus Tumor- und Normalgewebe dargestellt werden. Beim Vergleich der Daten, die durch die semiquantitative Multiplex-PCR und durch die CGH gewonnen wurden, zeigte sich eine weitestgehende Übereinstimmung. Insgesamt wurden 4 WTS-Proben mit einer nachgewiesenen Amplifikation ebenfalls in der CGH analysiert. Die Fälle 24/92 (ein Fibrosarkom) sowie 12/95 (Leiomyosarkom) sind auf Grund der Ergebnisse der Multiplex-PCR als stark amplifiziert eingestuft worden. Dieser Befund konnte durch die CGH bestätigt werden (Abb. 4-10).

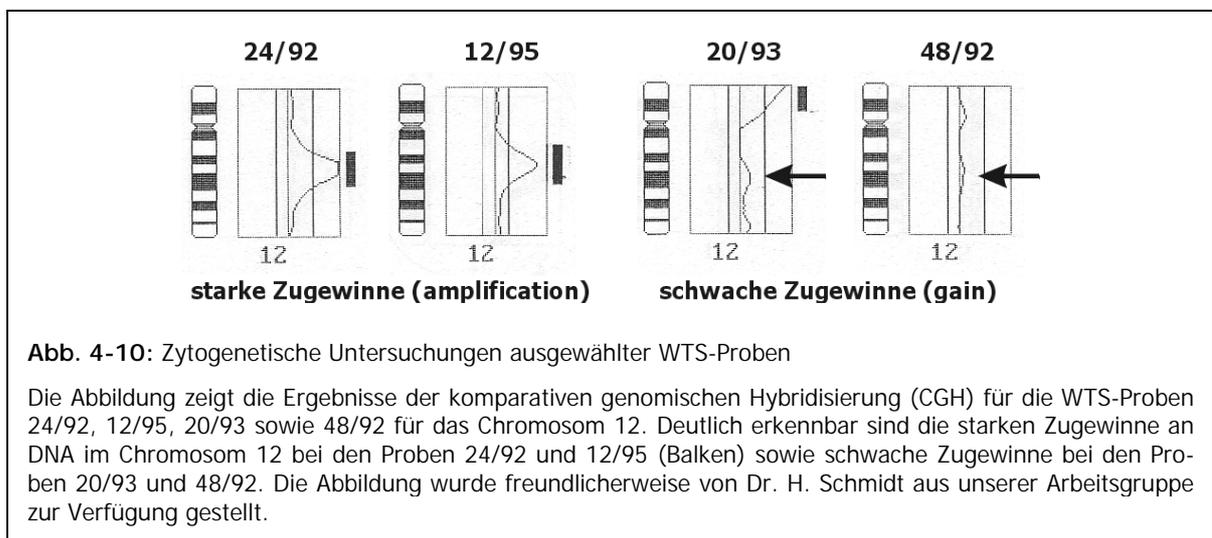


Abb. 4-10: Zytogenetische Untersuchungen ausgewählter WTS-Proben

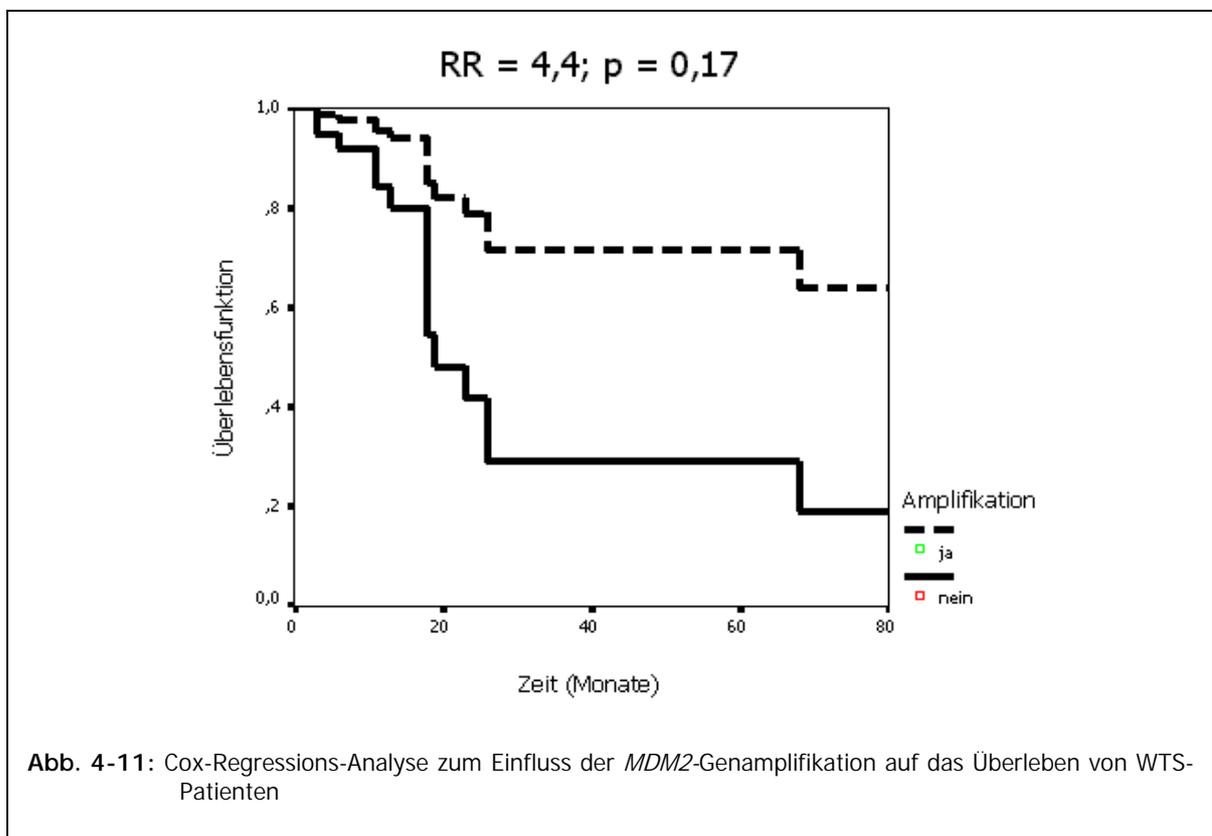
Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der komparativen genomischen Hybridisierung (CGH) für die WTS-Proben 24/92, 12/95, 20/93 sowie 48/92 für das Chromosom 12. Deutlich erkennbar sind die starken Zugewinne an DNA im Chromosom 12 bei den Proben 24/92 und 12/95 (Balken) sowie schwache Zugewinne bei den Proben 20/93 und 48/92. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Dr. H. Schmidt aus unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt.

Beide Proben wiesen starke Zugewinne in der Region des Chromosoms 12 auf, in der das *MDM2*-Gen lokalisiert ist. In zwei weiteren WTS-Proben, 48/92 (ein Fibrosarkom) sowie 20/93 (ein Leiomyosarkom), konnte mittels der Multiplex-PCR eine schwache Amplifikation des *MDM2*-Gens detektiert werden. Das Verhältnis der Bandenintensitäten *MDM2*/Prothrombin betrug 3,6 für die Probe 48/92 sowie 2,7 für die Probe 20/93. In der CGH-Analyse konnte für die genannten WTS-Tumoren jeweils ein leichter Zugewinn in der genomischen DNA in der Region des *MDM2*-Gens nachgewiesen werden (Abb. 4-10).

4.1.8.1 Korrelation der *MDM2*-Genamplifikation mit dem Überleben

Mit Hilfe der Kaplan-Meier-Analyse wurde der Einfluss der Amplifikation des *MDM2*-Gens auf das Überleben von WTS-Patienten ermittelt (Tab. 4-4). Die berechneten Überlebenszeiten für Patienten mit bzw. ohne amplifiziertes *MDM2*-Gen waren signifikant voneinander verschieden. Bemerkenswert war, dass die durchschnittliche Überlebenszeit für Patienten, in deren Tumor keine Amplifikation des *MDM2*-Gens nachweisbar war, 38 Monate betrug, während Patienten mit nachgewiesener *MDM2*-Genamplifikation im Durchschnitt 96 Monate überlebten ($p=0.07$, log-Rank-Test).

In der Cox-Regressionsanalyse zeigte sich, dass Patienten ohne *MDM2*-Amplifikation eine schlechtere Prognose im Vergleich zu WTS-Patienten haben, deren Tumor ein amplifiziertes *MDM2*-Gen trägt ($p=0.04$, relatives Risiko [RR] 4,5). Adjustiert man die Cox-Regression nach dem Tumorgrad ergibt sich für Patienten ohne Amplifikation ein vergleichbar hohes Risiko am Tumor zu versterben ($p=.17$, $RR=4,4$; Abb. 4-11). Die Adjustierung nach weiteren Faktoren, z.B. Tumorart u.a., war auf Grund der Heterogenität der WTS und der geringen Fallzahlen der anderen Entitäten nicht sinnvoll. Die Ergebnisse zeigen, dass der Nachweis einer Amplifikation des *MDM2*-Gens ein unabhängiger Prognosefaktor für WTS ist, und dass das Auftreten einer Amplifikation mit einer besseren Prognose für WTS-Patienten korreliert.



4.1.9 Mikrosatellitenanalyse für die *MDM2*-Marker D12S80b und D12S83a

Im Rahmen einer Analyse auf Mikrosatelliteninstabilitäten wurden WTS auch auf genetische Instabilitäten des *MDM2*-Genlocus hin untersucht. Die genomische DNA aus dem Tumor ist ebenso wie Referenz-DNA (aus peripheren Blutlymphozyten des Patienten) in PCR-Reaktionen amplifiziert und anschließend in denaturierenden Polyacrylamidgelen analysiert worden. Die für die beiden *MDM2*-Marker D12S80b (distal von kodierender Sequenz von *MDM2*) und D12S83a (proximal der kodierenden Sequenz von *MDM2*) benutzten Primer lieferten Produkte mit einer Länge von 200 bp (D12S80b) sowie 80 – 100 bp (D12S83a).

Insgesamt wurden 66 WTS und die dazugehörigen Referenzproben untersucht. Die Alterationen umfassten sowohl Mikrosatelliteninstabilitäten (MSI), sowie Verluste von Mikrosatellitenallelen („loss of heterozygosity“, LOH). Zu MSI zählen neben „shifts“ im Amplifikationsmuster auch Verstärkungen einzelner Banden im Vergleich zur Referenz-DNA des Patienten.

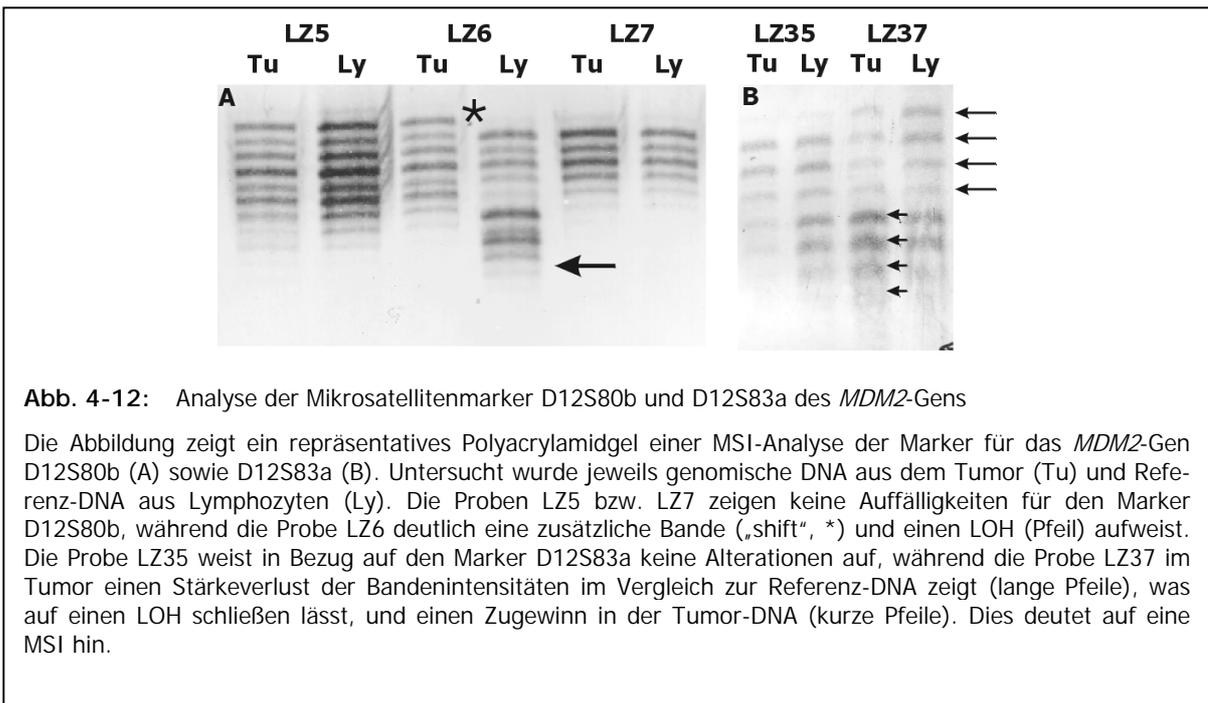


Abb. 4-12: Analyse der Mikrosatellitenmarker D12S80b und D12S83a des *MDM2*-Gens

Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Polyacrylamidgel einer MSI-Analyse der Marker für das *MDM2*-Gen D12S80b (A) sowie D12S83a (B). Untersucht wurde jeweils genomische DNA aus dem Tumor (Tu) und Referenz-DNA aus Lymphozyten (Ly). Die Proben LZ5 bzw. LZ7 zeigen keine Auffälligkeiten für den Marker D12S80b, während die Probe LZ6 deutlich eine zusätzliche Bande („shift“, *) und einen LOH (Pfeil) aufweist. Die Probe LZ35 weist in Bezug auf den Marker D12S83a keine Alterationen auf, während die Probe LZ37 im Tumor einen Stärkeverlust der Bandenintensitäten im Vergleich zur Referenz-DNA zeigt (lange Pfeile), was auf einen LOH schließen lässt, und einen Zugewinn in der Tumor-DNA (kurze Pfeile). Dies deutet auf eine MSI hin.

Von den 66 untersuchten Patientenproben wies nur ein geringer Anteil einen Verlust der Heterozygotie im *MDM2*-Marker D12S83a auf, d.h. in 8 % (5/66) der Tumoren konnte ein LOH nachgewiesen werden (Abb. 4-12). In einer dieser Proben wurde zusätzlich auch eine Instabilität des Mikrosatellitenlocus festgestellt. Dem gegenüber wiesen 18 % (12/66) WTS Veränderungen im *MDM2*-Marker D12S80b auf. Dabei wurde in jeweils 6 Tumoren ein LOH bzw. eine MSI detektiert.

Daten aus unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass etwa 52 % aller untersuchten WTS mindestens in einem Mikrosatellitenlocus (z.B. TP53alu, BAT25, BAT26 u.a.) eine Alteration aufweisen¹⁰⁴. In 24 % aller Fälle konnten sogar zwei genomische Veränderungen (MSI bzw. LOH) detektiert werden.

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

4.1.10 Nachweis der *p14ARF*-mRNA-Expression

Die Expression der mRNA des Tumorsuppressorgens p14ARF wurde in insgesamt 57 WTS-Proben untersucht. Dabei konnte in 86 % der Fälle (49 von 57) ein Produkt nach der RT-PCR im Agarosegel nachgewiesen werden (Abb. 4-13). In mehreren Tumorproben war nur eine sehr schwache Bande sichtbar. Dies könnte auf eine Verminderung der p14ARF-Expression hindeuten. Die RT-PCR erlaubt jedoch keine genauen quantitativen Aussagen. In 8 der 57 untersuchten WTS (14 %) konnte kein Transkript der *p14ARF*-mRNA detektiert werden (Abb. 4-13). Die Amplifikation mit Primern für GAPDH lieferte hingegen für alle Proben ein PCR-Produkt, was für die Intaktheit der Gesamt-RNA spricht (Daten nicht gezeigt).

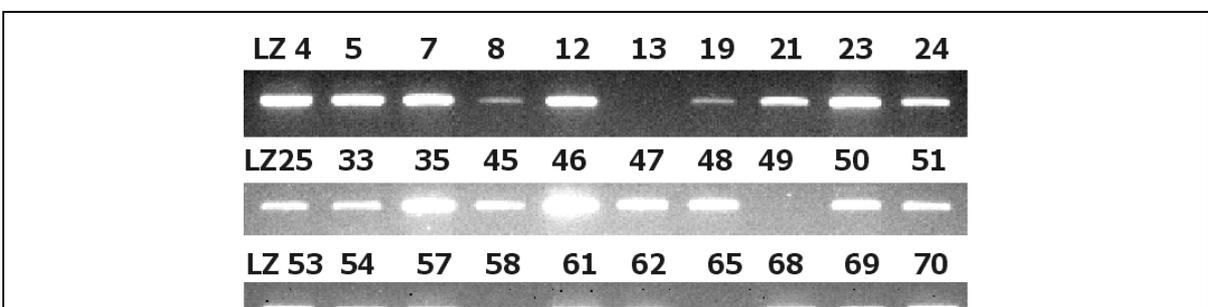


Abb. 4-13: Analyse der *p14ARF*-mRNA-Expression in WTS

Die Abbildung zeigt die repräsentative gelelektrophoretische Analyse der RT-PCR von WTS-Proben mit den Primern ARF-3 und ARF-4. Deutlich erkennbar ist die fehlende Expression der *ARF*-mRNA in den Proben LZ13 und LZ 49 sowie eine stark verminderte Expression in den Proben LZ8, LZ19, LZ58 und LZ65.

4.1.10.1 Korrelation der *p14ARF*-mRNA-Expression mit klinischen Parametern

Bei der Korrelation der Expression der *p14ARF*-mRNA mit den einzelnen WTS-Entitäten zeigte sich, dass von den 4 untersuchten RMS nur 1 Probe (25 %) positiv für die *p14ARF*-mRNA war. Auf Grund der geringen Fallzahlen für die anderen Tumorarten lassen sich keine weiteren Aussagen treffen.

Vergleicht man die Expression in den einzelnen Tumorstadien, ergibt sich folgendes Bild: während alle Tumoren (100 %) im Stadium 1 die *p14ARF*-mRNA exprimieren, so sind dies im Stadium 4 nur 40 % (2 von 5, $p=0,007$, χ^2 -Test). Bemerkenswert ist außerdem die wesentlich kürzere mittlere Überlebenszeit für Patienten, deren Tumor keine *p14ARF*-mRNA exprimiert. Diese beträgt $11,5 \pm 3,1$ Monate, im Vergleich zu $96 \pm 7,6$ Monaten für Patienten, in deren Tumor die *p14ARF*-mRNA nachgewiesen worden ist ($p=0,0001$, log-Rank-Test, Tab. 4-5). Das relative Risiko für Patienten ohne *p14ARF*-mRNA-Expression am Tumor zu versterben wurde in der Cox-Regressionsanalyse mit 2,99 ermittelt ($p=0,05$).

Die Ergebnisse zeigen, dass der Verlust der *p14ARF*-mRNA-Expression mit einer verkürzten Überlebenszeit für die betroffenen Patienten verbunden ist. Des Weiteren ergibt sich aus den vorliegenden Daten, dass die Expression der *p14ARF*-mRNA eine prognostische Bedeutung für WTS-Patienten besitzt.

4.2 *TP53*-Mutationsanalyse in WTS

Mittels einer nichtradioaktiven Sequenzanalyse wurden die Exone 4 bis 10 des *TP53*-Gens auf Mutationen hin untersucht. Die Sequenzierung erfolgte zunächst nur mit dem Sense-Primer, bei Hinweisen auf Mutationen erfolgte eine zweite Analyse mit dem Antisense-Primer zur Bestätigung des Befundes. Für die Mutationsstudien stand von 40 Patienten (40 Proben) Gefriermaterial zur Verfügung.

Von den insgesamt 40 untersuchten Tumoren konnte in 12 Fällen (30 %) eine Mutation im *TP53*-Gen detektiert werden. Von diesen 12 als positiv eingestuft Proben entfallen 6 auf Mutationen, die sich in Exonen befinden. Daraus ergibt sich eine Frequenz für Mutationen im kodierenden Bereich des *TP53*-Gens von 15 %. Bei allen Mutationen handelt es sich um Basenaustausche, woraus sich ebenfalls der Austausch der jeweiligen durch dieses Kodon kodierte Aminosäure ergibt (Tab. 4-3). Die verbleibenden 6 Fälle weisen Mutationen auf, die in intronischen Bereichen des *TP53*-Gens lokalisiert sind. Betrachtet man die einzelnen Tumorarten so zeigt sich, dass MFH häufiger von *TP53*-Mutationen betroffen sind; die Mutationsfrequenz betrug 50 % (5/10), während in Liposarkomen nur in 16 % der Fälle (2/12)

ein mutiertes *TP53*-Gen detektiert wurde. Von anderen WTS-Entitäten sind jeweils nur sehr geringe Fallzahlen in die Untersuchung einbezogen worden (jeweils etwa 2 - 4 Fälle), so dass eine statistische Auswertung nicht möglich ist.

Tab. 4-3: Zusammenfassung der Mutationsstudien des *TP53*-Gens in WTS

Es sind die 12 Patienten aufgeführt, in deren WTS eine Mutation des *TP53*-Gens detektiert wurde, insgesamt wurden 40 Patientenproben untersucht. MFH – Malignes fibröses Histiocytom, IVS4-91 A/G – Mutation der 91. Base im Intron 4, Austausch A zu G.

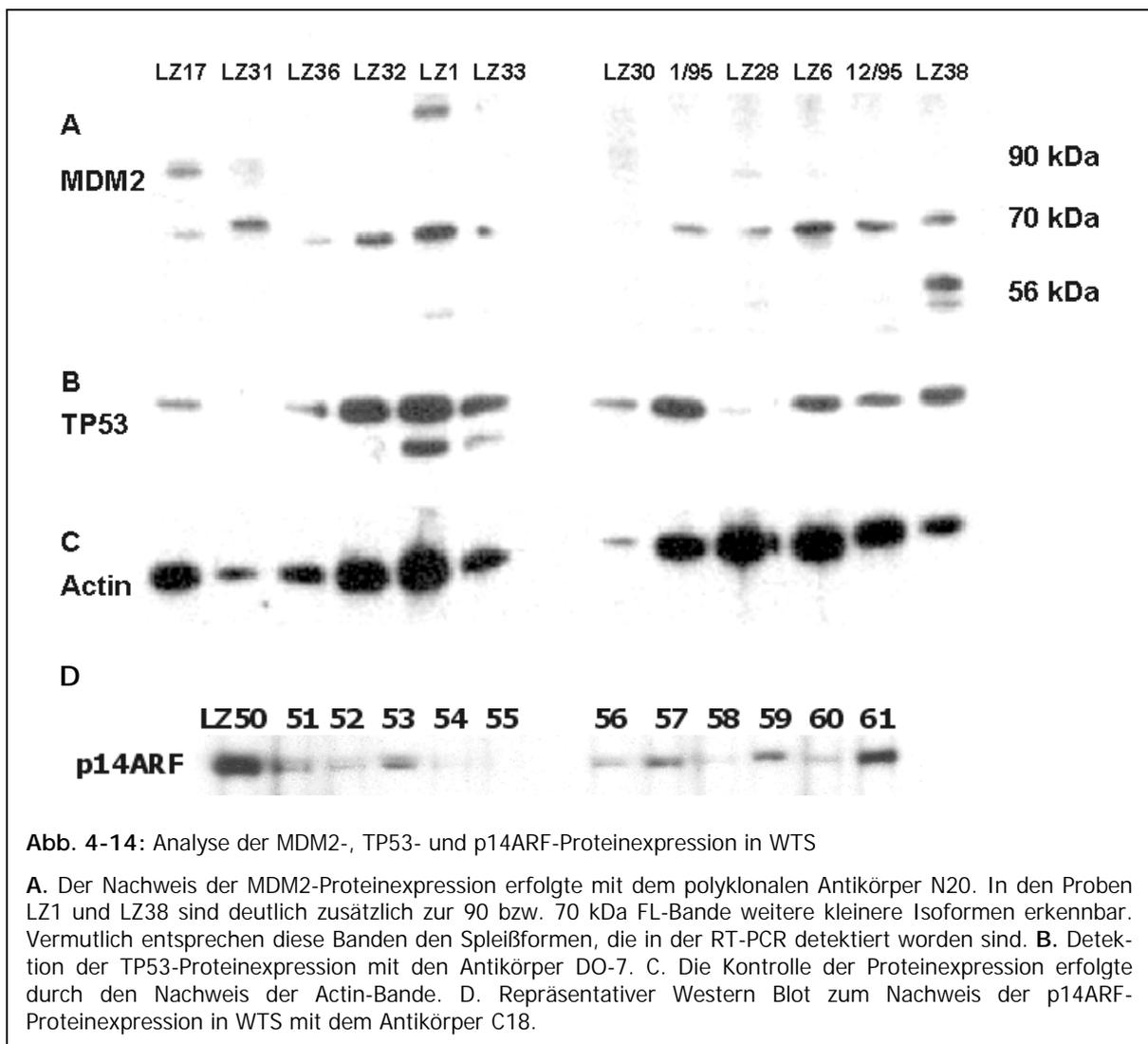
Schlüssel	Tumorart	Mutationsart	Polymorphismus
LZ26	Liposarkom	IVS4-91 A/G	Kodon 72 Arg - Arg
LZ48	Liposarkom	IVS4-91 A/G	Kodon 72 Arg - Pro
LZ56	Liposarkom	G 179 E +/- (GAA zu GGG)	Kodon 72 Arg - Pro
LZ1	MFH	Y 220 C +/- (TAT zu TGT)	Kodon 72 Arg - Arg
LZ23	MFH	D 281 H +/- (GAC zu CAC)	Kodon 72 Arg - Arg
LZ27	MFH	IVS7-72 A/C, IVS7-92 T/C	Kodon 72 Arg - Pro
LZ33	MFH	M 237 I +/- (ATG zu ATA)	Kodon 72 Arg - Pro
LZ57	MFH	IVS4-91 A/G	Kodon 72 Arg - Pro
LZ13	RMS	R 280 K +/- (AGA zu AAA)	Kodon 72 Arg - Arg
LZ35	Leiomyosarkom	IVS6-36 GC +/- E 271 L +/- (GAG zu AAG)	Kodon 72 Arg - Arg
LZ51	sonstige	IVS7-72 C/T, IVS7-92 T/G	Kodon 72 Arg - Pro
LZ55	sonstige	IVS7-72 C/T, IVS7-92 T/G	Kodon 72 Arg - Pro

Weiterhin konnte für 16 der insgesamt 40 sequenzierten Proben (40 %) die Variante Arg/Pro im Kodon 72 detektiert werden, in drei anderen Fällen wurde ein Polymorphismus in Kodon 213 gefunden. Im Falle des Kodon 72-Polymorphismus kodiert dieses Triplett nicht homozygot die Aminosäure Arginin, sondern heterozygot Arginin/Prolin. Der Polymorphismus im Kodon 213 indes hat keine Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz. Unter den 12 Tumorproben, die ein mutiertes *TP53*-Gen tragen, waren 7 Tumoren, die gleichzeitig auch die Form Arg-Pro für den Kodon 72-Polymorphismus aufwiesen. Alle Tumoren, die den Polymorphismus im Kodon 213 trugen, wiesen keine Mutationen des *TP53*-Gens auf.

4.3 Nachweis der MDM2-, TP53 und p14ARF-Proteinexpression

Die MDM2, TP53- und p14ARF-Proteinexpression wurde in insgesamt 63 Tumorproben mittels Färbung mit spezifischen Antikörpern im Western Blot nachgewiesen (Abb. 4-14). Anschließend erfolgte eine semiquantitative Analyse der Proteinexpression. Auf Grund des Verhältnisses zur Actin-Bande ist die Expression der Proteine als nicht, schwach, leicht bzw. stark eingeschätzt worden.

Für 18 von 63 Proben (28 %) konnte keine Expression des MDM2-Onkoproteins nachgewiesen werden. Weitere 18 Tumorproben (28 %) zeigten eine schwache, 19 (30 %) eine leicht erhöhte MDM2-Proteinexpression. Eine MDM2-Überexpression konnte in 8 Fällen (12 %) detektiert werden. In den meisten Fällen war neben der 90 kDa-Bande auch die 70 kDa-Bande nachzuweisen. Diese Form entsteht durch die Nutzung eines alternativen Promotors im Intron 1 des *MDM2*-Gens⁴⁵. Obwohl einige der untersuchten Proben, die alternativ oder aberrant gespleißte Transkripte der *MDM2*-mRNA exprimierten, zusätzliche Banden im



Western Blot aufwiesen (LZ1, LZ28 sowie LZ38 in Abb. 4-2), ist es nicht möglich, eine bestimmte Bande im Western Blot einer spezifischen Spleißform zuzuordnen. Die anderen in Abb. 4-2 dargestellten Proben exprimierten ebenfalls *MDM2*-mRNA-Spleißvarianten, die mit hoher Wahrscheinlichkeit nur in sehr geringem Maße translatiert werden, da diese Isoformen im Western Blot nicht detektiert werden konnten.

In dieser Untersuchung konnte kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Spleißformen und der MDM2-Proteinexpression gefunden werden ($p=0,906$, Student t-Test). Die Anteil der Tumorproben, die Spleißformen exprimierten, ist in den Gruppen mit unterschiedlichen MDM2-Proteinmengen weitestgehend gleich. Eine erhöhte *MDM2*-mRNA-Menge war nicht mit einer erhöhten MDM2-Proteinexpression verbunden. Bemerkenswert war, dass die Amplifikation des *MDM2*-Gens signifikant mit einer erhöhten mRNA-Menge (s. Kap. 4.1.7), jedoch nicht notwendigerweise mit einer erhöhten Proteinmenge korreliert. 46 % der Tumorproben mit einer stark erhöhten *MDM2*-mRNA-Expression wiesen auch ein amplifiziertes *MDM2*-Gen auf, exprimierten jedoch keine detektierbaren MDM2-Proteinmengen ($p<0.05$, χ^2 -Test). In früheren Studien unserer Arbeitsgruppe an einem anderen Patientenkollektiv erwies sich die MDM2-Überexpression in immunhistochemischen Untersuchungen als negativer, prognostischer Faktor für WTS³⁰. Im Gegensatz dazu gab es zwischen der MDM2-Proteinmenge im Western Blot und der Prognose für WTS-Patienten keinen Zusammenhang (Daten nicht gezeigt).

In einem Großteil der untersuchten Tumorproben konnte entweder keine (23 %) oder eine stark erhöhte (39 %) Expression des TP53-Proteins nachgewiesen werden (Abb. 4-14). Dies lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass WTS im Allgemeinen durch eine veränderte TP53-Proteinexpression, z.B. auf Grund von Mutationen oder Genverlusten, charakterisiert sind. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von Spleißformen der *MDM2*-mRNA signifikant mit einem stabilisiertem TP53 korreliert ($p = 0,01$; χ^2 -Test). 80 % (20 von 25) der Tumoren mit einer stark erhöhten TP53-Expression exprimierten gleichzeitig verkürzte *MDM2*-mRNA-Transkripte, während dies nur bei 33 % der Proben ohne oder mit nur geringer TP53-Proteinexpression der Fall war.

Von insgesamt 58 WTS-Patienten wurde die Expression des Tumorsuppressorproteins p14ARF in den Tumoren untersucht. In 86 % der untersuchten Proben (50 von 58) konnte die Expression von p14ARF im Western Blot nachgewiesen werden (Abb. 4-14). Dagegen blieb in 14 % (8 von 58) der Nachweis des p14ARF-Proteins erfolglos. Die Anzahl der WTS ohne p14ARF-Expression war in allen untersuchten Entitäten gleich. Mit Ausnahme der MFH und der Leiomyosarkome exprimierte jeweils ein Tumor kein p14ARF. Im Gegensatz zur mRNA von *p14ARF* korrelierte der Verlust der Proteinexpression nicht mit dem Stadium

($p = 0,7$; χ^2 -Test) oder mit dem Grad des Tumors ($p = 0,28$; χ^2 -Test). Darüber hinaus gab es keinen Zusammenhang zwischen der *p14ARF*-mRNA- und Proteinexpression ($p = 0,9$; χ^2 -Test). Es konnte nur eine Probe identifiziert werden, die weder die mRNA noch das Protein exprimierte.

4.4 Aberrante Lokalisation des MDM2-Onkoproteins im Zytoplasma

Die vorhergesagte Struktur der MDM2-Isoformen (Abb. 4-15) zeigt, dass sowohl die Kernlokalisierungs- als auch die Kernexportdomäne in allen diesen verkürzten Isoformen fehlt. Es war daher von Interesse zu prüfen, ob es möglich ist, diese Isoformen im Zytoplasma nachzuweisen. Die FL-MDM2-Form ist normalerweise im Zellkern lokalisiert ¹¹⁹. Von den 47 WTS, die eine Spleißvariante der *MDM2*-mRNA exprimierten, wurden randomisiert 8 Patientenproben für die immunhistochemische Analyse der Lokalisation der MDM2-Isoformen ausgewählt. Ein WTS, bei dem in der RT-PCR keine Spleißform detektiert werden konnte, wurde als Kontrolle mitgeführt. Der Nachweis der MDM2-Expression erfolgte mit drei verschiedenen Antikörpern, die alle unterschiedliche Epitope des MDM2-Proteins erkennen. Der polyklonale Antikörper (AK) N20 ist gegen ein N-terminales Epitop gerichtet, der monoklonale Antikörper 2A10 erkennt ein Epitop in der sauren Domäne, der polyklonale Antikörper C18 ein C-terminales Epitop.

Tab. 4-4: Zusammenfassung der Daten des immunhistochemischen Nachweises der MDM2-Expression. KM – Kernmembran, n.b. – nicht bestimmt

Patient	Spleißform	TP53-Mutation	N20		2A10		C18	
			Kern	Zyto	Kern	Zyto	Kern	Zyto
LZ1	+	+	++	+	+	+	+/-	+/-
LZ9	+	-	n.b.	n.b.	-	+	-	+
LZ15	+	-	+/-	+/-	+/-	+/-	- (+ KM)	+/-
LZ38	+	-	++	++	++	++	+	+
LZ69	+	-	+	+	+	+	+	+
LZ56	+	+	-	++	-	++	+	+
LZ58	+	-	- (+KM)	+	+/-	+/-	-	-
LZ13	+	-	+	+	+	+	-	+
LZ4	-	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/- (+KM)	+/-

In der Kontrolle (LZ4, keine Spleißform) konnte mit dem C18-AK neben einer Kernfärbung nur eine sehr schwache Zytoplasmafärbung erzielt werden, während mit den beiden weiteren AK darüber hinaus vor allem auch die Kernmembran gefärbt wurde. Dies könnte z.B. auf eine Akkumulation von MDM2 an der Kernmembran hinweisen. Die schwache zytoplasmatische Färbung lässt sich möglicherweise auf MDM2-Isoformen zurückführen, die nicht in der RT-PCR detektiert wurden. In der überwiegenden Zahl der Proben wurden durch alle verwendeten Antikörper (N20, 2A10, C18) sowohl das Zytoplasma als auch der Zellkern gefärbt. Die Proben LZ9 und LZ56 bilden hier eine Ausnahme. In der Probe LZ9 konnte durch die AK 2A10 und C18 (C-terminal) nur eine zytoplasmatische Färbung erzielt werden. Da im überwiegenden Teil der MDM2-Isoformen die Epitope dieser beiden AK deletiert sind bzw. durch Verschiebungen des Leserahmens in der Sequenz verändert sind, kann es sich bei dem detektierten Protein nur um die FL-Isoform handeln.

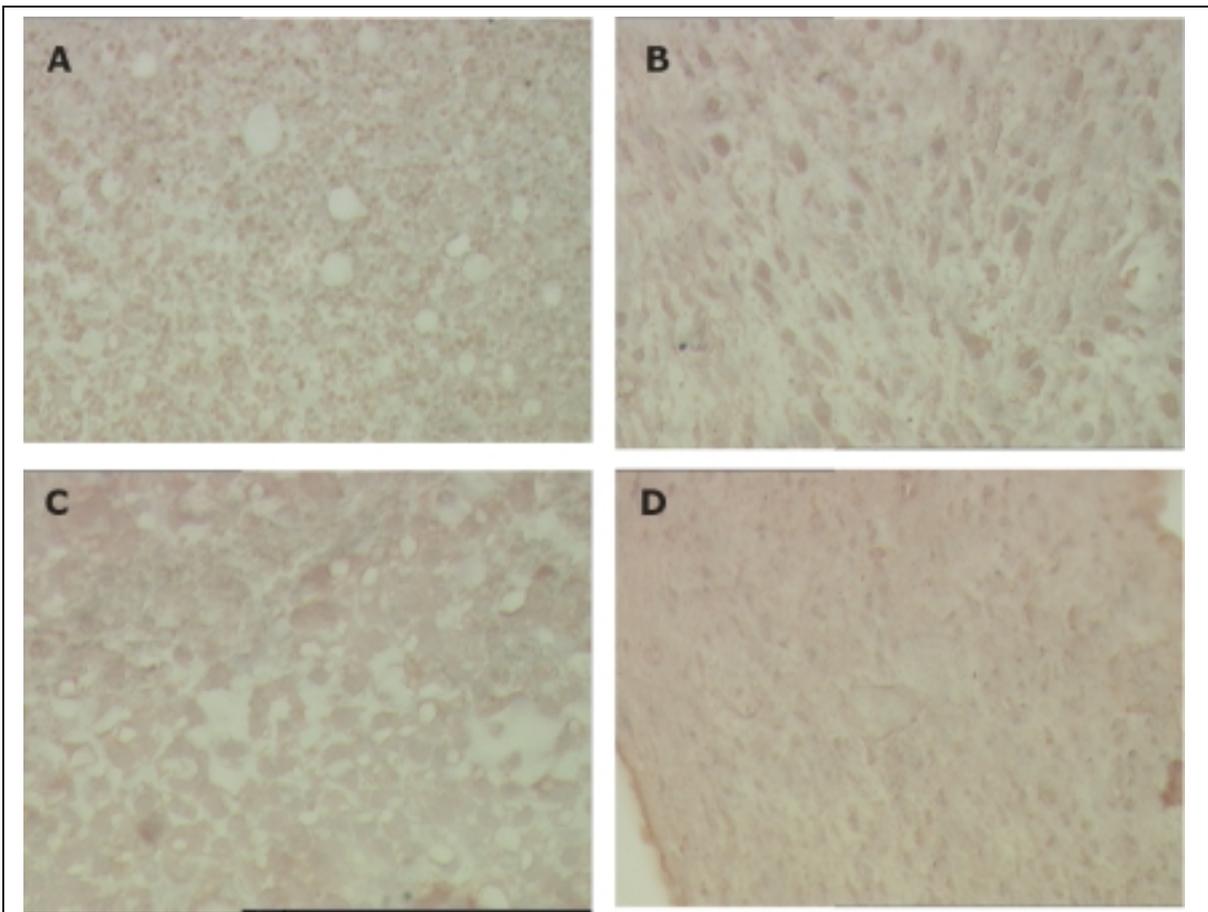


Abb. 4-15: Immunhistochemischer Nachweis der MDM2-Expression.

Die Abbildung zeigt die Färbung von Paraffinschnitten eines WTS mit nachgewiesenen Spleißvarianten (LZ56, **A** und **C**) und eines WTS ohne *MDM2*-mRNA -Spleißformen (LZ4, **B** und **D**). Es ist deutlich die Färbung des Zytoplasmas und des Zellkerns nach Färbung sowohl mit einem gegen ein N-terminales Epitop von MDM2 gerichteten AK (N20, **A**) als auch mit einem C-terminalen AK (C18, **C**) zu erkennen, was auf eine aberrante Lokalisation von MDM2 in der Probe LZ56 zurückzuführen ist. In der Probe LZ4 (ohne Spleißvarianten) wurde durch beide AK im Wesentlichen nur eine schwache Kernfärbung erzielt (**B**, N20, **D**, C18)

Interessant ist weiterhin die Probe LZ56, hier konnte mit den AK N20 und 2A10 ausschließlich eine zytoplasmatische Färbung erzielt werden. Mit dem AK C18 wurden sowohl der Zellkern als auch das Zytoplasma schwach gefärbt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass neben der MDM2-FL-Isoform auch eine verkürzte Isoform im Zytoplasma nachgewiesen worden ist.

Die zytoplasmatische Lokalisation von MDM2 war unabhängig vom *TP53*-Genstatus der untersuchten WTS. Zwei der hier untersuchten WTS mit einer aberranten subzellulären Verteilung von MDM2 enthielten ein mutiertes *TP53*-Gen, die restlichen 7 Proben ein wt-*TP53*-Gen (Tab. 4-4).

4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Untersuchung von MDM2, TP53, p14ARF und prognostische Aussagen der klinisch relevanten Parameter

Der Einfluss der molekularen Eigenschaften und klinischen Charakteristika auf die Prognose und die Überlebenszeit der WTS-Patienten wurde mit Hilfe des log-Rank-Tests ermittelt. Es zeigte sich, dass von den molekularen Faktoren nur die Amplifikation des *MDM2*-Gens und die *p14ARF*-mRNA- und p14ARF-Proteinexpression einen signifikanten Einfluss auf die Prognose von WTS-Patienten haben (Tab. 4-5).

Es war bemerkenswert, dass die Amplifikation des *MDM2*-Gens mit einer für den Patienten guten Prognose verbunden war. In unseren Untersuchungen betrug die Überlebenszeit von WTS-Patienten, die keine *MDM2*-Genamplifikation aufwiesen, im Durchschnitt 38 Monate, im Vergleich zu 96 Monaten für Patienten mit einem amplifizierten *MDM2*-Gen ($p = 0,077$, log-Rank-Test). Die Expression von *MDM2*-Spleißvarianten wurde häufiger in WTS mit einem höheren Tumorgrad beobachtet. Damit war jedoch kein negativer Einfluss auf die Prognose und die Überlebenszeit von WTS-Patienten verbunden. In der Kaplan-Meier-Analyse wurde für Patienten, in deren WTS Spleißvarianten nachgewiesen wurden, eine mittlere Überlebenszeit von 57 Monaten und für Patienten ohne Spleißform von 68 Monaten berechnet ($p = 0,39$, log-Rank-Test).

Sowohl der Verlust der *p14ARF*-mRNA- als auch der p14ARF-Proteinexpression waren mit einer stark verkürzten Überlebenszeit in dem von uns untersuchten Patientenkollektiv verbunden (Tab. 4-5). Die mittlere Überlebenszeit von WTS-Patienten, die keine *p14ARF*-mRNA exprimierten, betrug 11 Monate. Dagegen wurde für Patienten mit *p14ARF*-mRNA-Expression eine Überlebenszeit von durchschnittlich 96 Monaten berechnet ($p = 0,0001$, log-Rank-Test). Ein ähnliches Bild ergibt sich in Bezug auf die p14ARF-Proteinexpression. Die

Überlebenszeit betrug im Durchschnitt 26 Monate für Patienten ohne und 96 Monate für WTS-Patienten mit p14ARF-Expression ($p = 0,066$, log-Rank-Test).

Tab. 4-5: Univariate Kaplan-Meyer-Analyse des Einflusses molekularer und klinischer Faktoren auf die Überlebenszeit von WTS-Patienten. log-Rank – log-Rank-Test, WB – Western Blot.

Merkmal	Anzahl der Patienten	Überlebenszeit in Monaten (Median)	3-Jahres-Überlebensrate (%)	p (log-Rank)
<i>MDM2</i> Spleißvarianten				
nein	34	68	60	0,39
ja	43	57	56	
<i>MDM2</i> Amplifikation				
Nein	47	38	50	0,077
ja	18	96	80	
<i>MDM2</i> Expression (WB)				
Keine	17	38	47	0,94
Gering	17	35	49	
Erhöht	17	37	51	
Stark erhöht	8	68	71	
<i>TP53</i> Expression (WB)				
Keine	15	68	85	0,19
Gering	9	35	31	
Erhöht	11	25	36	
Stark erhöht	24	57	55	
<i>P14ARF</i> mRNA				
Nein	6	11	0	0,0001
ja	40	96	64	
<i>P14ARF</i> Expression				
Nein	8	26	29	0,06
ja	45	96	61	
Tumorstadium				
1				0,00001
2	22	96	94	
3	27	68	61	
4	25	24	34	
	18	5	0	

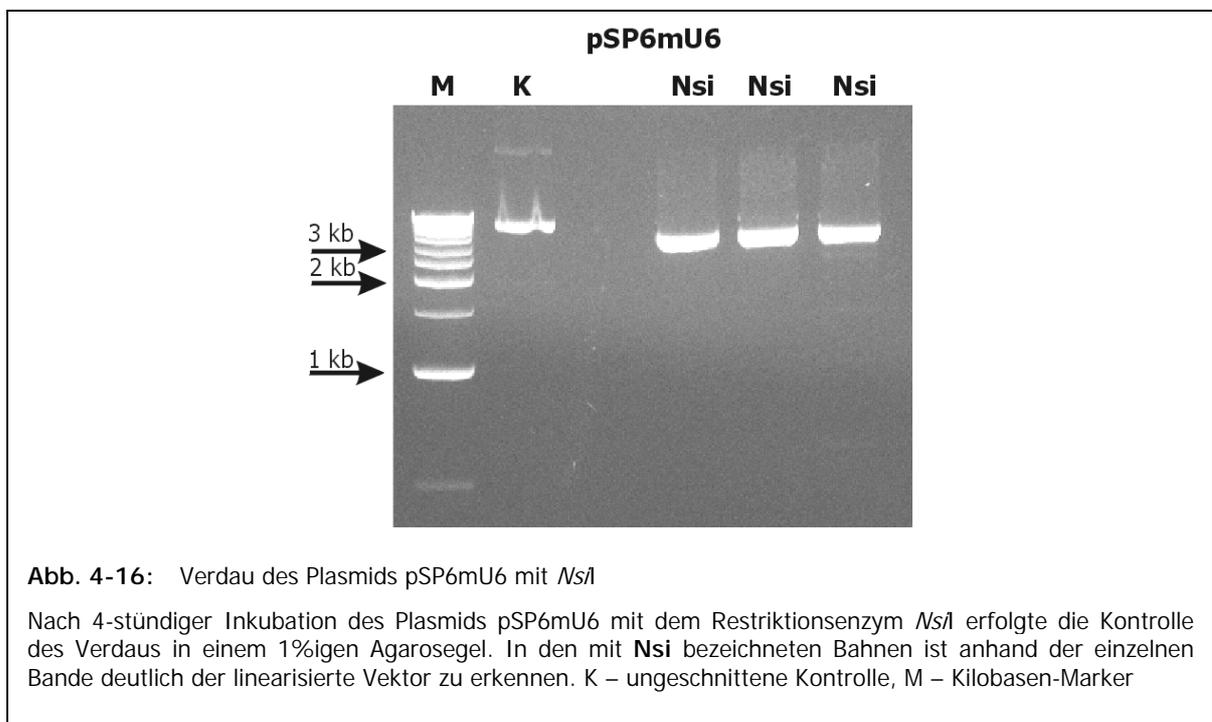
4.6 Konstruktion eines Adenovirus zur Expression von *MDM2*-antisense RNA

Ein weiteres Hauptziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Konstruktion eines adenoviralen Vektorsystems zur Expression kurzer Antisense-RNA-Fragmente in WTS-Zellen. Die kommerziell erhältlichen Expressionssysteme für Säugerzellen und virale Konstrukte sind oft für die Expression relativ großer cDNA-Fragmente (500 bp – 3 kb) optimiert. Antisense-ODNs wie auch Ribozyme oder DNAzyme sind im Vergleich dazu wesentlich kürzer (etwa 20 – 50 bp). Es ist daher erforderlich, die Größe des Transkripts zu minimieren. Eine Möglichkeit bietet sich durch die Klonierung der ODNs in das U6-Gen¹⁰⁰. Das U6-Gen wird ubiquitär in großer Menge in Säugerzellen exprimiert. Es entsteht dabei ein Transkript mit einer Länge von

83 bp. Im folgenden soll zunächst die Klonierungsstrategie der Konstruktion der adenoviralen Vektoren zur Expression von *MDM2*-Antisense-ODNs und der entsprechenden Mismatch-Kontroll-ODNs erläutert werden.

4.6.1 Klonierungsstrategie

Die einzelnen Schritte der Konstruktion der adenoviralen Vektoren sind schematisch in Abb. 4-17 dargestellt. Zunächst erfolgte die Anlagerung der entsprechenden Oligonukleotide (Antisense [AS] und Mismatch-Kontrolle [MM]) zu einem Doppelstrang. Die ODNs sind so konzipiert worden, dass nach der Bildung des Doppelstrangs das 5'-überhängende Ende einer *XhoI*- sowie das 3'-überhängende Ende einer *NsiI*-Schnittstelle entsteht.



Anschließend erfolgte die Öffnung des Plasmids pSP6mU6, welches das U6-Gen enthält, durch sequentiellen Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *XhoI* und *NsiI*. Über die komplementären Schnittstellen konnten nun die doppelsträngigen ODNs (AS und MM) in das pSP6mU6-Plasmid kloniert werden. In einem zweiten Schritt erfolgte die Umklonierung des U6-Gens aus dem pSP6mU6-Plasmid in das pAVS6aCla-Plasmid. Dazu war es notwendig, das U6-Gen mit dem Restriktionsenzym *ClaI* aus dem pSP6-Plasmid zu schneiden und in das mit *ClaI* geöffnete pAVS6aCla-Plasmid zu ligieren. Die entstandenen Plasmide pAVS6aCla-AS und pAVS6sCla-MM konnten nun zusammen mit der adenoviralen DNA zur Kotransfektion von 293-Zellen verwendet werden.

isoliert worden. Da die klonierten dsODNs nur eine Länge von 30 bp hatten, wäre es nicht möglich gewesen, die Klonierung durch Verdau des Plasmids mit *XhoI* und *NsiI* zu überprüfen. Das Fragment wäre auf Grund der geringen Größe nicht im Agarosegel detektierbar gewesen. Daher sind die dsODNs so konzipiert worden, dass die Erkennungssequenzen für *XhoI* und *NsiI* nach der Ligation verändert sind, die Plasmide mit diesen Enzymen nicht mehr geschnitten werden können. Der erfolgreiche Einbau der dsODNs in den Shuttlevektor wurde nach der Minipräparation zunächst durch Verdau mit *NsiI* überprüft (Abb. 4-18). Es zeigt sich, dass die Klone MM1 und MM2, AS1-3, AS8 und AS9 die gewünschten ODNs enthielten, da diese Plasmide **nicht** mit *NsiI* geschnitten werden konnten (Abb. 4-18). Diese Klone wurden für die weitere Subklonierung des *ClaI*-Fragments in den pAVS6sCla-Vektor ausgewählt. Die Klone MM3, MM4, und AS7 enthalten nicht die jeweiligen ODNs, da diese Plasmide mit Hilfe des Restriktionsenzym linearisiert worden sind (Abb. 4-18). Die Klone AS4-6 wurden ebenfalls verworfen, da diese größer sind als die ungeschnittene Kontrolle. Durch die Sequenzierung der ausgewählten Klone mit dem Primer mU6SP6 konnte der fehlerfreie Einbau der dsODNs bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

4.6.3 Subklonierung des *Cla*-Fragments in den pAVS6aCla-Vektor

Nach der Klonierung der dsODNs in das U6-Gen erfolgte die Subklonierung des Gens in den Vektor pAVS6aCla. Dazu wurde durch einen *ClaI*-Verdau das U6-Gen aus dem pSP6mU6-Vektor herausgeschnitten und in den mit *ClaI* geöffneten pAVS6aCla-Vektor ligiert. Da das Restriktionsenzym *ClaI* methylierungssensitiv ist, war es notwendig, für die Transformation und Übernachtskulturen einen dam- bzw. dcm-Methylase-defizienten *E. coli*-Stamm, z.B. GM2163, zu verwenden.

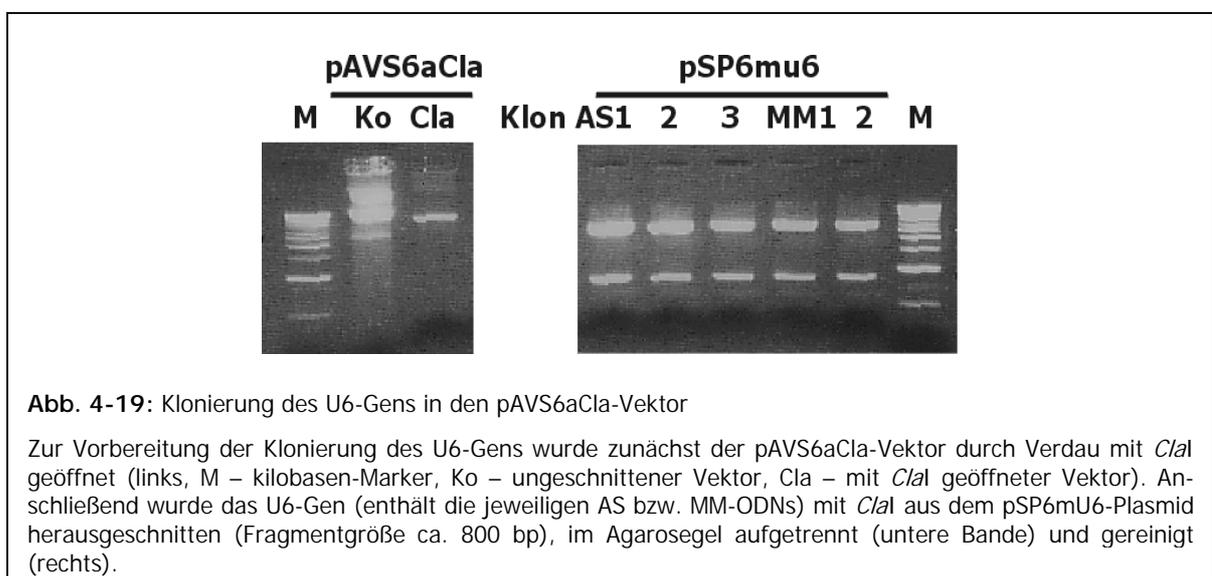


Abb. 4-19: Klonierung des U6-Gens in den pAVS6aCla-Vektor

Zur Vorbereitung der Klonierung des U6-Gens wurde zunächst der pAVS6aCla-Vektor durch Verdau mit *ClaI* geöffnet (links, M – kilobasen-Marker, Ko – ungeschnittener Vektor, Cla – mit *ClaI* geöffneten Vektor). Anschließend wurde das U6-Gen (enthält die jeweiligen AS bzw. MM-ODNs) mit *ClaI* aus dem pSP6mU6-Plasmid herausgeschnitten (Fragmentgröße ca. 800 bp), im Agarosegel aufgetrennt (untere Bande) und gereinigt (rechts).

Der Vektor pAVS6aCla wurde zunächst mittels Restriktionsverdau mit *ClaI* geöffnet, der linearisierte Vektor im Agarosegel gereinigt und aus dem Gel isoliert (Abb. 4-19). Gleichzeitig wurde das 800 bp große, das U6-Gen enthaltende *ClaI*-Fragment aus den pSP6mU6-Klonen MM1, MM2 usw. durch *ClaI*-Verdau und anschließende gelelektrophoretische Auftrennung gewonnen (Abb. 4-19). Der Ligationsansatz enthielt jeweils 200 ng linearisierte pAVS6aCla-Vektor-DNA und 100 ng des *ClaI*-Fragments aus den pSP6-Klonen. Nach einer 4-stündigen Inkubationszeit erfolgte die Transformation der *E. coli* GM2163-Zellen. Positive Klone wurden auf Grund der Ampizillin-Resistenz des Vektors selektiert.

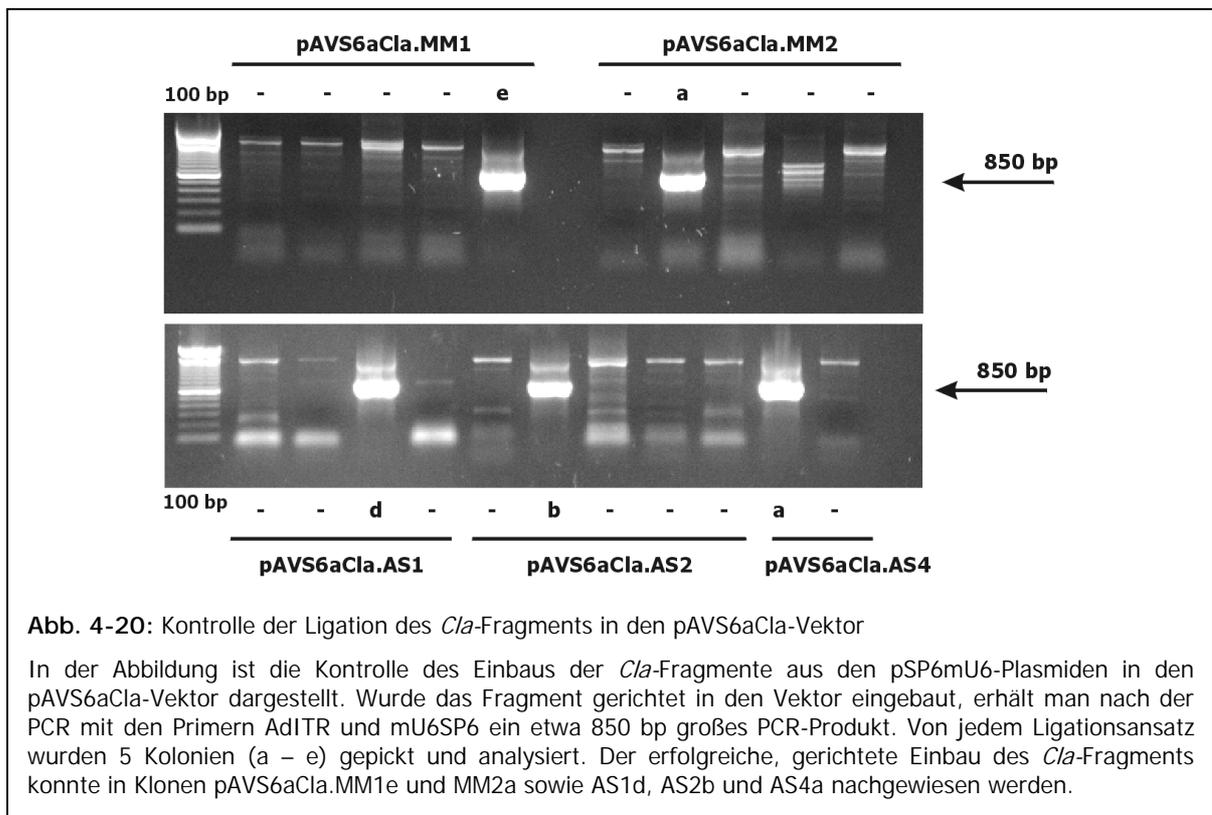


Abb. 4-20: Kontrolle der Ligation des *ClaI*-Fragments in den pAVS6aCla-Vektor

In der Abbildung ist die Kontrolle des Einbaus der *ClaI*-Fragments aus den pSP6mU6-Plasmiden in den pAVS6aCla-Vektor dargestellt. Wurde das Fragment gerichtet in den Vektor eingebaut, erhält man nach der PCR mit den Primern AdITR und mU6SP6 ein etwa 850 bp großes PCR-Produkt. Von jedem Ligationsansatz wurden 5 Kolonien (a – e) gepickt und analysiert. Der erfolgreiche, gerichtete Einbau des *ClaI*-Fragments konnte in Klonen pAVS6aCla.MM1e und MM2a sowie AS1d, AS2b und AS4a nachgewiesen werden.

Der gerichtete Einbau der *ClaI*-Fragments in den Vektor wurde mittels PCR mit den Primern mU6SP6 und AdITR überprüft. Der Primer mU6SP6 bindet im U6-Gen (also auf dem klonierten *ClaI*-Fragment), der Primer AdITR erkennt eine Sequenz auf dem pAVS6aCla-Vektor. Man erhält daher nur bei korrekter Orientierung des *ClaI*-Fragments ein ca. 850 bp großes Produkt in der PCR mit diesen Primern (Abb. 4-20). Von jeder Platte wurden 5 Kolonien (a-e) gepickt und wie oben beschrieben mittels PCR-Screen analysiert. Von den untersuchten Kolonien konnten insgesamt 5 Klone identifiziert werden, bei denen mit den Primern mU6SP6 und AdITR ein positives Ergebnis erzielt werden konnte (Abb. 4-20). Diese Klone wurden mit pAVS6aCla-MM1e, -MM2a sowie pAVS6aCla-AS1d, -AS2b und -AS4a bezeichnet. Im Anschluss erfolgte eine Sequenzierung der genannten Plasmide mit dem Primer AdITR, welche eine Bestätigung des korrekten Einbaus des *ClaI*-Fragments in den pAVS6aCla-

Vektor erbracht hat (Daten nicht gezeigt). Diese Plasmide wurden für die folgende Kotransfektion eingesetzt.

4.6.4 Kotransfektion von pAVS6aCla und AddI327 in 293-Zellen

Im folgenden galt es, 293-Zellen mit den jeweiligen pAVs6aCla-Plasmiden (MM1e, AS1d usw.) und der viralen DNA zur Virusbildung zu transfizieren. Da die Viren replikationsdefizient sein sollten, war es notwendig, den AddI327-Wildtyp-Viren die zur Replikation erforderliche E1-Region zu entfernen. Dazu wurde die genomische DNA von AddI327 mit *Xba*I verdaut. Dabei wird ein ca. 1,3 kb großes Fragment des viralen Genoms entfernt. Im Anschluss daran ist der Ansatz mit *Cla*I verdaut worden, um zu prüfen, ob das 1,3 kb-Fragment vollständig abgespalten wurde. Ist dies der Fall, so sind nach der Auftrennung im Agarosegel zwei Banden mit einer Größe von 400 und 900 bp Länge sichtbar, die aus dem *Cla*I-Verdau resultieren, wie dies in der Abb. 4-21 dargestellt ist.

5 µg E1-deletierte AddI327-DNA und jeweils 3 µg eines pAVS6aCla-Plasmids mit Antisense- (MM1e) bzw. Mismatch-Insert (AS1d) wurden zur Kotransfektion der 293-Zellen eingesetzt. In den 293-Zellen kommt es zur homologen Rekombination des Plasmids mit der viralen DNA über das homologe Rekombinationsfragment (HRF, Abb. 4-17). Somit ist das U6-Gen und auch die Sequenz der dsODNs im viralen Genom integriert. Diese Zellen eignen sich zur Virusexpansion, da sie stabil mit den Genen der E1-Region transfiziert worden sind und die zur Virusreplikation erforderlichen Proteine exprimieren. Aus diesem Grund ist es möglich, replikationsdefiziente Viren zu expandieren. Als Kontrollen wurden ungeschnittene wt-DNA von AddI327 als Positivkontrolle und ein Ansatz ohne virale DNA als Negativkontrolle mitgeführt.

Nach etwa einer Woche waren auf allen Platten außer der Leerkontrolle Plaques erkennbar (Daten nicht gezeigt). Plaques entstehen durch die Lyse der 293-Zellen infolge der Virenbildung. Einzelne Plaques wurden markiert und weiter beobachtet. Wenn die Plaques eine bestimmte Größe erreicht hatten, wurden sie mit Hilfe einer Pasteurpipette isoliert. Insgesamt wurden von den Platten, die mit dem MM1e bzw. AS1d-Plasmid und der viralen DNA transfiziert worden sind, jeweils bis zu 8 Plaques gepickt. Die Bezeichnung der Plaques bzw. der entstandenen Adenoviren leitet sich von der Nummer der Platte sowie der Nummer der Plaques ab, z.B. AddI327.MM.2.8 ist die Bezeichnung für einen rekombinanten Adenovirus mit Mismatch-Insert.

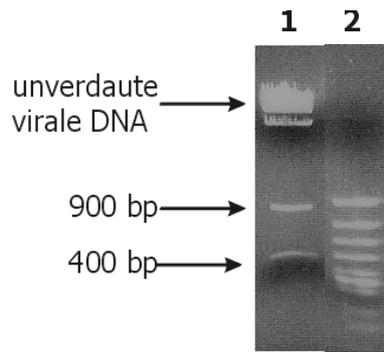


Abb. 4-21: Vorbereitung der adenoviralen DNA

1. Die adenovirale DNA wurde vor der Kotretransfektion mit *ClaI* inkubiert. Dadurch ist ein etwa 1,3 kb großes Fragment der E1A-Region des Addl327 Genoms entfernt worden. Die entstehenden Viren sind daher replikationsdefizient. Der Verdau wurde anschließend durch Inkubation des Ansatzes mit *XbaI* überprüft. Dabei ist das 1,3 kb Fragment wiederum in zwei Fragmente mit einer Größe von 400 und 900 bp gespalten worden.
 2. λ -DNA/*HindIII*-Größenmarker

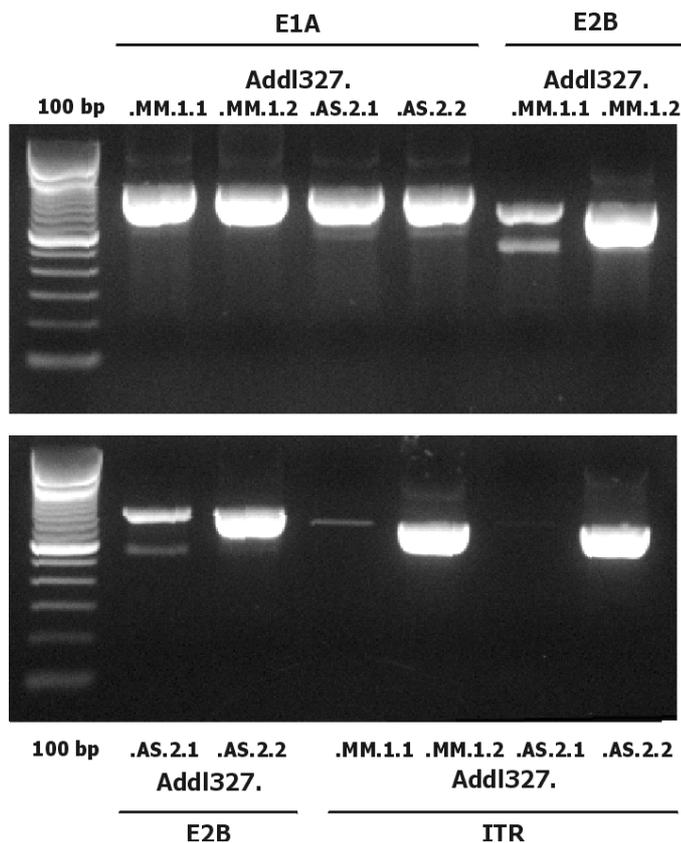


Abb. 4-22: Nachweis der Virenbildung in den Plaques

Mittels PCR mit Primerpaaren für verschiedene Regionen des adenoviralen Genoms wurde geprüft, ob die durch homologe Rekombination gebildeten Viren das U6-Gen (und die Sequenz für die ODNs) enthielten. Die Abbildung zeigt, dass das U6-Gen in den Viren der Plaques Addl327.MM1.2 und AS.2.2 nachgewiesen werden konnte, da die verwendeten Primer nur binden können, wenn das Plasmid pAVS6aCla in das adenovirale Genom eingebaut worden ist. Ein PCR-Produkt mit Primern für die E2-Region zeigt ebenfalls an, dass die homologe Rekombination erfolgreich war, da diese Genregion auf dem Addl327-Genom enthalten ist. Da die DNA-Präparationen auch genomische DNA der 293-Zellen enthalten, lässt sich bei Verwendung von Primern für dieses Gen ein PCR-Produkt nachweisen. ITR – inverted terminal repeats.

Sequenz in die DNA des Virus Addl327.AS.1.2 und der entsprechenden *MDM2*-Mismatch-Sequenz in die DNA des Virus Addl327.MM.2.8. In den anderen untersuchten Plaques konnte die gesuchte AS- bzw. MM-Sequenz ebenfalls gefunden werden.

Die hier beschriebenen adenoviralen Vektoren können nun für eine Vielzahl von Anwendungen eingesetzt werden. Im Vordergrund stehen dabei natürlich therapeutische Studien, die auf der Inhibierung der *MDM2*-Expression in Tumoren beruhen. Durch die Verwendung eines replikationsdefizienten Adenovirus wird eine höhere Transfektionsrate im Vergleich zum liposomalen Gentransfer angestrebt. Des Weiteren sind aber auch Untersuchungen zur *MDM2*-Funktion und der *MDM2*-Spleißvarianten denkbar.

4.7 *In vivo* Transfektionsexperimente mit *MDM2*-AS Oligonukleotiden

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

Für die Etablierung eines Xenotransplantationsmodells für WTS in nu/nu-Ratten wurde die ATCC-Zelllinie RD verwendet. Zum Einen weil diese Zelllinie nur ein mutiertes *TP53*-Allel aufweist (das zweite Allel ist deletiert) und dadurch die Effekte einer *MDM2*-AS Therapie unabhängig von wt-*TP53*-Protein untersucht werden konnten. Zum Anderen war durch Arbeiten aus unserer Arbeitsgruppe bekannt, dass diese Linie im Maus- und Rattenmodell reproduzierbar Tumoren bilden kann ¹¹⁰.



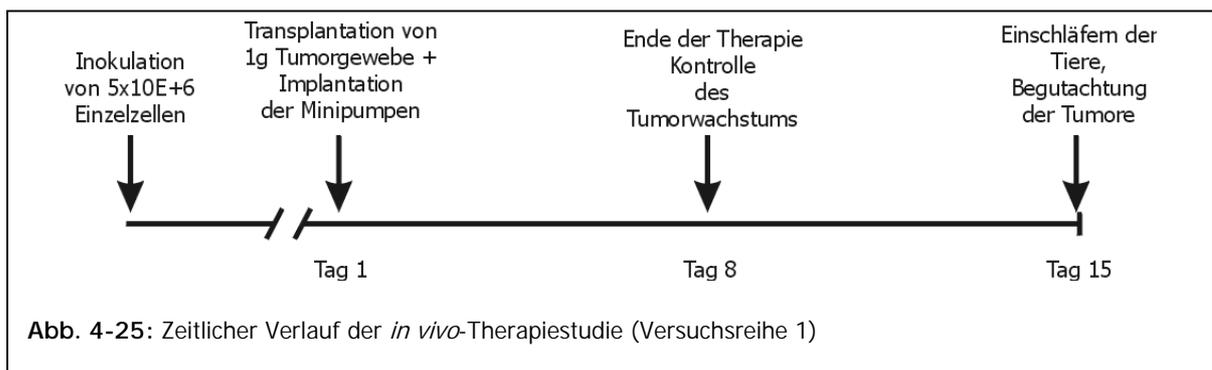
Abb. 4-24: Formation eines Xenotransplantattumors der Zelllinie RD

Nach Inokulation von 5×10^6 Einzelzellen in die Hinterbeine des Tieres kam es nach ca. 6 Wochen zur Bildung eines Tumors mit einem Durchmesser von 2,5 cm.

Es konnte gezeigt werden, dass sich nach Inokulation von Einzelzellsuspensionen in die Hinterbeine der Tiere (s. 3.10.1) in der Mehrzahl der Ratten Tumoren bildeten (Abb. 4-24). Die WTS waren durch das Vorhandensein einer Pseudokapsel und eine feste Konsistenz charakterisiert. Überschritt das Tumorumfang eine kritische Größe von ca. 1 cm³, konnte im Tumorzentrum eine zunehmende Nekrotisierung beobachtet werden. Eine Metastasierung war in keinem der untersuchten Tiere während des Versuchszeitraums nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

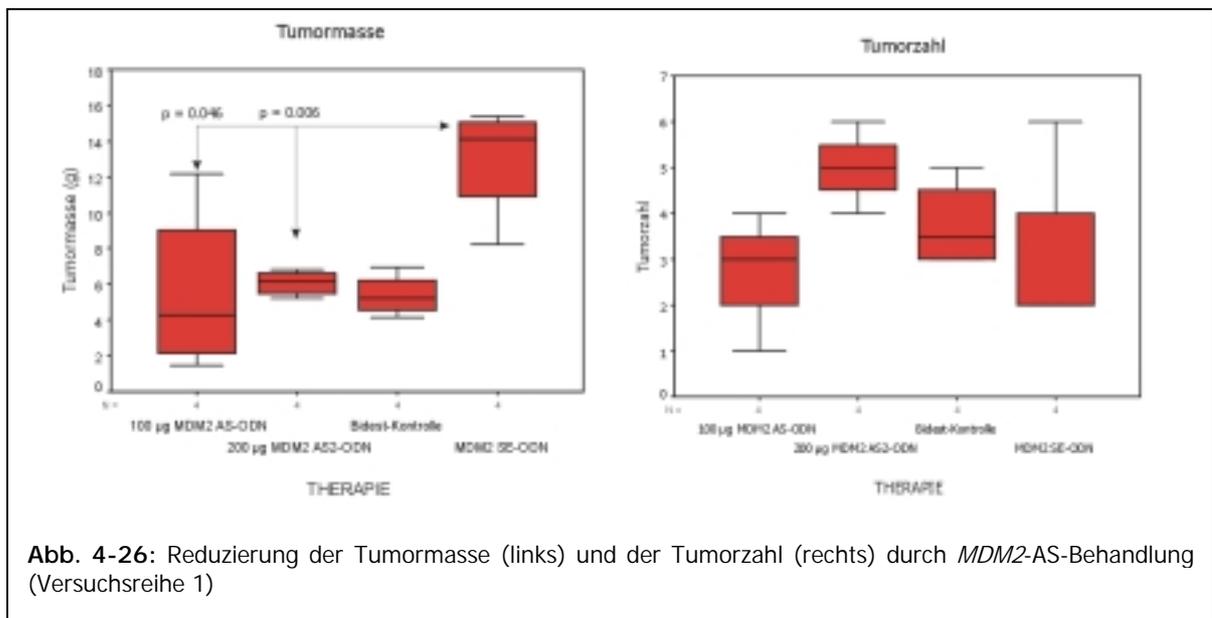
4.7.2 Behandlung von Xenotransplantattumoren mittels *MDM2*-AS Oligonukleotiden (Versuchsreihe 1)

Der zeitliche Verlauf des Therapieschemas ist in Abb. 4-25 dargestellt. Die osmotischen Minipumpen, welche die entsprechende Menge an *MDM2*-AS- bzw. SE-ODN enthielten, wurden gleichzeitig mit dem Tumorgewebe implantiert (Abb. 4-25, 3.10.2.1). Die Pumpen gewährleisteten durch eine geeignete Pumprate die kontinuierliche Abgabe der ODNs über einen Zeitraum von genau einer Woche. Je nach Therapiegruppe wurden die Tumoren mit je 100 µg *MDM2*-AS-ODN⁸⁶, 200 µg *MDM2*-AS2-ODN⁹⁰, Aqua bidest bzw. 100 µg *MDM2*-SE-ODN behandelt. 15 Tage nach Versuchsbeginn sind die Tiere eingeschläfert worden, und es erfolgte die operative Entfernung aller makroskopisch sichtbaren Tumoren sowie eine Auswertung der Studie durch Bestimmung der Tumormasse und der Tumorzahl.



Bei der makroskopischen Beurteilung der Tumoren zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen. Während die Tumoren der mit den AS-ODNs behandelten Tiere in einer Art Pseudokapsel wuchsen und sich dadurch leicht entfernen ließen, waren die Tumoren der Kontrollgruppen durch stark invasives Wachstum mit Zerstörung der angrenzenden Strukturen (z.B. Darmwand) charakterisiert. Des Weiteren war bemerkenswert, dass die osmotischen Pumpen der Kontrollgruppen von Tumormasse eingeschlossen waren, während dies bei den Pumpen der mit AS-ODNs behandelten Ratten nicht

der Fall war. Durch die Behandlung der Xenotransplantattumoren mit den zwei verschiedenen *MDM2*-AS-ODNs konnte das Tumorwachstum verlangsamt bzw. die Tumormasse im Vergleich zur Sense-Kontrolle reduziert werden (Abb. 4-26). Im Einzelnen ergab sich folgendes Bild: nach 15 Tagen kontinuierlicher Gabe der AS-, AS2- bzw. SE-ODNs und Aqua bidest betrug die durchschnittliche Tumormasse in der mit dem *MDM2* AS-ODNs behandelten Gruppe $5,58 \text{ g} \pm 4,4 \text{ g}$ und in der mit dem *MDM2* AS2-ODNs behandelten Ratten $6,07 \text{ g} \pm 0,7 \text{ g}$. Das ist signifikant weniger im Vergleich zur Gruppe, die mit SE-ODNs behandelt wurde. In dieser Gruppe hatten die Tumoren ein durchschnittliches Gewicht von $12,98 \text{ g} \pm 3,2 \text{ g}$. Dies



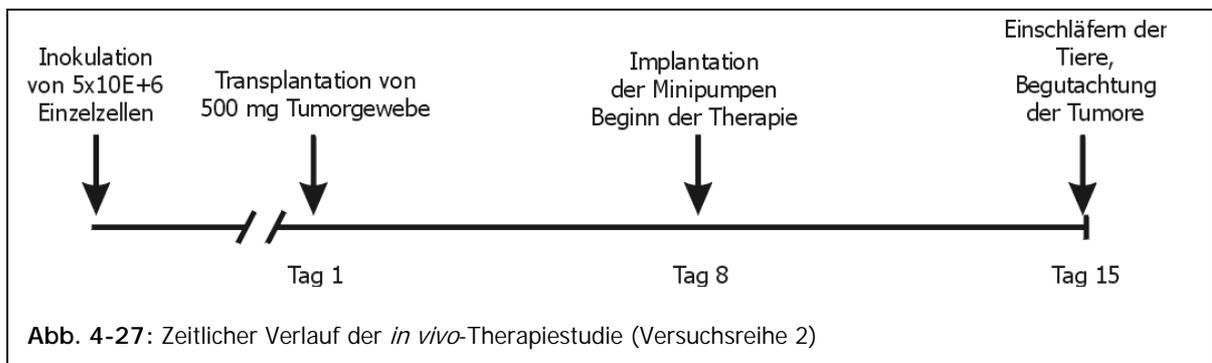
entspricht einer Reduzierung der Tumormasse um mehr als 55 % ($p=0,046$ bzw. $p=0,006$, Student t-Test). Unerwartet niedrig war die Tumormasse in der Kontrollgruppe, die ausschließlich mit bidestilliertem Wasser (dem Lösungsmittel für die AS- bzw. SE-ODNs) behandelt wurde. Die durchschnittliche Tumormasse lag bei $5,41 \text{ g} \pm 1,17 \text{ g}$ und somit auf vergleichbarem Niveau wie die AS-behandelten Gruppen.

Neben der Tumormasse wurde die Anzahl der makroskopisch sichtbaren Tumoren bestimmt. Hier zeigten sich ebenfalls deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (Abb. 4-26). Während das durchschnittliche Tumorgewicht der beiden therapeutischen Gruppen (mit AS- bzw. AS2-ODNs behandelt) annähernd gleich war, konnten in den mit AS-ODNs behandelten Ratten durchschnittlich $2,75 \pm 1,25$ Tumoren pro Tier detektiert werden, in den mit AS2-ODNs behandelten Tieren jedoch annähernd die doppelte Anzahl ($5 \pm 0,81$ Tumoren). Die durchschnittliche Tumorzahl pro Ratte in den Kontrollgruppen betrug $3,75 \pm 0,95$ Tumoren in der Bidest-Kontrollgruppe bzw. 3 ± 2 Tumoren pro Tier in der mit SE-ODNs behandelten Gruppe. Die erzielten Ergebnisse in dieser *in vivo* Studie zeigten das Potenzial

einer Therapie mit *MDM2*-AS-ODNs auf. Sie dienten als Ausgangspunkt für weitere, nachfolgend dargestellte Untersuchungen.

4.7.3 Behandlung von Xenotransplantattumoren mittels *MDM2*-AS Oligonukleotiden (Versuchsreihe 2)

Im Vergleich zu der unter 4.3.3 beschriebenen Behandlung der Xenotransplantattumoren der STS-Zelllinie RD wurde das Protokoll in den nachfolgenden Studien wie folgt modifiziert: (i) es wurden verschiedene Konzentrationen des *MDM2*-AS2-ODNs eingesetzt, (ii) die Implantation der osmotischen Minipumpen erfolgte nun eine Woche nach der Xenotransplantation des Tumorgewebes (Abb. 4-27) und (iii) anstelle der Bidest-Kontrolle wurde physiologische Kochsalzlösung verwendet (s. 3.10.2.2).



4.7.3.1 Reduzierung der Tumormasse und der Tumorzahl durch Behandlung mit *MDM2*-AS2 Oligonukleotiden

In dieser Versuchsreihe wurden insgesamt 24 Ratten behandelt, davon je 7 Tiere mit 100 µg bzw. 200 µg des *MDM2*-AS-ODN und jeweils 5 Tiere als Kontrolle mit entweder 100 µg *MDM2*-SE-ODN oder physiologischer Kochsalzlösung. Die Behandlung der Ratten erfolgte über einen Zeitraum von einer Woche, wobei die Gabe der ODNs bzw. der Kochsalzlösung kontinuierlich mit einer Pumprate von 1 µL/h erfolgte. Nach 15 Tagen wurden alle makroskopisch sichtbaren Tumoren chirurgisch entfernt und begutachtet. Die Behandlung der Tumoren mit *MDM2*-AS2-ODNs (100 bzw. 200 µg) führte zu einer signifikanten Reduzierung der Gesamttumormasse im Vergleich zu den mit Kochsalzlösung behandelten Tieren ($p = 0,016$ bzw. $p = 0,007$, Student t-Test, Abb. 4-28, 4-29). Nach 7 Tagen Behandlung mit 200 µg *MDM2*-AS-ODNs lag die durchschnittliche Tumormasse in dieser Gruppe bei $0,78 \text{ g} \pm 0,53 \text{ g}$, dies entspricht etwa einer 71 %igen Verminderung im Vergleich zu der Kontrollgruppe, die mit physiologischer Kochsalzlösung behandelt worden ist ($2,64 \pm 1,33 \text{ g}$), und einer

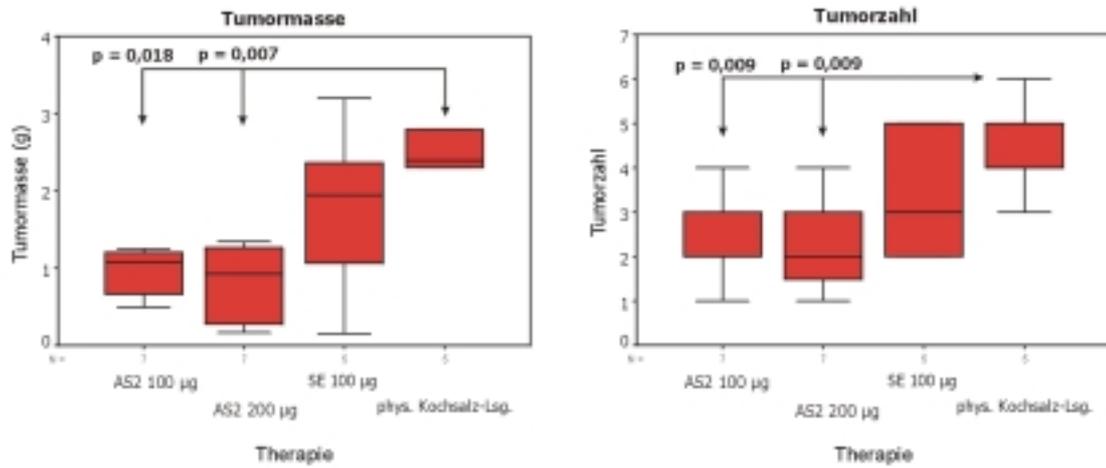


Abb. 4-28: Reduzierung der Tumormasse (links) und der Tumorzahl (rechts) durch Behandlung der Tumore mit *MDM2*-AS2-ODNs (Versuchsreihe 2)

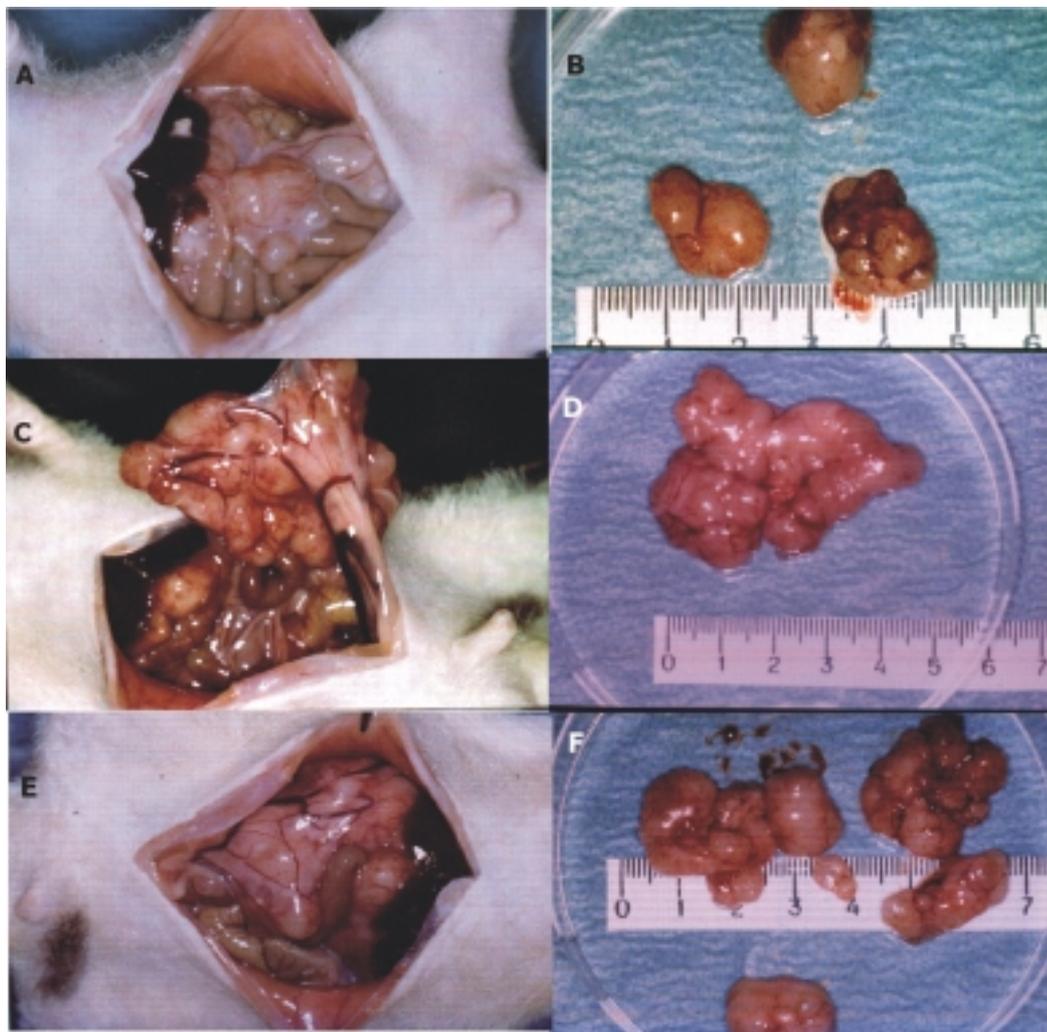


Abb. 4-29: Effekt der Behandlung der Xenotransplantattumoren mit *MDM2*-AS-ODNs

Makroskopisch sichtbare Tumore *in situ* und anschließend frei präpariert.

A, B Tier aus der Behandlungsgruppe mit 200 µg *MDM2*-AS-ODNs.

C, D Tier aus der SE-ODN-Kontrollgruppe.

E, F Tier aus der Kontrollgruppe, die mit physiologischer Kochsalzlösung behandelt wurde.

56%igen Reduzierung der Tumormasse im Vergleich zu der Gruppe, die mit *MDM2*-SE-ODNs behandelt wurde ($1,74 \pm 1,17$ g). Obwohl die durchschnittliche Tumormasse in dieser Gruppe deutlich höher war als in den mit AS2-ODNs behandelten Tieren, war der Unterschied nicht signifikant, da das Tumorgewicht in der SE-Kontrollgruppe einer starken Schwankungsbreite unterlag. Neben der deutlichen Reduzierung der Tumormasse durch die *MDM2*-AS2-ODNs wurde in diesen therapeutischen Gruppen mit 2,3 Tumoren je Ratte eine verminderte Zahl an makroskopisch sichtbaren Tumoren gefunden. Demgegenüber bildeten sich in der mit *MDM2*-SE-ODNs behandelten Kontrollgruppe durchschnittlich 3,4 Tumoren je Ratte ($p = 0,009$; Student t-Test), in der mit Kochsalzlösung behandelten Gruppe waren es am Ende des Versuchszeitraums im Durchschnitt 4,4 Tumoren pro Tier ($p = 0,009$, Student t-Test).

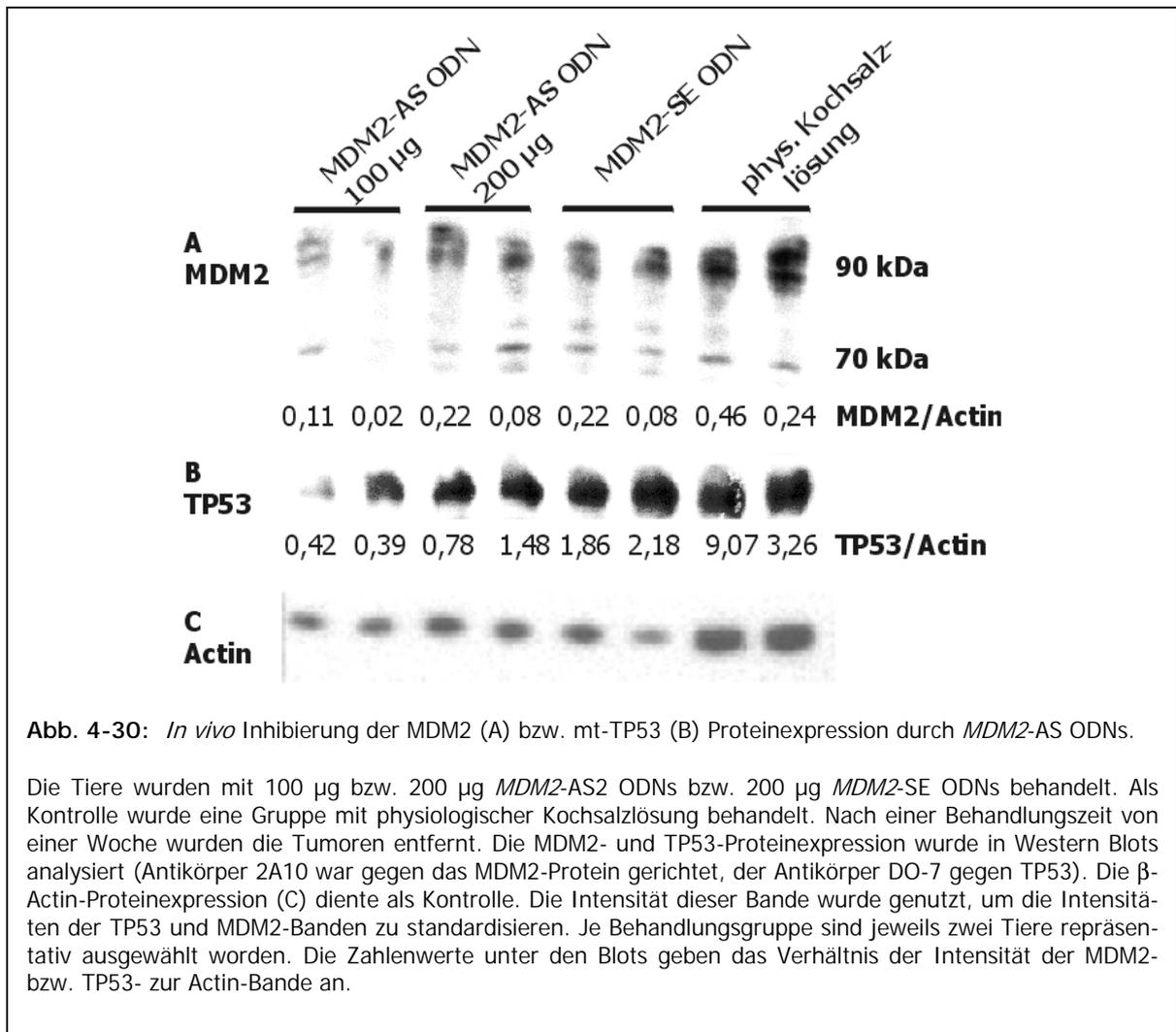
4.7.3.2 Western Blot Analyse

Um den Einfluss der Behandlung der Tumoren mit *MDM2*-AS2-ODNs auf die MDM2- und mt-TP53-Proteinexpression zu untersuchen, wurde von allen Tumoren Protein isoliert und in Western Blots qualitativ und semiquantitativ analysiert (s. 3.6.4).

In Tumoren aus Ratten, welche mit 100 bzw. 200 μg *MDM2*-AS2-ODNs behandelt wurden, war die MDM2-Proteinmenge gegenüber den Kontrollgruppen stark reduziert war (Abb. 4-30). Demgegenüber wiesen die mit *MDM2*-SE-ODNs behandelten Tumoren eine leicht erhöhte MDM2-Proteinexpression auf. Die Tumoren aus den mit physiologischer Kochsalzlösung behandelten Tieren waren durch eine stark erhöhte Expression des MDM2-Onkoproteins charakterisiert. Statistische Analysen ergaben, dass die MDM2-Expression in den mit Kochsalzlösung behandelten Ratten, nicht jedoch die der Tiere aus der SE-Kontrollgruppe gegenüber den therapeutischen Gruppen (100 bzw. 200 μg *MDM2*-AS2-ODNs) signifikant erhöht war ($p = 0,05$ bzw. $p = 0,068$; Student t-Test).

Weiterhin wurden auch die Auswirkungen der Behandlung der Tumoren mit *MDM2*-AS2-ODNs auf die Expression des mt-TP53-Proteins untersucht, da die RD-Linie nur ein mutiertes *TP53*-Allel besitzt. Ebenso wie die MDM2-Proteinexpression war die Menge an mt-TP53 in den Gruppen stark reduziert, die mit verschiedenen Dosen *MDM2*-AS2-ODNs behandelt worden sind (Abb. 4–30). Im Gegensatz dazu konnte in der SE-ODN-Kontrollgruppe eine leicht erhöhte, und in der mit Kochsalz-Lösung behandelten Gruppe eine hohe mt-TP53-Proteinmenge detektiert werden. Eine detaillierte statistische Analyse ergab, dass die mt-TP53-Expression in der SE-ODN-Gruppe signifikant im Vergleich zu der Gruppe erhöht war, die mit 100 μg *MDM2*-AS2-ODNs behandelt wurde ($p = 0,029$; Student t-Test). Die hier ge-

zeigten Daten belegen erstmals einen negativen Einfluss der Inhibierung der MDM2-Expression auf die Expression von mt-TP53 *in vivo*. Dies ist von Bedeutung, da mutiertes TP53-Protein eine wesentliche Rolle in der Tumorprogression spielen kann.



4.7.3.3 Immunhistochemische Charakterisierung der soliden Tumoren

Die Analyse der Mitosen in den Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Tumormproben der einzelnen Behandlungsgruppen pro 10 Sichtfeldern (HPF X 40) ergab ein Minimum von 52 und ein Maximum von 78 Mitosen. Dabei konnten keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden, unabhängig davon, ob die Tiere mit *MDM2*-AS2-ODNs oder SE-ODNs bzw. physiologischer Kochsalzlösung behandelt worden sind (Daten nicht gezeigt). Alle Tumoren wurden daher als „hochgradig“ eingestuft. Weiterhin konnte anhand der untersuchten inneren Organe der Ratten (Leber, Milz und Muskel) bei subtiler Untersuchung mit 4,5-facher Vergrößerung in keinem Falle eine Metastasierung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Obwohl in allen Fällen Tumoreinzelnzellen durch die drei verwendeten TP-53 Antikörper (Pab-1801, DO-1, DO-7) immunhistochemisch angefärbt wurden, lag der Anteil der als positiv eingestuften Zellen oftmals unter der Grenze von 10 %. Die Tumoren aller untersuchten Gruppen wiesen jedoch ein spezifisches Färbemuster in Bezug auf TP-53 auf. In den beiden mit *MDM2*-AS2-ODNs behandelten Gruppen (sowohl mit 100 µg als auch mit 200 µg) konnte nur durch den DO-7 die Expression von mt-TP53 nachgewiesen werden. In der mit SE-ODNs behandelten Gruppe zeigten alle drei eingesetzten Antikörper eine schwache Färbung für TP53, während in der Kochsalz-Kontrollgruppe in den Tumoren aller Tiere eine starke TP53 Expression durch alle Antikörper qualitativ nachgewiesen wurde (Tab. 4-6).

Die Expression des MDM2-Proteins konnte nur mit dem Antikörper 1B10, der ein C-terminales Epitop erkennt, nachgewiesen werden (Tab. 4-6). Der Antikörper IF-2, der gegen ein N-terminales Epitop gerichtet ist, färbte weder die Tumoren der mit den AS2-ODNs behandelten Gruppen, noch die Tumoren der beiden Kontrollgruppen (SE-ODNs und physiologische Kochsalzlösung). Mit dem Antikörper 1B10 konnte nur in einem Fall in der mit *MDM2*-AS-ODNs behandelten Gruppe (200 µg) eine MDM2-Expression detektiert werden, in den anderen Tumoren dieser Gruppe und den Tumoren der mit 100 µg *MDM2*-AS2-ODNs bzw. SE-ODNs behandelten Tiere war der Nachweis der Expression des MDM2-Proteins negativ. Im Gegensatz dazu zeigten alle Tumoren der Kochsalz-Kontrollgruppe eine sehr starke positive Färbung für das MDM2-Protein mit diesem Antikörper.

Tab. 4-6: Zusammenfassung der Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung der einzelnen therapeutischen Gruppen

Antigen	Antikörper	<i>MDM2</i> -AS2-ODNs (100µg)	<i>MDM2</i> -AS2-ODNs (200µg)	SE-ODNs	Phys. Kochsalz-Lsg.
TP53	Pab-1801	-*	-	+	+++
	DO-1	-	-	+	+++
	DO-7	±	±	++	+++
MDM2	1B10	-	±	-	+++
	IF-2	-	-	-	-

* - - keine Färbung, ± - geringer Anteil gefärbter Zellen, + - moderate, ++ - erhöhte, +++ - stark erhöhte Expression

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl in der Western Blot- als auch in der immunhistochemischen Analyse eine signifikante Reduzierung der MDM2- und erstmals auch der mt-TP53-Proteinmenge durch eine Behandlung mit *MDM2*-AS2-ODNs nachgewiesen werden konnte.

5 Diskussion

Das *MDM2*-Onkogen wurde ursprünglich in einer transformierten BALB/c-Mauszelllinie entdeckt, in der es vielfach amplifiziert vorlag und überexprimiert wurde^{35, 36}. *MDM2* ist in der Lage, mit TP53 Komplexe zu bilden und dadurch dessen Funktion als Transaktivator zu hemmen^{37, 43}. *MDM2* kann somit den bedeutenden Tumorsuppressor TP53 und dessen Funktionen inhibieren. Andererseits wird die Expression von *MDM2* durch TP53 positiv reguliert. Damit sind das Onkogen *MDM2* und das TSG *TP53* durch einen so genannten autoregulatorischen „feedback-loop“ miteinander verbunden¹²⁰. In einer Vielzahl von Tumorarten ist dieses Gleichgewichts zwischen *MDM2* und TP53 gestört. Eine Ursache können Mutationen des *TP53*-Gens sein, wie dies in etwa 50 % der Tumoren der Fall ist¹²¹. Dadurch kommt es vielfach zur Expression eines funktionell inaktiven oder dominant negativen TP53-Proteins. Andererseits kann das *MDM2*-Onkoprotein, insbesondere in WTS, überexprimiert werden¹²², was bei einem Tumor in seiner Wirkung einer Mutation des *TP53*-Gens vergleichbar ist. Dies ist oftmals mit einer schlechten Prognose, insbesondere für WTS-Patienten, verbunden^{29, 30}. Die erhöhte Expression von *MDM2* in Tumoren wird teilweise auf die Amplifikation des *MDM2*-Gens zurückgeführt, kann jedoch auch unabhängig davon auftreten. Oftmals ist die *MDM2*-Überexpression auf eine verstärkte Transkription bzw. auf Transkripte mit einer unterschiedlichen Translationseffizienz zurückzuführen^{47, 123, 124}. Ein weiterer Mechanismus, der zu einer veränderten *MDM2*-Expression in Tumoren beitragen kann, ist das Vorkommen von Spleißvarianten der *MDM2*-mRNA und verschiedener *MDM2*-Isoformen, wie dies für Tumorzelllinien der Maus^{37, 39, 125, 126} beschrieben worden ist. Es war daher von Interesse zu prüfen, ob auch in WTS die Expression von multiplen Spleißformen der *MDM2*-mRNA nachweisbar ist, und ob diese Isoformen eine tumorbiologische Bedeutung für WTS besitzen.

5.1 Expression von Spleißvarianten der *MDM2*-mRNA

In *MDM2*-mRNA-Expressionsstudien konnten mittels Northern-Blot an ausgewählten WTS-Zelllinien mit einer Sonde, die den gesamten kodierenden Bereich der *MDM2*-mRNA überspannt, zusätzlich zur FL-Form mehrere kürzere Transkripte nachgewiesen werden¹¹⁰, vergleichbare Befunde sind bereits für murine^{40, 126} und humane Tumorzelllinien¹²⁵ beschrieben. Eine detaillierte Analyse der gefundenen Transkripte gibt es hingegen bisher nicht. Die biologische Funktion der von diesen Transkripten kodierten Proteine war ebenfalls unbekannt. Zu Beginn der Arbeiten wurden von Sigalas *et al.*⁴² insgesamt fünf verkürzte *MDM2*-mRNA-Transkripte in Blasen- und Ovarialkarzinomen nachgewiesen (vgl. Abb. 1-2). Bei 50 % der Ovarialkarzinomproben wurden alternativ gespleißte Transkripte detektiert. Für

die von uns untersuchten WTS konnte ein ähnlich hoher Anteil ermittelt werden. Von insgesamt 85 WTS-Proben exprimierten laut RT-PCR 60 % (51 von 85) *MDM2*-Isoformen. Für 47 der 51 Proben mit multiplen PCR-Produkten gelang es, eines oder mehrere dieser PCR-Fragmente zu sequenzieren und als Spleißvariante der *MDM2*-mRNA zu identifizieren. Da die Identität der zusätzlichen Banden in den verbleibenden vier WTS-Proben bislang nicht eindeutig aufgeklärt wurde, ist es denkbar, dass der Anteil der WTS, die Spleißvarianten der *MDM2*-mRNA aufweisen, durchaus 60 % betragen kann. Durchschnittlich konnten je WTS-Probe neben der FL-Form zwei Spleißformen detektiert werden. Insgesamt gelang es, 12 verschiedene Transkripte der *MDM2*-mRNA nachzuweisen. In den untersuchten RMS-Zelllinien und juvenilen RMS wurden weitere 8 Transkripte detektiert. Die Zahl der tatsächlich exprimierten Transkripte liegt möglicherweise weitaus höher, da nicht alle in der RT-PCR amplifizierten Produkte charakterisiert werden konnten. Konnten von einigen WTS-Proben mehrere Banden identifiziert und *MDM2*-Spleißformen zugeordnet werden, so gelang in anderen Fällen nur die Zuordnung einer von mehreren Banden.

In unseren Studien korrelierte die Expression der Spleißformen mit dem Tumorgrad. Während nur 30 % der WTS im Grad I verkürzte *MDM2*-Transkripte exprimierten, so betrug der Anteil bei WTS der Malignitätsgrade II und III jeweils über 60 %¹⁰¹. Obwohl das Vorkommen der Spleißformen mit einem höheren Malignitätsgrad einhergeht, zeigte sich jedoch kein unabhängiger Einfluss auf das Überleben der Patienten. Vergleicht man unsere Ergebnisse mit Daten aus der Literatur (Stand 11/2001), so bestätigt sich, dass *MDM2*-Spleißformen bevorzugt in Tumoren mit einem aggressiveren Phänotyp exprimiert werden. So wurden in 80 % der dedifferenzierten Ovarialkarzinome verkürzte Transkripte gefunden, während nur 37 % der gut differenzierten Ovarialkarzinome davon betroffen waren⁴². Des Weiteren sind in 58 % der Tumoren im Stadium III und IV, aber nur in 22 % der Tumoren im Stadium I und II Spleißformen der *MDM2*-mRNA detektiert worden⁴². Von den ebenfalls von Sigalas *et al.* untersuchten Blasenkarzinomen exprimierten 57 % der invasiv wachsenden Tumoren, aber nur 6 % der oberflächlichen Tumoren Spleißformen⁴².

Zwei Studien, die die Expression von *MDM2*-Spleißvarianten in Mammakarzinomen untersucht haben, kommen zu unterschiedlichen Resultaten. In der Untersuchung von Lukas *et al.* exprimierten von 38 Mammakarzinomen 13 Proben verkürzte Transkripte zusätzlich zur FL-Form¹¹¹. Es zeigte sich kein Einfluss auf das Überleben der Patienten. Unterscheidet man jedoch zwischen der Expression von alternativ und aberrant gespleißten Varianten und setzt voraus, dass die Existenz der alternativ gespleißten Form (in diesem Fall *MDM2*-B) dem „Normalfall“ entspricht und die Expression aberrant gespleißter Varianten tumorspezifisch ist,

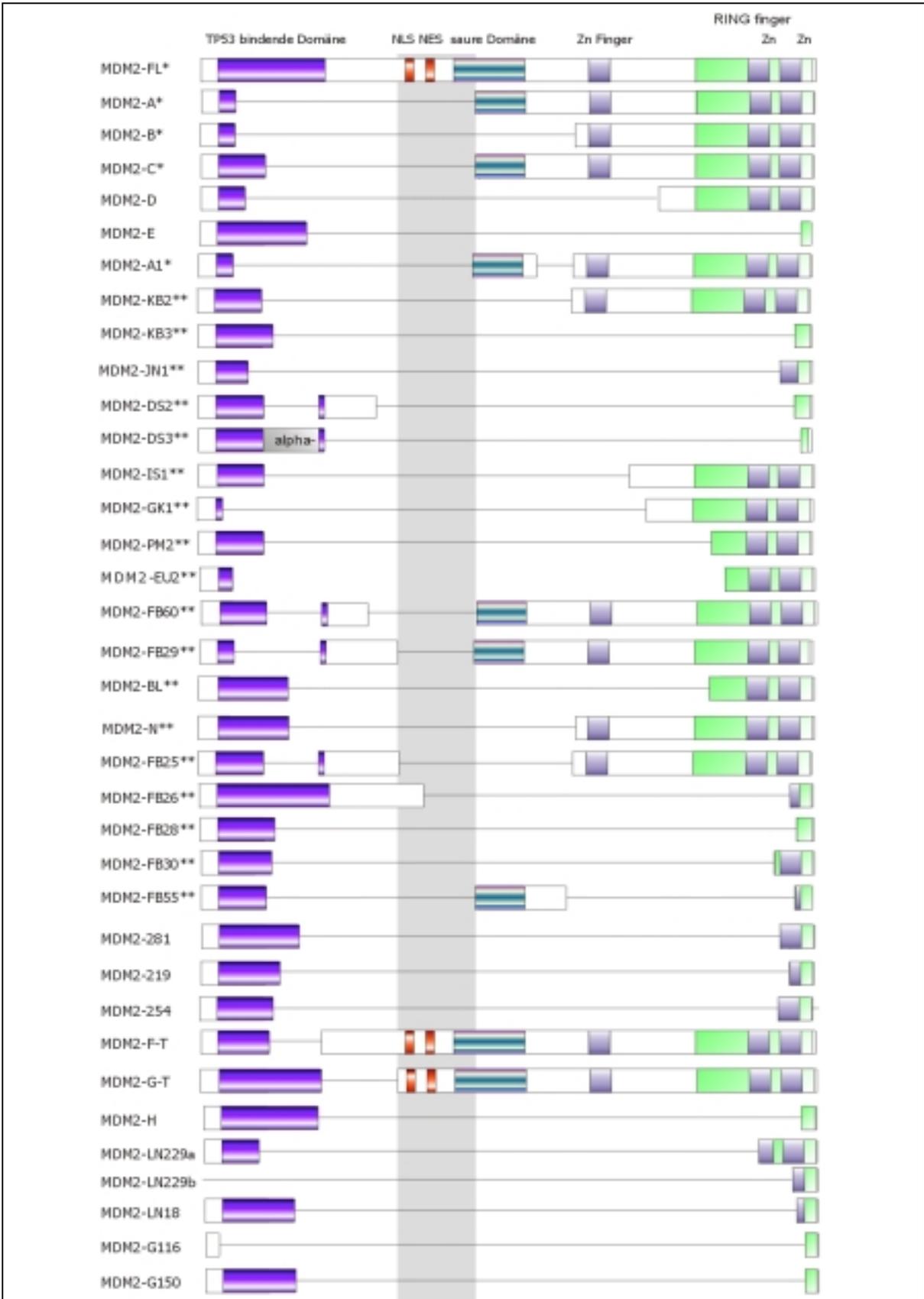


Abb. 5-1: Übersicht über bisher beschriebene Spleißvarianten der *MDM2*-mRNA (11/2001)

Der Bereich, der in nahezu allen Transkripten fehlt, ist grau unterlegt. In diesem Sequenzabschnitt sind u.a. die p300-bindende Domäne, die Kernlokalisations- und die Kernexportsequenz lokalisiert. * - in WTS detektierte Spleißformen, ** - in dieser Arbeit erstmals beschriebene *MDM2*-Spleißvarianten¹⁰¹.

so hat dies einen deutlichen Einfluss auf die Prognose. Patienten mit aberranten Spleißformen haben demnach eine wesentlich schlechtere Prognose als Patienten mit normaler Expression, also alternativ gespleißten Transkripten der *MDM2*-mRNA ($p = 0,009$)¹¹¹. Bei den von uns untersuchten WTS werden ebenfalls die alternativ gespleißten Varianten *MDM2-A* und *MDM2-B* am häufigsten gefunden, während die aberrant gespleißten Formen wesentlich seltener nachgewiesen wurden. Eine zweite Studie von Hori *et al.*¹²⁷ ergab, dass in 48 % der Fälle verkürzte *MDM2*-mRNA-Transkripte nachgewiesen werden konnten. Die Expression der Spleißformen korrelierte signifikant mit dem Befall der Lymphknoten und dem Grad der Nekrotisierung der Mammakarzinome. Weitere Studien befassten sich mit Alterationen der *MDM2*-mRNA-Expression u.a. in Liposarkomen¹¹³, Glioblastomen¹¹², nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen¹¹⁴ sowie Riesenzelltumoren des Knochens¹¹⁵. Übereinstimmend wurde ein Zusammenhang zwischen der Expression von *MDM2*-Spleißvarianten und einem erhöhten Malignitätsgrad gefunden^{112 - 115}.

Bezüglich der Expression der Spleißvariante *MDM2-B* gibt es in der Literatur z.T. widersprüchliche Ergebnisse. Von Lukas *et al.*¹¹¹ wurde postuliert, dass das Vorkommen der alternativ gespleißten Variante *MDM2-B* eher dem „Normalfall“ entspricht, da diese Variante in vier von neun Normalgewebeproben von Mammakarzinom-Patientinnen detektiert worden ist. In den Tumoren wurden hingegen überwiegend aberrant gespleißte Transkripte gefunden, woraus geschlossen wurde, dass aberrantes Spleißen ein tumorspezifisches Phänomen sein könnte. Andererseits zeigten Studien von Evdokiou *et al.*¹¹⁵ in Riesenzelltumoren des Knochens, dass die Variante *MDM2-B* im Wesentlichen von den Stroma-, nicht aber von den Riesenzellen exprimiert wird. Dies wäre im Einklang mit der Hypothese, dass die Stromazellen den malignen Anteil der Riesenzelltumoren darstellen und die Isoform *MDM2-B* unabhängig von TP53 zu einem transformierten Phänotyp beiträgt¹¹⁵. Untersuchungen von Matsumoto *et al.*¹¹² ergaben, dass 50 % der Glioblastome, jedoch nur 18 % der anaplastischen Astrozytome, die *MDM2*-Spleißform B exprimieren. In Astrozytomen wurde nur die FL-Form detektiert. Diese Ergebnisse zeigen einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Expression dieser Spleißform und einem erhöhten Malignitätsgrad¹¹². Bisher unveröffentlichte Daten von S. Jones und Mitarbeitern belegen ebenfalls einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Spleißvariante *MDM2-B* und einem Einfluss auf die Tumorprogression. So konnte diese Spleißform (i.) in verschiedenen WTS aus *TP53*^{-/-}-Mäuse detektiert werden, (ii.) führte die Transfektion von Zelllinien mit einem Plasmid, das die cDNA der Spleißvariante *MDM2-B* enthält, zu einer erhöhten Proliferationsrate dieser Zellen und (iii.) wiesen transgene Mäuse, welche diese Spleißvariante überexprimieren eine stark verkürzte

Lebensdauer und eine Vielzahl von Tumoren auf (Dr. S. Jones, unveröffentlichte Daten, persönliche Mitteilung).

Unsere Ergebnisse zeigten hingegen keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen alternativem bzw. aberrantem Spleißen und einem aggressiverem Phänotyp. Sie deuten vielmehr darauf hin, dass auch die Expression von mRNA-Transkripten, die nicht an regulären Donor-/Akzeptorstellen gespleißt werden, der „normalen“ physiologischen Situation entsprechen. Die von uns in Normalgewebe von Patienten und in peripheren Blutlymphozyten gesunder Spender nachgewiesenen Spleißvarianten *MDM2-N* sowie *MDM2-BL* sind beispielsweise an Sequenzen gespleißt worden, die innerhalb bekannter Exone lokalisiert sind (Bartel *et al.*, Manuskript in Vorbereitung).

Unter „alternativem“ Spleißen versteht man die Bildung verschiedener mRNAs aus einem unreifen prä-mRNA-Transkript, wobei jeweils komplette Exons betroffen sind. Das Spleißen erfolgt an regulären Spleißstellen, den Intron-/Exon-Grenzen. Von vielen Genen ist bekannt, dass durch alternatives Spleißen verschiedene Proteinisoformen gebildet werden können. Ein Beispiel ist das TSG *adenomatöse polyposis coli* (*APC*), das oftmals in frühen Stadien der Karzinogenese des Kolonkarzinoms verändert ist. Das *APC*-Gen wird in verschiedenen Geweben, z.T. mit bzw. ohne das Exon 1 exprimiert, wodurch Proteine entstehen, die unterschiedliche Sequenzen am N-Terminus aufweisen. Die einzelnen, durch alternatives Spleißen entstandenen Proteinisoformen werden sowohl gewebespezifisch als auch als Antwort auf bestimmte Differenzierungssignale exprimiert¹²⁸. Als weiteres Beispiel sei das *CD44*-Gen aufgeführt. Hier führt das alternative Spleißen zur Bildung von heterogenen, zellspezifischen membranständigen Proteoglykanen. Die Heterogenität entsteht durch die unterschiedliche Nutzung der Exone 1 – 10 sowie durch posttranslationale Modifikationen¹²⁹. In einigen Tumorarten kommt es jedoch zu einem „fehlerhaften“ Spleißen, wobei Bereiche der kodierenden Region deletiert sind, die von kurzen, sich wiederholenden Sequenzmotiven flankiert werden^{129, 130}.

Im Gegensatz zum alternativen Spleißen, findet das so genannte aberrante Spleißen nicht an regulären Spleißstellen statt. Die mRNAs der Gene *TSG101* und *FHIT* werden, ähnlich wie bei *MDM2*, sowohl alternativ als auch aberrant gespleißt. Beim *TSG101* nahm man ursprünglich an, dass verkürzte Proteine auf Genmutationen zurückzuführen sind¹³¹, diese sind jedoch vielmehr das Produkt eines aberranten Spleißvorgangs^{132, 133}. Von der mRNA des *FHIT*-Gens sind in diversen Tumorarten sowohl alternative als aberrante Spleißformen nachgewiesen worden^{134 - 136}. Besonders in Tumoren der Lunge findet man mRNA-Spezies mit dem Verlust kompletter Exons, mit Insertionen unbekannter DNA-Sequenzen und dem Verlust von Sequenzen ohne Bezug zu bekannten Spleißstellen¹³⁶. Die beschriebenen Daten für

diese beiden Gene lassen den Schluss zu, dass das alternative Spleißen ein normaler physiologischer Vorgang ist, der nicht notwendigerweise mit der Tumorgenese verbunden sein muss. Im Gegensatz dazu scheint in diesen Fällen vielmehr das aberrante Spleißen der genannten mRNAs mit der Tumorprogression assoziiert zu sein.

Eine Erklärung für den Mechanismus des Spleißens an sich wiederholenden Sequenzmotiven, wie er für die *MDM2*-Spleißvarianten *MDM2*-KB3 (219 bp), *MDM2*-PM2 (393 bp) und *MDM2*-EU2 (297 bp) beschrieben wurde (Kap. 4.1.4, Abb. 4-5), könnten Studien über eine mutierte Form der DNA-Polymerase pol 3-t aus *S. cerevisiae* liefern. Durch eine Mutation im Gen der pol 3-t DNA-Polymerase kam es zu einer ~ 1000-fach häufigeren Deletion von DNA-Fragmenten zwischen Repeat-Sequenzen, vermutlich verursacht durch so genanntes „replication slippage“¹³⁷. Die Frage, ob dies auch in den untersuchten WTS-Proben der Fall ist, beispielsweise durch eine Fehlfunktion der DNA-Polymerase, kann nicht abschließend beantwortet werden. Dazu wäre es erforderlich, die genomische DNA der betreffenden Proben zu analysieren, um derartige Deletionen zu detektieren. Es ist jedoch auch denkbar, dass es bei der Amplifikation der *MDM2*-Genregion in Folge einer fehlerhaften homologen Rekombination zu Verlusten bestimmter Sequenzbereiche kommt. In den WTS, die die Spleißvarianten *MDM2*-KB3 (219 bp), *MDM2*-PM2 (393 bp) und *MDM2*-EU2 (297 bp) exprimieren, liegt das *MDM2*-Gen amplifiziert vor. Während für die *TSG101* und *FHIT*-mRNAs eine Ungenauigkeit der RNA-Polymerase als Ursache für das aberrante Spleißen postuliert wurde¹³², so ist bislang für das *CD44*-Gen bei Schilddrüsen- und Mammakarzinomen das Spleißen zwischen kurzen Repeat-Sequenzen beschrieben worden¹²⁹. Es ist demnach möglich, dass die RNA-Polymerase während der Transkription eine entscheidende Rolle spielt, etwa auf Grund eines bislang noch nicht beschriebenen „transcription slippage“.

Unsere Ergebnisse und die Analyse der Sequenzmotive (Abb.4-5) deuten darauf hin, dass das aberrante Spleißen auf Alterationen des Spleißapparates zurückzuführen ist. Die von uns identifizierten Sequenzmotive (z.B. 5'-TGCCCAGTAT-3') beinhalten potenzielle Spleißdonor- und -akzeptorstellen. Im Falle der Spleißvariante *MDM2*-KB3 könnte die Basenfolge AG-T aus dem ersten Repeat als Donorstelle, und die Sequenz AG-T aus dem zweiten Repeat als Akzeptorstelle fungieren. Sequenzanalysen für eine Reihe von Genen (z.B. *BRCA1*, *RB1*, *NF1*) haben gezeigt, dass sich in den Introns, aber auch in den Exons, eine Vielzahl von potenziellen Spleißstellen und Bindungsstellen für das heterogene nukleäre Ribonukleoprotein A1 (hnRNP A1, eine Komponente des Spleißapparates) befinden¹³⁸. Es konnte gezeigt werden, dass schon geringe Änderungen der Affinität von hnRNP A1 zu den regulären Bindungsstellen zu einem fehlerhaften Ausschneiden von Exons führen können¹³⁸. So kann beispielsweise durch Mutationen die Sekundärstruktur der mRNA beeinflusst werden, wodurch

dann das hnRNP A1-Protein an alternative Sequenzen bindet. Die Folge könnte das alternative und/oder aberrante Spleißen der unreifen mRNA sein. Wie Arbeiten von Metzloff *et al.*¹³⁹ an *Petunia hybrida* zeigten, könnte die Funktion der aberrant gespleißten Transkripte auch im post-transkriptionellen „gene silencing“ liegen. Es konnte nachgewiesen werden, dass es zur Hybridisierung zweier mRNA-Transkripte an komplementären Sequenzabschnitten (wie den Repeat-Sequenzen) kommt. Daraufhin wird die RNA an konservierten Erkennungssequenzen geschnitten, re-polyadenyliert und kann schließlich die Translation der mRNA verhindern¹³⁹.

Die durchgeführten RT-PCR-Analysen erlauben keine Aussagen über die Mengenverhältnisse der Spleißformen zur FL-mRNA. In Northern-Blot-Analysen mit Gesamt-RNA aus fünf RMS-Zelllinien konnte jedoch lediglich das FL-Transkript der *MDM2*-mRNA nachgewiesen werden (Abb. 4-6). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Spleißvarianten wahrscheinlich nur in sehr geringen Konzentrationen vorliegen, so dass sie im Northern Blot nicht detektiert werden können. Das Transkript der *MDM2*-FL-mRNA ist ca. 7 kb groß (Abb. 4-6). Kürzere Transkripte, die zudem nur in sehr geringen Mengen vorkommen, sind somit im Northern Blot selbst dann nicht nachzuweisen, wenn wie bei der Spleißform FB30 aus der Zelllinie Rh18 ein 1189 bp großes Fragment fehlt. Durch die RT-PCR konnten aber sowohl in RMS-Zelllinien als auch in nativen juvenilen kindlichen RMS eindeutig Spleißformen nachgewiesen werden. Unabhängig von der Menge der mRNA einer Spleißvariante werden jedoch die durch die mRNAs kodierte Proteine exprimiert, so dass diese dann im Western Blot nachgewiesen werden können (Abb. 4-6, 4-2). Dies könnte auf eine höhere Halbwertszeit der mRNA bzw. eine erhöhte Translationseffizienz der mRNA-Spleißvarianten zurückzuführen sein. Aus diesem Grund war es erforderlich, einen Assay zur genauen Bestimmung der mRNA-Konzentration der Spleißvarianten zu entwickeln. Dies erfolgte in Zusammenarbeit mit der Fa. Roboscreen (Leipzig) zunächst für die Spleißvariante *MDM2*-B. Die ersten vorläufigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die FL-*MDM2*-mRNA in bis zu 100-fach höherer Menge vorliegt als die mRNA der Variante *MDM2*-B (Bartel *et al.*, Manuskript in Vorbereitung).

Obwohl mittlerweile 39 verschiedene Varianten der *MDM2*-mRNA in einer Vielzahl von Tumorarten identifiziert worden sind (Abb. 5-1), ist es bislang nicht gelungen, den Nachweis zu erbringen, ob die in der RT-PCR detektierten Transkripte auch in ein Protein translatiert werden. Die bisher veröffentlichten Daten beweisen lediglich die Existenz der einzelnen mRNA-Transkripte. Es fehlt jedoch die Identifizierung der verschiedenen Banden, die im Western Blot mit Antikörpern, die gegen *MDM2* gerichtet sind, nachgewiesen wurden. Von einigen Spleißformen ist aber mit Hilfe eines *in vitro* Transkriptions-/Translationssystems gezeigt worden, dass die Umschreibung in ein Protein möglich ist^{42, 114, 115}.

Die Zuordnung einer Spleißform zu einer distinkten Bande im Western Blot gestaltet sich schwierig. Das MDM2-Protein besteht aus 491 Aminosäuren. Das berechnete Molekulargewicht beträgt etwa 54 kDa. In einem denaturierendem Polyacrylamidgel läuft die MDM2-FL-Isoform in Höhe von etwa 90 kDa. Es ist bekannt, dass MDM2 durch Acetylierung (Dr. J. Taplick, persönliche Mitteilung), Ubiquitinylierung¹⁴⁰, Sumoylierung¹⁴¹ und Phosphorylierung^{142 - 145} posttranslational modifiziert werden kann. Die Diskrepanz zwischen dem berechneten und dem Molekulargewicht im Western Blot konnte bisher geklärt werden. Bei der Zelllinie Rh18 kann aber davon ausgegangen werden, dass das Protein mit einer Größe von etwa 20 kDa der Spleißvariante FB30 entspricht (Abb. 4-6).

Zur Beantwortung der Fragestellung, ob und in welchem Umfang die in der RT-PCR nachgewiesenen Spleißformen auch translatiert werden, bieten sich mehrere Lösungsansätze. Es wäre beispielsweise möglich, mit Hilfe des bereits erwähnten gekoppelten Transkriptions-/Translationssystems die cDNAs der einzelnen Spleißformen *in vitro* in Proteine umzuschreiben und im Western Blot zu analysieren. Anschließend könnte ein Größenvergleich zwischen den *in vitro* translatierten Isoformen und distinkten Banden aus Western Blots von Patientenproben Aufschluss über die Existenz der gesuchten MDM2-Isoformen geben. Eine weitere Möglichkeit bietet die direkte Proteinsequenzierung. In diesem Fall schneidet man einzelne Banden nach der Detektion mit einem gegen MDM2 gerichteten Antikörper direkt aus der PVDF-Membran aus und sequenziert das Protein vom C-Terminus aus an. Weiterhin könnte in nachfolgenden Arbeiten eine Analyse der Translationseffizienz der mRNA-Spezies und der Halbwertszeit der MDM2-Isoformen erfolgen. Es ist bekannt, dass sich die von den beiden Promotoren P1 und P2 abstammenden *MDM2*-mRNA-Transkripte sehr stark in ihrer Translationseffizienz unterscheiden⁴⁷. Es wäre in diesem Zusammenhang auch von großer Bedeutung zu klären, von welchem Promotor die Transkripte der Spleißvarianten abstammen.

5.2 „Splice Capture Assay“ (SCA)

In den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten WTS und juvenilen RMS-Proben konnten insgesamt 19 verschiedene Spleißvarianten der *MDM2*-mRNA nachgewiesen werden. Ein großer Teil davon wurde hier erstmals beschrieben¹⁰¹. Es konnte gezeigt werden, dass etwa 60 % der WTS-Proben in der RT-PCR zusätzlich zur Bande, die der *MDM2*-FL-mRNA entspricht, zahlreiche weitere, verkürzte Banden aufwiesen. In 55 % aller WTS gelang es, die Sequenz der Banden aufzuklären und neuen *MDM2*-Spleißvarianten zuzuordnen. Die Sequenzanalyse der aus dem Agarosegel isolierten PCR-Produkte gestaltete sich z.T. recht

schwierig. Es bestand daher die Notwendigkeit, ein Verfahren zu finden, das es ermöglichte, schnell und kostengünstig die Identität der PCR-Produkte ohne Sequenzierung aufzuklären. In der Literatur war zu Beginn der Arbeiten keine derartige Methode beschrieben worden. Daraufhin wurde von uns der so genannte SCA entwickelt. Der SCA gestattet die Isolierung und Identifizierung von neuen und bekannten Spleißformen der *MDM2*-mRNA.

Mit Hilfe des SCA ist es möglich, von bereits bekannten Spleißformen mit geeigneten Restriktionsenzymen zunächst das charakteristische Spaltmuster aufzunehmen. So entsteht eine Art „Fingerabdruck“, durch den jede Form eindeutig identifiziert werden kann. Anschließend erfolgt durch den Vergleich der Spaltmuster von Banden in der RT-PCR mit denen bekannter Spleißformen eine schnelle und einfache Zuordnung der gesuchten Banden. Unsere Ergebnisse zeigen weiterhin, dass der SCA auch zur Charakterisierung neuer, bislang unbekannter Spleißformen dienen kann. Dies ist in Kap. 4.1.7 an Beispiel der *MDM2*-Spleißvariante FB29 dargestellt. Auf Grund der nach dem Restriktionsverdau entstandenen Fragmente war es möglich, erste hypothetische Aussagen über die Struktur der neuen Transkriptvariante zu treffen (Abb. 4-8). Die anschließende Sequenzanalyse konnte diese durch den SCA vorhergesagten Deletionen weitestgehend bestätigen.

Ein zusätzlicher Aspekt des von uns entwickelten SCA ist die Erstellung einer Plasmid-cDNA-Bibliothek der *MDM2*-Spleißvarianten. Nach der Sequenzanalyse können die in den Plasmiden enthaltenen cDNAs leicht und effizient in eine Vielzahl von Vektoren umklontiert werden und stehen so für weitere funktionelle Untersuchungen (Herstellung von GFP-Fusionsproteinen, Expression in eukaryotischen Zellsystemen usw.) zur Verfügung.

Der SCA bietet die Option, mit geringfügigen Modifikationen, zur Analyse von Spleißvarianten zahlreicher weiterer Gene eingesetzt zu werden. In der Literatur sind zahlreiche Beispiele von Genen bekannt, deren Primärtranskripte alternativ oder aberrant gespleißt werden, z.B. Gene der *BAX*-, *BCL-2*-Familie¹⁴⁶, *P73* (Dr. Th. Stiewe, persönliche Mitteilung), *CD44*¹²⁹, *Cyclin E*¹⁴⁷. Es konnte gezeigt werden, dass viele Gene zahlreiche weitere potenzielle Spleißdonor- und -akzeptorstellen in der Genstruktur aufweisen¹³⁸.

5.3 MDM2 – ein Onkogen mit den Eigenschaften eines Tumorsuppressors?

Die überwiegende Anzahl der über 30 bisher (Stand 11/ 2001, Abb. 5-1) nachgewiesenen Transkripte der *MDM2*-mRNA weist Verluste der TP53-bindenden Domäne auf. Die jeweiligen *MDM2*-Isoformen sollten daher die Fähigkeit verloren haben, an TP53 zu binden³⁷ und es inaktivieren zu können³⁸. Von Sigalas *et al.*⁴² konnte durch Bindungsstudien mit *in*

in vitro translatierten Spleißformen und wt-TP53 gezeigt werden, dass die Isoformen MDM2-A, -B, -C und -D nicht mit einem Anti-TP53-Antikörper kopräzipitiert werden können, d.h. dass auf Grund der fehlenden TP53-bindenden Domäne keine Wechselwirkung mit TP53 möglich ist.

Die Variante MDM2-E hingegen, die eine intakte TP53-bindende Domäne aufweist, konnte erwartungsgemäß an TP53 binden⁴². In unseren Studien wurde nur eine Spleißform, *MDM2*-FB26, identifiziert, die ebenfalls keine Deletionen am 5'-Ende der kodierenden Region zeigt (Abb. 5-1). In weiteren Arbeiten müsste das Bindungsverhalten dieser MDM2-Isoform an TP53 im Detail untersucht werden. Allein die Bindung von TP53 an MDM2 ist jedoch nicht ausreichend für die Degradation von TP53. Die Ubiquitylierung von TP53 durch MDM2 findet wahrscheinlich im Zellkern statt, wobei es zu einer Komplexbildung von TP53, MDM2 und p300/CBP kommt⁶⁴. Es wurde angenommen, dass die MDM2-vermittelte, Ubiquitin-abhängige Degradation im Zytoplasma an den 26S-Proteasomen stattfindet¹⁴⁸. Dazu muss der MDM2-TP53-Komplex vom Zellkern in das Zytoplasma transportiert werden, wofür wiederum eine Kernexportsignalsequenz im MDM2-Protein von Bedeutung ist^{149 - 151}. Durch Arbeiten von Moll *et al.* und Stommel *et al.* konnte diese Hypothese widerlegt werden. Die beiden Arbeitsgruppen zeigten unabhängig voneinander, dass der Export in das Zytoplasma des an MDM2 gebundenen TP53 für die Degradation nicht erforderlich ist (Moll *et al.*, Stommel *et al.* unveröffentlichte Ergebnisse, persönliche Mitteilung).

Weitere Daten deuten ebenso auf eine Beteiligung der C-terminalen RING-Finger-Domäne von MDM2 hin. Deletionen bzw. Mutationen in dieser Region schützen TP53 vor dem MDM2-vermittelten Abbau⁴⁴. Wir vermuten, dass die Spleißform *MDM2*-FB26, wie es für die Variante *MDM2*-E bereits nachgewiesen wurde⁴², auf Grund ihrer intakten TP53-bindenden Domäne in der Lage ist, an den Tumorsuppressor zu binden. Es kommt vermutlich jedoch nicht zur Degradation von TP53, da die Bindungsstelle für p300/CBP in beiden MDM2-Isoformen fehlt.

Neue Daten zeigen, dass MDM2-Mutanten, die nicht zur Bindung an p300/CBP fähig sind, TP53 (sowohl wt- als auch mt-TP53) ubiquitylieren, jedoch nicht abbauen können⁶⁹. Die Funktion von p300/CBP besteht demnach darin, eine Plattform zu bilden, um die für die TP53-Ubiquitylierung und -degradation notwendigen katalytischen und regulatorischen Faktoren zusammenzuführen⁶⁴. Es ist daher vorstellbar, dass durch die Bindung von beiden Isoformen MDM2-E und -FB26 an TP53 nicht der Abbau von TP53 vermittelt wird, sondern auf diese Weise einige wichtige Aktivitäten blockiert werden. Dies würde einerseits Funktionen betreffen, die abhängig von der TP53-Transaktivierung sind, aber auch davon unabhängige Aufgaben, z.B. Basen-Exzisions-Reparatur⁵², die DNA-Doppelstrang-Exonuklease-

Aktivität⁵³ und auch bestimmte Wege der Apoptoseinduktion⁵⁴. Der Vergleich der Struktur der in der Literatur und in dieser Arbeit beschriebenen *MDM2*-Spleißvarianten zeigt deutlich, dass in nahezu allen die Sequenz für die p300/CBP-bindende Domäne fehlt (Abb. 5-1). Es ist daher anzunehmen, dass der Verlust der Fähigkeit an p300/CBP zu binden, ein entscheidender Faktor für die onkogenen Eigenschaften der *MDM2*-Spleißformen ist.

Die Hypothese, dass der Verlust der TP53-bindenden Domäne in den Spleißformen zu einer Stabilisierung von wt-TP53 führt, konnte durch unsere Arbeiten bestätigt werden. Es gab in den von uns analysierten WTS eine signifikante Korrelation zwischen dem Vorkommen von *MDM2*-Spleißvarianten und einer Überexpression von TP53 ($p = 0,01$; χ^2 -Test). Dagegen konnte kein Zusammenhang zwischen dem *TP53*-Genstatus und der Proteinstabilität festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Ähnliche Daten wurden auch von Kraus *et al.* für Glioblastome veröffentlicht. In den untersuchten Zelllinien, die ein amplifiziertes *MDM2*-Gen trugen, ist eine Überexpression von TP53 detektiert worden. Dies konnte auf die Expression von *MDM2*-Spleißformen in den betreffenden Zelllinien zurückgeführt werden¹¹⁶.

In vielen *MDM2*-Spleißvarianten ist zusätzlich der Sequenzabschnitt deletiert, der für die Kernlokalisations- und die Kernexportsequenz kodiert. Dies berechtigt zu der Annahme, dass die *MDM2*-Isoformen nicht in den Zellkern transportiert werden können. Wir untersuchten daraufhin die subzelluläre Verteilung der *MDM2*-Immunreaktivität in ausgewählten WTS-Proben, sowohl mit als auch ohne nachgewiesene Spleißformen. Es gelang, in den Proben, die eine *MDM2*-Spleißform exprimieren, mit allen gegen *MDM2* gerichteten AK eine Färbung des Zellkerns und des Zytoplasmas nachzuweisen. Einzig die WTS-Probe, in der keine Spleißvariante in der RT-PCR gefunden wurde, zeigte mit allen AK nur eine sehr schwache Reaktion. Überraschenderweise wurde auch mit den AK 2A10 und C18, die gegen ein Epitop in der sauren Domäne (2A10) bzw. am C-Terminus (C18) gerichtet sind, eine teilweise sehr starke Färbung des Zytoplasmas erzielt. Die Epitope dieser AK sind nur in der FL-Isoform von *MDM2*, nicht aber in den Spleißformen, vorhanden. Bei dem durch diese AK nachgewiesenen Protein handelt es sich daher mit großer Wahrscheinlichkeit um die *MDM2*-FL-Isoform, die entgegen der normalen Verteilung nicht im Zellkern¹¹⁹, sondern im Zytoplasma lokalisiert ist. Arbeiten von Evans *et al.*¹¹⁴ an Lungenkarzinomen zeigten in 25 % der Fälle ebenfalls eine aberrante subzelluläre Verteilung von *MDM2*. Es handelt sich auch hier mit großer Wahrscheinlichkeit um die FL-Isoform, da der verwendete AK, SMP-14, ebenfalls ein Epitop in der sauren Region erkennt, das in den meisten verkürzten Isoformen nicht vorhanden ist. In allen Proben mit einer zytoplasmatischen Lokalisation von *MDM2* konnte in der RT-PCR zusätzlich zur *MDM2*-FL-mRNA auch das Transkript der Variante *MDM2*-B nachgewiesen werden. Bindungsstudien mit den beiden anschließend *in vitro* translatierten Isoformen

MDM2-FL und -B zeigten, dass MDM2-B an das FL-Protein binden kann ¹¹⁴. Evans *et al.* schlussfolgerten, dass durch Bindung an MDM2-B im Zytoplasma eine Translokation von MDM2 in den Zellkern verhindert wird. Durch anschließende Kotransfektionsstudien mit MDM2-FL, MDM2-B und TP53 konnte nachgewiesen werden, dass die durch MDM2 vermittelte Inhibierung der TP53-Transaktivierung durch MDM2-B aufgehoben werden kann. Eine Funktion von MDM2-B könnte demnach die negative Regulation von MDM2 in Bezug auf die Inhibierung der TP53-Aktivität sein. Es ist bislang aber noch nicht geklärt, warum nichtkleinzellige Lungenkarzinome und WTS MDM2-B exprimieren (die Variante *MDM2-B* wurde in den WTS-Proben am häufigsten detektiert). Die Konsequenz daraus sind eine Überexpression von TP53 ¹⁰¹ sowie Wachstumsarrest oder Apoptose. Da die Tumoren jedoch sehr schnell wachsen, müssen noch weitere, MDM2-unabhängige Mechanismen existieren, die an der Inaktivierung der TP53-Funktionen beteiligt sind. Es wäre denkbar, dass Tumorzellen als Folge von bestimmten Wachstumssignalen MDM2-B exprimieren, um TP53 zu aktivieren. Durch Mutationen im *TP53*-Gen bzw. andere Alterationen könnte es anschließend zu einer Fehlfunktion von TP53 kommen. Es ist daher von großem Interesse, die Faktoren zu identifizieren, die zur Expression von MDM2-B und selbstverständlich auch der anderen Spleißformen beitragen. Im Widerspruch zu den Daten von Evans *et al.* stehen Befunde von Evdokiou und Mitarbeitern, die eine ausschließlich nukleäre Verteilung eines MDM2-B-GFP-Fusionsprotein in 293-Zellen gefunden haben ¹¹⁵. In fortführenden Arbeiten ist geplant, die zelluläre Verteilung und die Funktion der MDM2-Isoformen in WTS-Zelllinien mit unterschiedlichem *TP53*-Genstatus zu untersuchen.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von MDM2 zur Transformation von Fibroblasten führt und in Mäusen Tumorwachstum auslösen kann ³⁶. Das weitgehende Fehlen von Mutationen des *MDM2*-Gens und die Fähigkeit, den Tumorsuppressor TP53 zu inakti-

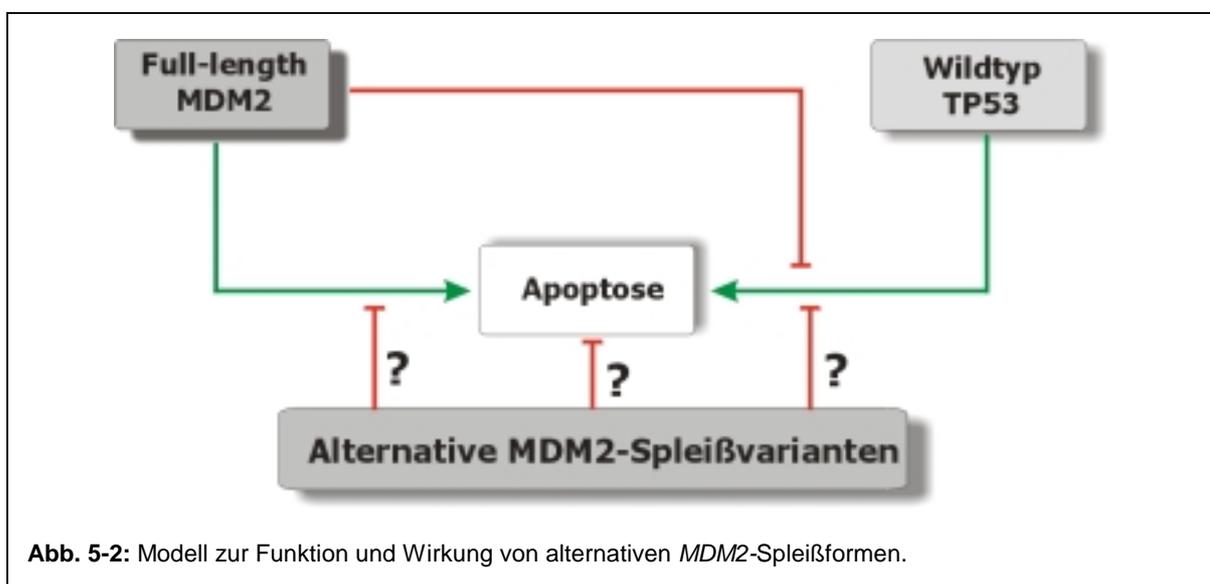


Abb. 5-2: Modell zur Funktion und Wirkung von alternativen *MDM2*-Spleißformen.

vieren, sind Belege für die onkogenen Eigenschaften von MDM2. Daten unserer Arbeitsgruppe, wonach die gemeinsame Überexpression von MDM2, detektiert mit einem C-terminalen AK, und TP53 mit einer schlechten Prognose für WTS-Patienten verbunden ist^{30, 31}, lieferten weitere Beweise für das onkogene Potenzial von MDM2. Der Einfluss der MDM2-Überexpression war jedoch stark vom verwendeten AK abhängig³⁰. Es ist möglich, dass durch die verwendeten AK sowohl MDM2 als auch Isoformen detektiert worden sind, die u.U. das Tumorentwicklung beeinflussen können. Aus der vorliegenden Arbeit und den Daten von Kraus *et al.* geht eindeutig hervor, dass die Expression von *MDM2*-Spleißformen auch bei einer Amplifikation des *MDM2*-Gens und einer erhöhten MDM2-Proteinmenge zu einer Stabilisierung von wt-TP53 beiträgt^{101, 116}. Dies könnte auch die gleichzeitige Überexpression von MDM2 und TP53 und den negativen Einfluss auf die Prognose von WTS-Patienten zumindest partiell erklären.

Über Mutationen des *MDM2*-Gens, die eine erhöhte Stabilität des MDM2-Proteins erklären könnten, ist wenig bekannt. Von Schlott *et al.* wurden Punktmutationen in der Zn-Finger-Region von MDM2 beschrieben¹⁰². Arbeiten von Tamborini *et al.* an Liposarkomen zeigten erstmals auch Mutationen des *MDM2*-Gens außerhalb der Zn-Finger Regionen¹¹³. Diese Mutationen führen häufig zu Aminosäureaustauschen und bewirken u.U. eine verminderte Fähigkeit an TP53 zu binden. Die bisher im *MDM2*-Gen gefundenen Mutationen, die die Wechselwirkung von MDM2 mit TP53 beeinflussen, lassen sich demnach in zwei Klassen einteilen: Mutationen, die (i.) die Sekundärstruktur verändern (z.B. die Aminosäurereste D68 und C77) und (ii.) die den Austausch von Aminosäuren betreffen, die in direktem Kontakt mit TP53 stehen¹⁵².

Im Widerspruch zu den immunhistochemisch gewonnenen Daten, wonach eine MDM2-Überexpression in WTS mit einer schlechten Prognose verbunden ist, stehen Befunde zum Einfluss der *MDM2*-mRNA-Menge auf das Tumorverhalten. Daten für mehrere Tumorarten, wie auch für WTS, belegen, dass verminderte *MDM2*-mRNA-Transkriptlevel mit einem höheren Tumorgrad und einer ungünstigen Prognose für die Patienten verbunden sind^{33, 34, 70, 71}. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass eine leicht erhöhte *MDM2*-mRNA-Menge eher dem physiologischen Normalzustand entspricht, und MDM2 so seine Funktionen, wie z.B. die Regulierung der TP53-Menge, erfüllen kann. Demzufolge kann eine veränderte *MDM2*-mRNA-Expression (erhöht oder vermindert) als Ausdruck einer biologisch relevanten Fehlregulation aufgefasst werden.

In weiteren Untersuchungen an NIH-3T3-Zellen konnte gezeigt werden, dass MDM2 in der Lage ist, den Zellzyklus beim Übergang von der G1- in die S-Phase zu arretieren⁷². In der MDM2-Proteinsequenz sind zwei wachstumshemmende Domänen (ID) identifiziert wor-

den, durch deren Entfernung der Zellzyklusarrest wieder aufgehoben werden konnte⁷². In diesem Zusammenhang ist eine Beobachtung interessant, wonach es sehr schwierig ist, Zelllinien (speziell mit wt-TP53) stabil mit FL-MDM2 zu transfizieren⁴⁴ (Dr. L. Harris, persönl. Mitteilung). Eigene Versuche, die RMS-Zelllinie RD und Fibroblasten mit einem Plasmid für ein MDM2-FL-GFP-Fusionsprotein zu transfizieren, waren bisher erfolglos. Die Transfektion resultierte in einem stark verlangsamten Zellwachstum und führte bereits nach wenigen Tagen zum Absterben der Zellen (Bartel *et al.*, unveröffentlichte Ergebnisse).

Von verschiedenen Arbeitsgruppen konnte unabhängig voneinander gezeigt werden, dass MDM2 in der Lage ist, spontane Apoptose auszulösen^{73,74} (Prof. M. Oren, persönl. Mitteilung). Werden die Zellen jedoch mit einem Plasmid transfiziert, das die cDNA für die Spleißvariante *MDM2-C* enthält, kommt es nicht zum Absterben der Zellen durch Apoptose (Dr. L. Harris, persönl. Mitteilung). In einem *in vitro*-Assay zeigte sich zudem, dass die von Sigalas *et al.*⁴² beschriebenen Isoformen (*MDM2-A*, -B, -C, -D und -E) in der Lage sind, Fibroblastenzellen zu transformieren.

Das von uns aus den gewonnenen Daten abgeleitete Modell geht davon aus, dass das MDM2-Protein in Bezug auf die Apoptose zwei entgegengesetzte Funktionen beinhaltet (Abb. 5-2). Auf der einen Seite kontrolliert MDM2 über die durch Ubiquitynylierung initiierte Degradation von TP53 die Proteinmenge von TP53 und hemmt dadurch die TP53-abhängigen Aktivitäten der Apoptose und des Zellzyklusarrests. Andererseits kann MDM2 aber auch selbst unter noch nicht aufgeklärten Umständen spontane Apoptose auslösen. Wir vermuten, dass die Spleißvarianten von MDM2 das in Normalzellen fein regulierte Gleichgewicht zwischen MDM2 und TP53 stören und damit zur Tumorentwicklung beitragen. Die MDM2-Isoformen könnten, wie von Evans *et al.* postuliert, ein weiterer Mechanismus zur Regulierung des TP53-MDM2-Feedback-Loops sein¹¹⁴. Dies wird durch die Existenz von *MDM2*-Spleißformen im Normalgewebe und in Lymphozyten untermauert (Kap. 4.1.3).

Viele MDM2-Isoformen sind auf Grund von weitreichenden Deletionen nicht mehr in der Lage, mit einer Reihe von Proteinen in Wechselwirkung zu treten (z.B. TP53, p300/CBP u.a.). Durch die Verschiebung des offenen Leserahmens in Folge des Spleißens bei einigen Varianten kommt es zu einer veränderten Primär- und Sekundärstruktur am C-Terminus. Möglicherweise erwirbt die MDM2-Isoform dadurch neue, bislang unbekannte Funktionen. Diese könnten beispielsweise für den onkogenen, transformierenden Einfluss der verkürzten MDM2-Varianten verantwortlich sein.

5.4 Molekulare Prognosefaktoren für WTS

Die Charakterisierung von MDM2 in WTS umfasste neben der Detektion von Spleißformen der *MDM2*-mRNA auch die Analyse des Amplifikationsstatus des *MDM2*-Gens sowie der MDM2-Proteinexpression. Neben TP53 und MDM2 weist der *p16^{INK4A}/p14ARF*-Genlocus die häufigsten Veränderungen in Tumoren auf. Daher untersuchten wir auch die p14ARF-mRNA und -Proteinexpression in unseren WTS-Proben. Anschließend wurden die molekularen mit klinischen Daten korreliert, um zu prüfen, ob diese einen Einfluss auf das Tumorverhalten haben und eventuell als neue unabhängige Prognosefaktoren für WTS dienen können.

In unseren Untersuchungen haben wir die Amplifikation in 75 WTS-Proben mit Hilfe einer semiquantitativen Multiplex-PCR analysiert. Die stärkste Amplifikation in einer WTS-Probe betrug etwa das 12-fache der Kopienzahl des Kontrollgens. Die meisten Proben wiesen eine 3 – 10-fache Amplifikation des *MDM2*-Gens auf. Insgesamt konnte in 28 % (21 von 75) der untersuchten WTS-Proben eine Amplifikation des *MDM2*-Gens detektiert werden¹⁰¹. Dieser Wert ist etwas höher als die für WTS in einer *MDM2*-Amplifikationsdatenbank publizierten Daten²⁰. Dort wird eine durchschnittliche Amplifikationsfrequenz von 20 % für WTS angegeben^{26, 28, 29, 153 - 159}, wobei die einzelnen Werte von 4,5 % bis zu 32 % reichen. Cordon-Cardo *et al.*²⁹, die ein Kollektiv von 73 WTS-Patienten auf eine *MDM2*-Genamplifikation hin untersucht haben, fanden eine Rate von 15 % positiven Fällen, Florenes *et al.*²⁶, die insgesamt 97 WTS verschiedener Subtypen analysiert haben, berichten über eine Rate von 10 %. Diese Unterschiede lassen sich möglicherweise auf die histologische Heterogenität und den differierenden Anteil der Tumoren in den einzelnen Malignitätsgraden der untersuchten WTS-Patientenkollektive zurückführen. In unseren Untersuchungen war beispielsweise der *MDM2*-Genlocus in 36 % der Liposakome amplifiziert, das ist etwas höher als der in der Literatur angegebene Wert von 29 %^{26, 28, 39, 155, 157}. Der Anteil an MFH mit einem amplifiziertem *MDM2*-Gen von 7 % in unseren Untersuchungen war dagegen wesentlich geringer als in früheren Untersuchungen, in denen etwa 20 % der MFH positiv für die *MDM2*-Genamplifikation waren^{26, 39, 155, 156, 159}. Die Tatsache, dass in den 4 analysierten RMS keine Amplifikation detektiert worden ist, stimmt mit Daten von Taylor *et al.*⁹⁴ überein, die in nur 2 von 20 juvenilen RMS ein amplifiziertes *MDM2*-Gen gefunden haben. Für die weiteren Sarkomentitäten sind keine Vergleichswerte aus Literatur bekannt.

Interessanterweise war die Amplifikation des *MDM2*-Gens mit einem geringeren Tumorgrad verbunden. Während in 58 % der Grad I Tumoren eine Amplifikation aufwiesen, so waren dies nur 15 % der WTS mit dem Tumorgrad II und III ($p = 0,001$; χ^2 -Test). Ähn-

liche Befunde wurden von Nakayama *et al.*¹⁵⁵ sowie von Nilbert *et al.*¹⁵⁶ beschrieben. Die beiden Arbeitsgruppen konnten in benignen Lipomen und in Liposarkomen eine Amplifikationsfrequenz von 30 % nachweisen. In einer multivariaten Cox-Regression erwies sich die Amplifikation des *MDM2*-Gen als unabhängiger prognostischer Faktor für WTS (RR=4,4; $p = 0,17$). Die durchschnittliche Überlebenszeit für WTS-Patienten mit einem amplifizierten *MDM2*-Gen betrug 87 Monate, verglichen mit 40 Monaten für Patienten, deren WTS keine Genamplifikation trägt¹⁰¹.

Die Amplifikation des *MDM2*-Gens war in unseren Untersuchungen sehr stark mit einer hohen *MDM2*-mRNA-Expression verbunden ($p = 0,005$; χ^2 -Test). In den von Florenes *et al.* untersuchten WTS, die ein amplifiziertes *MDM2*-Gen trugen, wiesen alle stark erhöhte *MDM2*-mRNA-Mengen auf²⁶. Da jedoch ebenfalls in Proben ohne Genamplifikation hohe mRNA-Level detektiert wurden, ist anzunehmen, dass noch weitere Mechanismen zu einer verstärkten *MDM2*-mRNA-Expression beitragen. In früheren Arbeiten konnten wir zeigen, dass moderat erhöhte *MDM2*-mRNA-Mengen ebenfalls mit einer guten Prognose für WTS-Patienten korrelieren³³. Der Befund, dass nachweisbare *MDM2*-mRNA-Mengen mit einer guten Prognose für die Patienten verbunden sind, konnte durch andere Arbeitsgruppen unabhängig voneinander an Ovarialkarzinomen⁷⁰ und Lungenkarzinomen⁷¹ bestätigt werden. In diesen Arbeiten wurden jedoch keine Angaben zum Amplifikationsstatus des *MDM2*-Gens gemacht.

Um die Frage zu klären, ob es einen Zusammenhang zwischen der *MDM2*-Genamplifikation, der *MDM2*-mRNA- und der MDM2-Proteinexpression gibt, wurde die Expression von MDM2 im Western Blot untersucht. Es stellte sich heraus, dass weder die Amplifikation, noch die mRNA-Menge mit der im Western Blot detektierten MDM2-Proteinmenge korreliert. Im Gegensatz zu den Daten, die auf immunhistochemischen Untersuchungen beruhen^{30, 31}, konnte kein Einfluss der MDM2-Proteinmenge im Western Blot auf das Tumorverhalten oder die Prognose festgestellt werden. Die Ursache könnten, wie bereits erwähnt, die verschiedenen gegen MDM2 gerichteten AK und in der Tatsache liegen, dass in der Immunhistochemie nur ein qualitativer Nachweis der MDM2-Expression erfolgt. In Studien von Rieske *et al.* konnte nur in 8 von 17 WTS mit einer *MDM2*-Amplifikation auch eine MDM2-Expression immunhistochemisch nachgewiesen werden¹⁶⁰. Im Gegensatz dazu wurde nur in einem geringen Prozentsatz der Fälle mit einer MDM2-Proteinexpression gleichzeitig eine Genamplifikation gefunden¹⁶⁰. Ähnliche Ergebnisse wurden auch von Cordon-Cardo *et al.* berichtet, wobei hier nur in 6 von 17 *MDM2*-amplifizierten WTS eine MDM2-Immunreaktivität detektiert werden konnte²⁹. Eine Erklärung konnte bislang nicht gefunden. Es ist jedoch vorstellbar, dass es durch die Genamplifikation zu (mitunter sehr geringen)

Deletionen im *MDM2*-Gen kommt¹¹³. Dies kann jedoch Auswirkungen auf die MDM2-Proteinsequenz bzw. –konformation haben, so dass diese Proteine nicht mehr von den eingesetzten Antikörpern nachgewiesen werden können. In Studien unserer Arbeitsgruppe zeigte sich, dass die prognostische Aussagekraft der MDM2-Überexpression sehr stark vom verwendeten Antikörper abhängig war^{30, 31}. Des Weiteren könnte die Expression von *MDM2*-Spleißvarianten mit einer unterschiedlichen Translationseffizienz für diese Diskrepanz zwischen *MDM2*-Genamplifikation auf der einen und MDM2-Proteinexpression auf der anderen Seite verantwortlich sein¹²³.

Die Komplexität des Einflusses von Alterationen des *MDM2*-Gen- und –Proteinexpressionsstatus zeigen neue Arbeiten von Millon *et al.*³⁴, Higashiyama *et al.*¹⁶¹ und Polsky *et al.*¹⁶². Von Millon *et al.* wurden 65 Tumoren der Kopf-/Halsregion untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass nur 7 % der Fälle ein amplifiziertes *MDM2*-Gen besaßen und für 9 % eine mRNA-Überexpression nachgewiesen wurde³⁴. Bei 47 % der Tumoren und im angrenzenden Normalgewebe war eine MDM2-Immunreaktivität nachweisbar. Die *MDM2*-mRNA-Menge war in den Tumoren im Vergleich zum Normalgewebe deutlich reduziert, was hauptsächlich auf eine Verminderung der vom TP53-sensitiven P2-Promotor abstammenden Transkripte zurückzuführen ist. In diesen Untersuchungen gab es eine signifikante Korrelation zwischen dem *TP53*-Mutationsstatus und einer verringerten *MDM2*-mRNA- und Proteinexpression. Bemerkenswert ist der Befund, dass eine geringe MDM2-Proteinexpression (in Folge einer *TP53*-Mutation) signifikant mit einem höheren Tumorgrad und einer kürzeren mittleren Überlebenszeit verbunden war³⁴. In nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen konnte von Higashiyama *et al.* ein Anteil von 7 % an Proben mit einem amplifizierten *MDM2*-Gen ermittelt werden¹⁶². Patienten mit einer MDM2-Proteinexpression (24 %) hatten eine bessere Prognose als Patienten ohne nachweisbare Immunreaktivität. Demgegenüber wiesen Polsky *et al.* in Melanomen nach, dass die MDM2-Proteinüberexpression mit der Tumorgenese dieser Tumorart verbunden ist¹⁶¹. Der höchste Anteil einer MDM2-Überexpression wurde in invasiven und metastasierenden Melanomen gefunden. Die erhöhte Expression von MDM2 war auch in dieser Untersuchung unabhängig von der Amplifikation des *MDM2*-Gens. Ein amplifiziertes *MDM2*-Gen konnte nur in 1 % der Melanomproben detektiert werden¹⁶¹.

Neben TP53 und MDM2 weist der *p16^{INK4A}/p14ARF*-Genlocus die häufigsten Veränderungen in Tumoren auf. P14ARF, ein Produkt eines alternativen Leserahmens des *p16^{INK4A}*-Tumorsuppressorgens¹⁶³, kann an MDM2 binden und auf diese Weise die MDM2-vermittelte Inhibierung der TP53-Aktivität verhindern⁶². Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe an WTS zeigten hinsichtlich des Mutationsstatus des *p16^{INK4A}*-Genlocus keine Auffälligkeiten^{110, 164}. Es lagen jedoch bislang keine Daten zur Expression des TSG *p14ARF* in WTS vor. In 14 %

(8 von 57) der WTS-Proben konnte kein Transkript der *p14ARF*-mRNA nachgewiesen werden. Bemerkenswert war die Tatsache, dass alle Tumoren im Stadium I, aber nur 40 % der Tumoren im Stadium IV die *p14ARF*-mRNA exprimierten ($p = 0,007$; χ^2 -Test). Außerdem konnte gezeigt werden, dass der Verlust der *p14ARF*-mRNA-Expression mit einer signifikant kürzeren mittleren Überlebenszeit der Patienten verbunden ist ($p = 0,0001$; χ^2 -Test, Bartel *et al.*, Manuskript in Vorbereitung). Da in WTS keine Mutationen bzw. Deletionen des *INK4A*-Genlocus nachweisbar war¹⁶⁴, könnte die Promotorhypermethylierung¹⁶⁴ die Ursache für die fehlende *p14ARF*-mRNA-Expression in den WTS-Proben sein. Für WTS liegen jedoch noch keine Daten über den Methylierungsstatus des *p14ARF*-Promotors vor. In weiteren Untersuchungen sollte daher geprüft werden, ob das „silencing“ des *p14ARF*-Gens in WTS mit der Promotorhypermethylierung korreliert. In nur zwei WTS-Proben konnte sowohl der Verlust der *p14ARF*-mRNA-Expression als auch die Amplifikation des *MDM2*-Gens nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass Alterationen von *p14ARF* und *MDM2* in WTS nur selten simultan auftreten.

Unsere Ergebnisse zeigen die prognostische Wertigkeit von Alterationen des komplexen *p14ARF*-TP53-*MDM2*-Feedback-Loops in WTS. Die Amplifikation des *MDM2*-Gens war ebenso wie eine erhöhte *MDM2*-mRNA-Expression³³ mit einer guten Prognose für WTS-Patienten verbunden. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Expression von Spleißvarianten der *MDM2*-mRNA häufiger in WTS mit einem höheren Malignitätsgrad auftritt. Der Einfluss auf die Prognose und die mittlere Überlebenszeit von WTS-Patienten war statistisch jedoch nicht signifikant. Der Verlust der *p14ARF*-mRNA- und Proteinexpression kommt in WTS vergleichsweise selten vor, ist aber mit einer stark verkürzten Überlebenszeit verbunden. Das Fehlen der *p14ARF*-mRNA-Expression erwies sich als negativer, unabhängiger Prognosefaktor für WTS (Bartel *et al.*, Manuskript in Vorbereitung).

5.5 *MDM2* als Ziel einer Gentherapie für WTS

In dieser Arbeit wurde erstmalig die Wirkung von *MDM2*-AS-ODNs auf WTS *in vivo* untersucht. Dazu wurden verschiedene AS-ODNs, die gegen die *MDM2*-mRNA gerichtet waren, in einem humanen Xenotransplantatmodell im Peritoneum von Nacktratten getestet. Die Grundlage unseres klinisch-relevanten Modells sind abdominale und intraperitoneale WTS, die durch konventionelle Therapieformen (chirurgische Eingriffe, Strahlen- und Chemotherapie) schwierig zu behandeln sind. Die peritoneale Tumoraussaat hat auch ohne das Auftreten von Fernmetastasen einen limitierenden Einfluss auf die Prognose. Daher ist es notwendig, alternative Therapiekonzepte, wie z.B. Antisense-Therapien gegen das *MDM2*-Onkogen, für diese WTS zu entwickeln.

Mehrere Arbeitsgruppen haben postuliert, dass die Reduzierung der MDM2-Proteinmenge, vor allem in Tumoren mit einer Überexpression von MDM2, vorteilhaft für die Behandlung dieser Tumoren sein könnte, und haben an einer Vielzahl von Zelllinien *in vitro* die Wirksamkeit eines *MDM2*-AS Therapiekonzeptes nachweisen können^{87, 166 - 169}. Erste Studien zur Behandlung von WTS mittels *MDM2*-AS-ODNs wurden von Meye *et al.*⁸⁷ an der *MDM2*-überexprimierenden Zelllinie US8-93 durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die als Lipidkomplexe applizierten *MDM2*-AS-ODNs sowohl die *MDM2*-Proteinexpression reduzieren als auch das klonogene Überleben der WTS-Zelllinie stark hemmen konnten. Im Vergleich mit der parallel behandelten Sense-Kontrolle wurde die Zellkoloniebildungsrate um bis zu 80 % reduziert ($p = 0.002$, Student t-Test). Der Einsatz einer neuen Generation von AS-ODNs, den so genannten „mixed backbone ODNs“ (MBO), bewirkte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine deutliche Reduzierung der *MDM2*-Proteinexpression^{89, 90}. Damit waren spezifische antitumorale Effekte der *MDM2*-AS-MBOs verbunden. Weitere Aspekte der MBOs sind die erhöhte Stabilität und dass sie im Vergleich zu herkömmlichen ODNs, *in vivo* wesentlich weniger Nebenwirkungen aufweisen^{170, 171}.

In unseren Untersuchungen konnten wir in den Tieren, die mit verschiedenen Dosen an *MDM2*-AS-ONDs (100 bzw. 200 μg) behandelt wurden, im Vergleich zu den Kontrollgruppen, die mit SE-ONDs bzw. mit physiologischer Kochsalzlösung behandelt worden sind, eine signifikante Reduzierung der Tumormasse und der Tumorzahl nachweisen. Dies stimmt mit Ergebnissen anderer Autoren überein, die ebenfalls über eine Verringerung der Tumorgroße, ein verzögertes Tumorstadium und eine längere Lebensdauer von Mäusen berichten, die

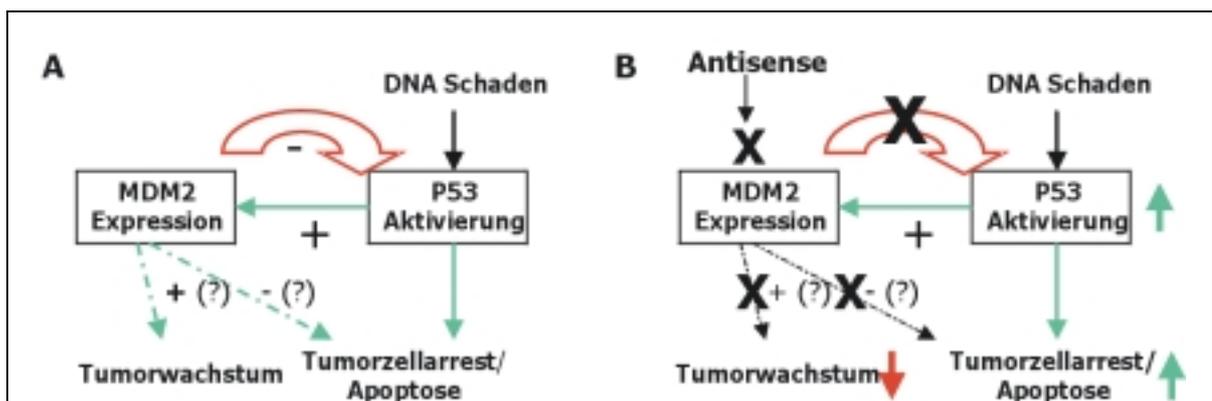


Abb. 5-3: Die *MDM2*-TP53-Interaktion als Ziel einer therapeutischen Intervention (nach Wang *et al.*⁹⁰)

A. *MDM2* ist ein negativer Regulator der TP53-Funktion. TP53 induziert die *MDM2*-Expression, z.B. nach einem DNA-Schaden. *MDM2* wiederum inhibiert die Aktivitäten von TP53 durch Komplexbildung und den Abbau von TP53. Des Weiteren kann eine Überexpression von *MDM2* unabhängig von TP53 zur Progression des Zellzyklus, und damit zum Tumorstadium, führen. **B.** Der postulierte Mechanismus einer *MDM2*-AS-Therapie. Die Inhibierung der *MDM2*-Expression führt zu einem Anstieg an freiem, und damit funktionell aktivem TP53 in der Zelle. Durch die TP53-Aktivität kommt es zur Auslösung der Apoptose oder zum Zellzyklusarrest. Es wird weiterhin angenommen, dass durch die Reduzierung der *MDM2*-Proteinmenge in der Zelle die TP53-unabhängigen Funktionen von *MDM2* in Bezug auf das Tumorstadium inhibiert werden.

mit *MDM2*-AS-ONDs behandelt wurden^{89, 90}. Eine Reduzierung der Tumorzahl dagegen ist von uns erstmals beobachtet worden (Würl, P. und Bartel, F., Manuskript eingereicht).

Eine genaue Erklärung für die antitumorale Wirkung von *MDM2*-AS-ONDs in Folge der Reduzierung der MDM2-Proteinmenge konnte bislang nicht gefunden werden (Abb. 5-3). Es ist jedoch vorstellbar, dass dadurch auch die TP53-unabhängigen Aktivitäten in Bezug auf die Tumorentwicklung und –progression von MDM2 inhibiert werden. In vielen Tumoren mit einem wt-*TP53*-Gen führt die Verringerung von MDM2 zu einer Erhöhung der TP53-Proteinmenge und anschließend zu Wachstumsarrest und Apoptose⁸⁵. Die Annahme, dass *MDM2*-AS-ONDs nur in Zellen mit wt-TP53 wirksam sind, konnte bislang nur für B-Zell-Lymphom-Zelllinien¹⁶⁸, jedoch nicht für andere untersuchte Zellen¹⁶⁷, eindeutig bestätigt werden. Studien von Chen *et al.*⁸⁵ an drei Zelllinien mit wt-*TP53*-Genstatus zeigen wiederum, dass es nach Behandlung mit *MDM2*-AS-ONDs neben einer deutlichen, dosisabhängigen Reduzierung der MDM2-Proteinmenge zusätzlich zu einer 6-fachen Steigerung der WAF-1-Expression kommt (jedoch nicht in einer als Kontrolle mitgeführten *TP53*-defizienten Zelllinie). Die beobachteten Effekte deuten eindeutig auf eine durch die *MDM2*-AS-Behandlung hervorgerufene TP53-Transaktivierung hin. Auf Grund der Reduzierung der MDM2-Proteinmenge steigt der Anteil an freiem (und somit funktionellem) TP53-Protein, da dieses nicht mehr durch MDM2 komplexiert und zur Ubiquitylierung markiert werden kann. Chen *et al.*⁸⁵ beobachteten in den behandelten Zellen auch eine Apoptoserate von bis zu 80 % nach 24 h, die durch die Aktivierung von TP53 erklärt werden kann.

Es ist jedoch auch denkbar, dass die Behandlung von Tumorzellen mit *MDM2*-AS-ONDs nicht nur den TP53-MDM2-Feedback-Loop stört (Abb. 5-3), sondern auch die TP53-unabhängigen, wachstumsfördernden Aktivitäten von MDM2 *in vivo* inhibiert. Aus der Literatur ist bekannt, dass MDM2 auch unabhängig vom *TP53*-Genstatus onkogene Eigenschaften besitzt:

- Es gibt Hinweise auf einen transformierten Phänotyp von Tumorzellen in Abwesenheit von TP53¹⁷² und ebenso auf Grund der Expression alternativer Spleißvarianten von MDM2, die nicht in der Lage sind, an TP53 zu binden⁴².
- Die Überexpression von MDM2 führt im Mausmodell zur Tumorentwicklung von *TP53*^{-/-} Epithelzellen¹⁷³, und TP53-knock-out-Mäuse entwickeln überdurchschnittlich häufig Sarkome¹⁷⁴.
- MDM2 kann unabhängig von TP53 an das Rb-Protein sowie die Transkriptionsfaktoren E2F1 und DP1 binden. So kommt es zur Expression von E2F1-abhängigen Genen und nachfolgend zu einer Progression des Zellzyklus von der G₁- zur S-Phase^{58, 59}.

- MDM2 bildet ebenso mit p73, einem Mitglied der TP53-Familie, Komplexe, und kann so dessen Funktionen inhibieren (z.B. die Induktion der Apoptose) ¹⁷⁵.
- Viele WTS weisen neben einer Mutation des *TP53*-Gens eine Überexpression von MDM2 auf, woraus geschlossen werden kann, dass beide Proteine über voneinander unabhängige Mechanismen zur Tumorprogression beitragen ^{29, 30, 176, 177}.
- Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass durch die Behandlung von WTS-Xenotransplantattumoren mit *MDM2*-AS-ODNs auch ohne ein funktionelles TP53 die Tumormasse und die Anzahl der gebildeten Tumoren signifikant reduziert werden können. Alle bisher in der Literatur beschriebenen *in vivo* Studien mit *MDM2*-AS-ODNs wurden mit Xenotransplantaten von Zelllinien durchgeführt, die ein wt-*TP53*-Gen trugen. In unserer Arbeit ist erstmalig eine Zelllinie (RD) mit einem mutierten *TP53*-Genstatus für die Untersuchungen verwendet worden.

Die Gesamtmenge an *MDM2*-AS-ODNs, die pro Tier in den Studien von Wang *et al.* ⁹⁰ und Tortora *et al.* ⁸⁹ eingesetzt wurden, betrug etwa 3 mg. In unseren Versuchen konnten die beschriebenen Effekte (Reduzierung der Tumorgroße und -zahl) mit deutlich geringeren Dosen (100 bzw. 200 µg je Tier für eine Woche) erzielt werden. Eine Erklärung könnte die Form der Applikation der AS-ODNs sein. Während die ODNs in den Studien von Wang *et al.* ⁹⁰ und Tortora *et al.* ⁸⁹ einmal täglich intratumoral injiziert wurden, verwendeten wir osmotische Minipumpen der Fa. Alzet[®]. Diese Pumpen gewährleisteten eine kontinuierliche Abgabe der *MDM2*-AS-ODNs über einen definierten Zeitraum und scheinen daher pharmakokinetisch vorteilhafter zu sein.

In immunhistochemischen Analysen konnte erwartungsgemäß die verringerte MDM2-Expression nach der Behandlung der Tumoren mit *MDM2*-AS-ODNs im Vergleich zu den Kontrollgruppen nachgewiesen werden. Dieser Effekt war in den Western Blots nach der densitometrischen Auswertung der Bandenintensitäten noch weitaus deutlicher. Der IHC-Nachweis der MDM2-Expression gelang in den Kontrollgruppen jedoch nur mit einem C-terminalen AK, während mit einem N-terminalen AK weder in der Positivkontrolle noch in den Tumoren der einzelnen Behandlungsgruppen eine MDM2-Immunreaktivität nachgewiesen werden konnte. Dies stimmt mit Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe überein, wonach nur der MDM2-Nachweis mit einem gegen ein C-terminales Epitop gerichteten AK mit der Prognose von WTS-Patienten korreliert ³¹. Des Weiteren konnte von Schlott *et al.* ein C-terminales Fragment des MDM2-Proteins ausschließlich auf der Oberfläche von Tumorzellen nachgewiesen werden ¹⁷⁸. Dies könnte ebenfalls darauf hindeuten, dass der C-Terminus von MDM2 eine Rolle bei der Tumorgenese spielt.

Überraschend war dagegen der Befund, dass mit zwei gegen TP53 gerichteten AK in den mit *MDM2*-AS-ODNs behandelten Tieren kein Nachweis von mt-TP53 gelang. In den Kontrollexperimenten (SE-ODNs und physiologische Kochsalzlösung) konnte dagegen eine erhöhte Expression von TP53 nachgewiesen werden. In den Western-Blot-Analysen bestätigte sich die signifikante Reduzierung der TP53-Proteinexpression in den mit AS-ODNs behandelten Tiergruppen. Es ist bekannt, dass MDM2 an wt- und mt-TP53 binden kann¹²², d.h. dass eine Reduzierung der MDM2-Proteinmenge in Folge einer Behandlung mit *MDM2*-AS-ODNs zu einer Stabilisierung von TP53 führen könnte. In einigen Zelllinien wurde jedoch eine Stabilisierung von MDM2 durch mt-TP53 beobachtet^{179, 180}. Eine dieser beschriebenen Zelllinien trägt die gleiche Mutation im *TP53*-Gen wie die Zelllinie RD, die in unseren *in vivo* Therapiestudien verwendet worden ist. In den von uns beschriebenen Experimenten wurde erstmals eine Reduzierung der mt-TP53-Proteinmenge auf Grund einer verringerten MDM2-Expression nachgewiesen (Würl, P. und Bartel, F., Manuskript eingereicht). Dies könnte darauf hindeuten, dass mt-TP53 durch MDM2 stabilisiert wird. Für die Therapie von Tumorpatienten wäre die Reduzierung der mt-TP53-Proteinmenge von großer Bedeutung, da etwa 50 % der Tumoren Mutationen im *TP53*-Gen tragen¹²¹, und Mutationen zu einer Stabilisierung von TP53 beitragen können. Dadurch kommt es zu einer Überexpression von mt-TP53 im Vergleich zu wt-TP53¹⁸¹. Unsere Ergebnisse zeigen in einem WTS-Xenotransplantatmodell, dass eine Reduzierung der Tumormasse und der Tumorzahl durch *MDM2*-AS-ODNs unabhängig vom *TP53*-Genstatus möglich ist. Dadurch wird die Hypothese unterstützt, dass eine *MDM2*-AS-ODN-Therapie in erster Linie in Tumoren, die durch eine MDM2-Überexpression charakterisiert sind, erfolgreich ist¹⁶⁷.

5.6 Ausblick

In weiteren Arbeiten sollte in dem vorgestellten WTS-Xenotransplantatmodell untersucht werden, ob durch die Behandlung von WTS mit *MDM2*-AS-ODNs eine Sensitivierung gegenüber konventionellen Therapieformen wie Chemotherapie und Bestrahlung erreicht werden kann. Erste *in vitro* Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe mit einer kombinierten AS- und Bestrahlungstherapie waren diesbezüglich sehr viel versprechend¹⁸². Neue Arbeiten der Gruppe um Tortora *et al.*⁸⁹ zeigen auch einen deutlichen kooperativen Effekt der MBO AS-ODNs „AS2“ mit Topoisomerase I-selektiven und Topoisomerase II-selektiven Zytostatika sowie den zwei Tubulin-selektiven Chemotherapeutika Paclitaxel und Taxotere. Sowohl für die verwendeten Medikamente als auch für die AS2-ODNs konnten die Konzentrationen stark vermindert werden, um den gleichen wachstumsinhibierenden Effekt zu erzielen. Dabei ver-

stärken die AS-ODNs die Effekte einer Vielzahl von Medikamenten über verschiedene Mechanismen. So wird z.B. durch die Inhibierung von MDM2 die Apoptose-Induktion der verwendeten Zytostatika erhöht (im Normalfall übt MDM2 über die Unterdrückung der Apoptose eine Wachstumskontrolle aus).

Des Weiteren ist geplant, die in dieser Arbeit konstruierten adenoviralen Vektoren zunächst *in vitro* im Vergleich mit liposomalen Transfektionssystemen zu testen. Die rekombinanten Adenoviren erlauben eine hohe Expression der *MDM2*-AS-Sequenzen in der Zielzelle. Verbunden mit einer höheren Transfektionsrate der Adenoviren¹⁸³ sollte es möglich sein, den wachstumshemmenden Effekt der *MDM2*-AS-ODNs noch zu verstärken. Obwohl bereits einige AS-ODNs in klinischen Prüfungen eingesetzt werden (Übersicht in Tamm *et al.*¹⁸⁴), ist oft nicht eindeutig geklärt, ob die erzielten Ergebnisse explizit auf die Antisense-Wirkung zurückzuführen sind. Auch in unseren Untersuchungen ist ein Antisense-unabhängiger Effekt der eingesetzten ODNs nicht ganz auszuschließen, wie der Vergleich der mit *MDM2*-AS- bzw. *MDM2*-SE-ODNs behandelten Tiere gezeigt hat (Kap. 4.7.2 u. 4.7.3.1). Die Wirksamkeit einer auf die Reduzierung der MDM2-Proteinmenge ausgerichteten Therapie für WTS ist jedoch in dieser Arbeit eindeutig bewiesen worden. Die Schwerpunkte nachfolgender Studien werden neben der Analyse weiterer *MDM2*-AS-ODNs auch der Einsatz neuer Techniken zur Translationskontrolle, wie z.B. RNAi oder DNAzyme, von *MDM2* und Apoptose-assoziierten Genen sein, die für die Entstehung und Progression von WTS von Bedeutung sind (z.B. *Survivin*¹⁸⁵, Würfl *et al.*, im Druck).

Es konnte gezeigt werden, dass in WTS bis zu 20 verschiedene Transkriptvarianten der *MDM2*-mRNA exprimiert werden, ein Großteil davon wurde erstmals beschrieben und könnte spezifisch für WTS sein. Die Funktion der einzelnen Spleißvarianten ist bislang nur ansatzweise geklärt worden. Es ist unklar, ob die Expression von verkürzten Transkripten der *MDM2*-mRNA eine Ursache für die Tumorbildung oder ein weiterer Regelmechanismus der MDM2-TP53-Wechselwirkung ist. Andererseits ist auch denkbar, dass Spleißvarianten eine sekundäre Erscheinung während der Tumorgenese sind und die Progression zusätzlich beschleunigen. Wir konnten jedoch auch mehrere *MDM2*-Spleißvarianten in Normalgewebe und in Lymphozyten gesunder Spender nachweisen, so dass ebenfalls eine normale physiologische Aktivität denkbar ist. Die weiteren Arbeiten in Bezug auf die *MDM2*-Spleißformen sollten dazu dienen, die folgenden Fragen zu klären:

- Welche Mechanismen regulieren die Expression von *MDM2*-Spleißformen, insbesondere der Variante *MDM2*-B? Gibt es bestimmte Wachstumssignale, die die Expression von *MDM2*-Spleißformen verstärken bzw. inhibieren?

- Die meisten der gefundenen Spleißformen weist Verluste der TP53-bindenden Domäne auf. Des Weiteren fehlen die Bindungsstellen für weitere Proteine, wie p14ARF, MDMX, p300 u.a. In weiteren Arbeiten sollte durch Ko-Immunpräzipitation geprüft werden, ob die MDM2-Isoformen noch in der Lage sind, an bestimmte Proteine zu binden. Außerdem ist es wichtig zu klären, ob Kinasen wie ATM oder Chk2 potenzielle Serin-/Threonin-Reste zu phosphorylieren und so die Aktivität der MDM2-Isoformen zu regulieren.
- Wie ist der Status der Expression von *MDM2*-Spleißvarianten in Normalgewebe? Vorläufige Ergebnisse deuten darauf hin, dass alternativ gespleißte Transkripte der *MDM2*-mRNA auch in Normalgewebe exprimiert werden. Es ist nicht geklärt, ob dies eventuell eine Vorstufe der Sarkomentwicklung darstellt, oder ob die gefundenen MDM2-Isoformen eine normale physiologische, bislang unbekannte Aktivität besitzen.
- Es ist bekannt, dass die subzelluläre Verteilung von MDM2 eine entscheidende Rolle für dessen Aktivität, beispielsweise die Ubiquitylierung von TP53, spielt. Dafür sind die Kernlokalisations- und Kernexportsequenz von MDM2 erforderlich. Diese beiden Domänen sind in den nachgewiesenen Spleißformen jedoch nicht vorhanden. Durch die Transfektion von *MDM2*^{-/-}-Zellen mit GFP-Fusionsproteinen soll die Verteilung der MDM2-Isoformen in der Zelle untersucht werden.
- Die von uns identifizierten *MDM2*-Spleißvarianten sollen in einem Fibroblasten-Transformations-Assay eingesetzt werden, um zu prüfen, ob diese Isoformen onkogene Eigenschaften besitzen und in der Lage sind, NIH3T3-Fibroblasten zu transformieren.
- In weiteren Arbeiten sollte die Frage geklärt werden, ob und in welchem Umfang die in der RT-PCR nachgewiesenen Spleißformen auch translatiert werden. Es ist geplant, mit Hilfe eines gekoppelten Transkriptions-/Translationssystems die cDNAs der einzelnen Spleißformen *in vitro* in Proteine umzuschreiben und im Western Blot zu analysieren. Anschließend ist es möglich, die *in vitro* translatierten Isoformen und distinkte Banden aus Western Blots von Patientenproben zu vergleichen. Eine weitere Möglichkeit bietet die direkte Proteinsequenzierung. Außerdem könnte eine Analyse der Translationseffizienz der mRNA-Spezies und der Halbwertszeit der MDM2-Isoformen erfolgen. Es ist bekannt, dass sich die von den beiden Promotoren P1 und P2 abstammenden *MDM2*-mRNA-Transkripte sehr stark in ihrer Translationseffizienz unterscheiden⁴⁷. Es wäre in diesem Zu-

sammenhang auch von großer Bedeutung zu wissen, von welchem Promotor die Transkripte der Spleißvarianten abstammen.

Die Heterogenität der WTS erfordert weiterhin eine intensive molekulare Charakterisierung der Tumoren. Das Ziel sollte die Erstellung eines „Fingerabdrucks“ spezifischer molekularer Veränderungen mit prognostischer Relevanz sein. Dadurch wird es möglich sein, einerseits das biologische Verhalten eines Tumors exakter vorherzusagen zu können und andererseits neue, innovative Therapiekonzepte zu entwickeln, die konventionelle Behandlungsoptionen, wie die chirurgische Entfernung des Tumors, Chemotherapie und Bestrahlung, mit Antisense- bzw. Gentherapieansätzen verbinden.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit ist eine vergleichsweise seltene, tumorbiologisch jedoch sehr heterogene Gruppe maligner Tumoren mesenchymalen Ursprung, die humanen Weichteilsarkome (WTS), untersucht worden. WTS sind durch eine große histologische und tumorbiologische Variabilität und eine ausgeprägte Strahlen- und Chemotherapieresistenz charakterisiert. Daraus resultierte die Notwendigkeit einer umfassenden Analyse von WTS mit dem Ziel, molekulare Faktoren mit prognostischer Relevanz zu identifizieren und darauf aufbauend, innovative Therapiestrategien zur Behandlung von WTS zu entwickeln.

Aus der Literatur und eigenen Vorarbeiten war bekannt, dass Überexpression des Onkoproteins MDM2 in WTS mit einer schlechten Prognose für die Patienten korreliert^{29, 31}. Im Rahmen dieser Arbeit wurde in 87 WTS-Proben mit Hilfe einer sensitiven RT-PCR-Methode die *MDM2*-mRNA-Expression untersucht. Mit Ausnahme von zwei konnte in fast allen Proben das „full-length“-Transkript (FL) der *MDM2*-mRNA nachgewiesen werden. In 60 % dieser Fälle traten nach der RT-PCR zusätzlich zur FL-mRNA kürzere Banden auf. Die Analyse eines Großteils dieser Banden ergab, dass es sich um alternativ oder aberrant gespleißte Transkripte der *MDM2*-mRNA handelt. Insgesamt konnte in 47 von 85 WTS-Proben (55 %) die Existenz von *MDM2*-mRNA-Spleißvarianten eindeutig belegt werden. Durchschnittlich konnten je WTS-Probe neben der FL-Form zwei Spleißformen detektiert werden. Insgesamt gelang es, 12 verschiedene Transkripte der *MDM2*-mRNA nachzuweisen. In den untersuchten Rhabdomyosarkom-Zelllinien und juvenilen Rhabdomyosarkomen wurden weitere 8 Transkripte detektiert. Von den insgesamt 20 in WTS gefundenen Spleißvarianten sind 16 erstmals von uns beschrieben worden. Das Auftreten der *MDM2*-mRNA-Transkriptvarianten korrelierte signifikant mit einem höheren Tumorgrad. Obwohl das Vorkommen der Spleißformen mit einem höheren Malignitätsgrad einhergeht, zeigte sich jedoch kein Einfluss auf das Überleben der Patienten. In sieben untersuchten Normalgewebeproben sowie in Lymphozyten gesunder Blutspender konnten ebenfalls *MDM2*-Spleißformen nachgewiesen werden. Es ist daher denkbar, dass bestimmte Transkripte zur Bildung und Progression von WTS beitragen, andere wiederum eine physiologische, bislang unbekannte Bedeutung haben.

Da sich die Sequenzanalyse der einzelnen PCR-Produkte sehr schwierig gestaltete, bestand die Notwendigkeit, ein Verfahren anzuwenden, das deren schnelle und kostengünstige Identifizierung ermöglicht. Zu Beginn der Arbeiten war aus der Literatur keine derartige Methode bekannt. Daraufhin wurde der so genannte „Splice Capture Assay“ (SCA) entwickelt, der die Analyse unbekannter Spleißformen mit dem Aufbau einer Plasmid-cDNA-

Bibliothek verknüpft. Durch die Verwendung geeigneter Restriktionsendonukleasen entsteht für jede Spleißform eine Art „Fingerabdruck“. Dadurch können die Spaltpmuster von PCR-Produkten mit bereits beschriebenen Spleißvarianten verglichen und zugeordnet werden. Bei bisher unbekanntem Varianten lässt sich aus der Größe der Fragmente nach dem Verdau mit dem Restriktionsenzym die Sequenz der Spleißvariante sehr genau vorhersagen.

Von 75 WTS-Proben konnte der *MDM2*-Genstatus untersucht werden, von 63 Patienten stand auch Referenz-DNA von Lymphozyten aus dem peripheren Blut zur Verfügung. Insgesamt konnte in 28 % der untersuchten WTS-Proben eine Amplifikation des *MDM2*-Gens detektiert werden. Einzelne Proben wiesen ein bis zu 12-fach amplifiziertes *MDM2*-Gen auf. Die Analyse der Amplifikation des *MDM2*-Gens in den WTS-Proben ergab, dass das Auftreten der Amplifikation mit dem Tumorgrad korreliert: während in 9 von 16 Fällen (57 %) der Grad 1-Tumoren ein amplifiziertes *MDM2*-Gen aufwiesen, so war dies nur in 9 von 50 (18 %) der Grad 2 und 3-Tumoren der Fall ($p=0,003$; χ^2 -Test). Bemerkenswert war, dass die durchschnittliche Überlebenszeit für Patienten, in deren Tumor keine Amplifikation des *MDM2*-Gens nachweisbar war, 50 Monate betrug, während Patienten mit nachgewiesener *MDM2*-Genamplifikation im Durchschnitt 80 Monate überlebten ($p=0,07$; log-Rank-Test). In der Cox-Regression zeigte sich, dass der Nachweis einer Amplifikation des *MDM2*-Gens ein unabhängiger Prognosefaktor für WTS ist, und dass das Auftreten einer Amplifikation mit einer besseren Prognose für WTS-Patienten korreliert.

Des Weiteren wurde in den WTS-Proben auch die Expression des Tumorsuppressorgen *p14ARF* sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene untersucht. Acht der 57 untersuchten WTS (14 %) wiesen einen Verlust der *p14ARF*-mRNA-Expression auf. Während alle Tumoren (100 %) im Stadium 1 die *p14ARF*-mRNA exprimierten, so waren dies im Stadium 4 nur 40 % (2 von 5, $p=0,007$, χ^2 -Test). Der Verlust der *p14ARF*-mRNA-Expression war signifikant mit einer kürzeren mittleren Überlebenszeit der Patienten verbunden. Diese betrug $11,5 \pm 3,1$ Monate, im Vergleich zu $67 \pm 7,6$ Monaten für Patienten, in deren Tumor die *p14ARF*-mRNA nachgewiesen worden ist ($p=0,0001$, log-Rank-Test). Die Cox-Regressionsanalyse zeigte, dass die Expression der *p14ARF*-mRNA eine prognostische Bedeutung für WTS-Patienten besitzt.

Einen weiteren Schwerpunkt meiner Arbeit bildete die Durchführung von *MDM2*-Antisense-Therapiestudien im nu/nu-Rattenmodell. Ziel der Versuche war es, die aus Arbeiten mit Zellkulturen gewonnenen Erkenntnisse, dass durch die Behandlung mit *MDM2*-Antisense-Oligonukleotide (AS-ODNs) das Zellüberleben um bis zu 80 % reduziert werden kann, auf ein Tiermodell zu übertragen. Dazu wurden verschiedene AS-ODNs, die gegen die *MDM2*-mRNA gerichtet waren, in einem humanen Xenotransplantatmodell im Peritoneum

von Nacktratten getestet. Grundlage unseres klinisch-relevanten Modells sind abdominale und intraperitoneale WTS, die durch konventionelle Therapieformen (chirurgische Eingriffe, Strahlen- und Chemotherapie) schwierig zu behandeln sind. Daher ist es notwendig, alternative Therapiekonzepte, wie z.B. Antisense-Therapien gegen das *MDM2*-Onkogen, für diese WTS zu entwickeln. Zur Etablierung des WTS-Xenotransplantatmodells wurde die RMS-Zelllinie RD verwendet. Da die RD-Zellen nur ein mutiertes *TP53*-Allel aufweisen (das zweite Allel ist deletiert), war es möglich, den Effekt von *MDM2*-AS-ODNs ohne den Einfluss von wt-TP53 zu untersuchen. Durch die Verwendung osmotischer Minipumpen, die in das Peritoneum implantiert wurden, war die kontinuierliche Abgabe der *MDM2*-AS-ODNs über eine Woche hinweg gewährleistet.

In zwei unabhängigen Versuchsreihen konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von Xenotransplantattumoren der Zelllinie RD mit *MDM2*-AS-ODNs zu einer signifikanten Reduzierung der Tumormasse um bis zu 71 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle führt. Erwartungsgemäß war in den Tumoren der mit *MDM2*-AS-ODNs behandelten Tiere die *MDM2*-Proteinmenge reduziert. In der immunhistochemischen Analyse war nur in den mit physiologischer Kochsalzlösung behandelten Gruppen eine *MDM2*-Immunreaktivität nachweisbar. Die quantitative Auswertung der *MDM2*-Proteinexpression im Western Blot ergab ebenso eine signifikante Verminderung der *MDM2*-Proteinmenge in den Tumoren, die mit *MDM2*-AS-ODNs behandelt worden sind. Überraschenderweise war in den Tumoren durch die Behandlung mit *MDM2*-AS-ODNs zusätzlich auch die mt-TP53-Proteinmenge sowohl in der immunhistochemischen Färbung als auch im Western Blot reduziert. Somit konnte erstmals ein Einfluss der *MDM2*-AS-ODNs über eine Verringerung der *MDM2*-Proteinmenge auf die Expression bzw. Stabilität von mt-TP53 nachgewiesen werden. Unsere Ergebnisse zeigen in einem WTS-Xenotransplantatmodell, dass eine Reduzierung der Tumormasse und der Tumoranzahl durch *MDM2*-AS-ODNs unabhängig vom *TP53*-Genstatus möglich ist. Auf Grund der Tatsache, dass bis zu 50 % aller Tumoren Mutationen des *TP53*-Gens aufweisen, sind diese Befunde von allgemeiner Bedeutung für die Therapie von Tumorerkrankungen.

Darauf aufbauend sollen künftige Experimente zeigen, ob durch andere Applikationswege, wie z.B. mit Hilfe des in dieser Arbeit konstruierten Adenovirus, oder durch Kombination mit konventionellen Therapieformen, wie Chemotherapie und Bestrahlung, eine Verstärkung des Effekts der *MDM2*-AS-ODNs auf das Tumorstadium erreicht werden kann. Des Weiteren ist geplant, die Funktion der verschiedenen *MDM2*-Spleißvarianten in Bezug auf die Entstehung und die Progression insbesondere von WTS eingehend zu analysieren.

7 Literatur

1. Enzinger, F. & Weiss, S. *Soft Tissue Tumors*. Mosby, St. Louis, MO (1995).
2. Katenkamp, D. & Stiller, D. *Weichgewebstumoren*. J.A. Barth, Leipzig (1990).
3. Waterhouse, J., Muir, C., Shanmugaratnam, K. & Powell, J. Cancer incidence in five continents. *IARC Scientific Publications* **42**, (1982).
4. Gall, F.P., Goehl, J. & Hohenberger, W. *Weichteilsarkome*. (Zuckschwerdt, München, 1990).
5. Gustafson, P. Soft tissue sarcoma. Epidemiology and prognosis in 508 patients. *Acta Orthop. Scand. Suppl* **259**, 1-31 (1994).
6. Katenkamp, D. & Kosmehl, H. Heterogeneity in malignant soft tissue tumors. *Curr. Top. Path* **89**, 125-151 (1995).
7. Holzhausen, H.J. & Stiller, D. Cellular differentiation in storiform-pleomorphic malignant fibrous histiocytomas. An electron microscopic study. *Zbl. allg. Path. pathol. Anat.* **134**, 363-381 (1988).
8. Fong, Y., Coit, D.G., Woodruff, J.M. & Brennan, M.F. Lymph node metastasis from soft tissue sarcoma in adults: analysis of data from a prospective database of 1772 sarcoma patients. *Ann. Surg.* **217**, 72-77 (1993).
9. Kügler, D. & Holzhausen, H.-J. Graduierung von malignen Weichgewebstumoren. *Pathologe* **20**, 217-223 (1999).
10. Beahrs, O.H., Henson, D.E. & Hutter, R.V.P. *Manual for staging of Cancer*. Lipponcott Company, Philadelphia (2001).
11. Pollock, R.E., Karnell, L.H., Menck, H.R. & Winchester, D.P. The National Cancer Data Base report on soft tissue sarcoma. *Cancer* **78**, 2247-2257 (1996).
12. Jensen, O.M., Hogh, J., Ostgaard, S.E., Nordentoft, A.M. & Sneppen, O. Histopathological grading of soft tissue tumours. Prognostic significance in a prospective study of 278 consecutive cases. *J. Pathol.* **163**, 19-24 (1991).
13. Fletcher, C., Kempson, R. & Weiss, S.W. Recommendations for the reporting of soft tissue sarcomas. *Virchows Arch.* **434**, 187-191 (1999).
14. Brennan, M.F. Management of soft tissue sarcoma. *Br. J. Surg.* **83**, 577-579 (1996).
15. Würfl, P. & Schonfelder, M. Diagnostik und Therapie der Weichteilsarkome - Stand und Perspektiven. Rath, F.W. & Schonfelder, M. (eds.) (Karger, Leipzig, 2001).
16. Schütte, J. Chemotherapie der Weichteilsarkome. *Onkologie* **1**, 119-125 (1995).
17. Bokemeyer, C. *et al.* A phase I/II study of sequential, dose-escalated, high dose ifosfamide plus doxorubicin with peripheral blood stem cell support for the treatment of patients with advanced soft tissue sarcomas. *Cancer* **80**, 1221-1227 (1997).
18. Eggermont, A.M. *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**, 756-764 (1996).
19. Coindre, J.M. *et al.* Prognostic factors in adult patients with locally controlled soft tissue sarcoma. A study of 546 patients from the French Federation of Cancer Centers Sarcoma Group. *J. Clin. Oncol.* **14**, 869-877 (1996).
20. Momand, J., Jung, D., Wilczynski, S. & Niland, J. The MDM2 gene amplification database. *Nucleic Acids Res* **26**, 3453-3459 (1998).
21. Khatib, Z.A. *et al.* Coamplification of the CDK4 gene with MDM2 and GLI in human sarcomas. *Cancer Res* **53**, 5535-5541 (1993).
22. Maelandsmo, G.M. *et al.* Homozygous deletion frequency and expression levels of the CDKN2 gene in human sarcomas--relationship to amplification and mRNA levels of CDK4 and CCND1. *Br. J. Cancer* **72**, 393-398 (1995).

23. Taubert,H., Meye,A. & Würl,P. Soft tissue sarcomas and p53 mutations. *Molecular Medicine* **4**, 365-372 (1998).
24. Taubert,H., Meye A & Würl,P. Prognosis is correlated with p53 mutation type for soft tissue sarcoma patients. *Cancer Res* **56**, 4134-4136 (1996).
25. Würl,P. *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**, 502-508 (1997).
26. Florenes,V.A. *et al.* MDM2 gene amplification and transcript levels in human sarcomas: relationship to TP53 gene status. *J. Natl. Cancer Inst.* **86**, 1297-1302 (1994).
27. Leach,F.S. *et al.* p53 Mutation and MDM2 amplification in human soft tissue sarcomas. *Cancer Res* **53**, 2231-2234 (1993).
28. Pilotti,S. *et al.* Distinct mdm2/p53 expression patterns in liposarcoma subgroups: implications for different pathogenetic mechanisms. *J. Pathol.* **181**, 14-24 (1997).
29. Cordon-Cardo,C. *et al.* Molecular abnormalities of mdm2 and p53 genes in adult soft tissue sarcomas. *Cancer Res.* **54**, 794-799 (1994).
30. Würl,P. *et al.* Significance of RB and Mdm2 expression as prognostic markers for soft tissue sarcoma. *Langenbecks Arch Chir* **383**, 99-103 (1998).
31. Würl,P. *et al.* Prognostic relevance of C-terminal Mdm2 detection is enhanced by p53 positivity in soft tissue sarcomas. *Diagnostic Molecular Pathology* **6**, 249-254 (1997).
32. Würl,P. *et al.* High prognostic significance of Mdm2/p53 co-overexpression in soft tissue sarcomas of the extremities. *Oncogene* **16**, 1183-1185 (1998).
33. Taubert,H. *et al.* mdm2 mRNA level is a prognostic factor in soft tissue sarcoma. *Mol Med.* **6**, 50-59 (2000).
34. Millon,R. *et al.* Loss of MDM2 expression in human head and neck squamous cell carcinomas and clinical significance. *Oral Oncol.* **37**, 620-631 (2001).
35. Cahilly-Snyder,L., Yang-Feng,T., Francke,U. & George,D.L. Molecular analysis and chromosomal mapping of amplified genes isolated from a transformed mouse 3T3 cell line. *Somat. Cell Mol. Genet.* **13**, 235-244 (1987).
36. Fakharzadeh,S.S., Trusko,S.P. & George,D.L. Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumor cell line. *EMBO J.* **10**, 1565-1569 (1991).
37. Momand,J., Zambetti,G.P., Olson,D.C., George,D. & Levine,A.J. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* **69**, 1237-1245 (1992).
38. Haupt,Y., Maya,R., Kazaz,A. & Oren,M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* **387**, 296-299 (1997).
39. Oliner,J.D., Kinzler,K.W., Meltzer,P.S., George,D.L. & Vogelstein,B. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* **358**, 80-83 (1992).
40. Olson,D.C. *et al.* Identification and characterization of multiple mdm-2 proteins and mdm-2-p53 protein complexes. *Oncogene* **8**, 2353-2360 (1993).
41. Haines,D.S., Landers,J.E., Engle,L.J. & George,D.L. Physical and functional interaction between wild-type p53 and mdm2 proteins. *Mol. Cell Biol.* **14**, 1171-1178 (1994).
42. Sigalas,I., Calvert,A.H., Anderson,J.J., Neal,D.E. & Lunec,J. Alternatively spliced mdm2 transcripts with loss of p53 binding domain sequences: transforming ability and frequent detection in human cancer. *Nat Med.* **2**, 912-917 (1996).
43. Oliner,J.D. *et al.* Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature* **362**, 857-860 (1993).
44. Kubbutat,M.H., Jones,S.N. & Vousden,K.H. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* **387**, 299-303 (1997).

45. Zauberman,A., Flusberg,D., Haupt,Y., Barak,Y. & Oren,M. A functional p53-responsive intronic promoter is contained within the human mdm2 gene. *Nucleic Acids Res* **23**, 2584-2592 (1995).
46. Picksley,S.M. & Lane,D.P. The p53-mdm2 autoregulatory feedback loop: a paradigm for the regulation of growth control by p53? *Bioessays* **15**, 689-690 (1993).
47. Barak,Y., Gottlieb,E., Juven-Gershon,T. & Oren,M. Regulation of mdm2 expression by p53: alternative promoters produce transcripts with nonidentical translation potential. *Genes Dev.* **8**, 1739-1749 (1994).
48. Bottger,A. *et al.* Design of a synthetic Mdm2 binding mini protein that activates the p53 response in vivo. *Curr. Biol.* **7**, 860-869 (1997).
49. Jones,S.N., Roe,A.E., Donehower,L.A. & Bradley,A. Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature* **378**, 206-208 (1995).
50. Montes de Oca,L.R., Wagner,D.S. & Lozano,G. Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53. *Nature* **378**, 203-206 (1995).
51. Thut,C.J., Goodrich,J.A. & Tjian,R. Repression of p53-mediated transcription by MDM2: a dual mechanism. *Genes Dev.* **11**, 1974-1986 (1997).
52. Ford,J.M. & Hanawalt,P.C. Expression of wild-type p53 is required for efficient global genomic nucleotide excision repair in UV-irradiated human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **272**, 28073-28080 (1997).
53. Mummenbrauer,T. *et al.* p53 Protein exhibits 3'-to-5' exonuclease activity . *Cell* **85**, 1089-1099 (1996).
54. Haupt,Y. *et al.* p53 mediated apoptosis in HeLa cells: transcription dependent and independent mechanisms. *Leukemia* **11 Suppl 3**, 337-339 (1997).
55. Marston,N.J., Jenkins,J.R. & Vousden,K.H. Oligomerisation of full length p53 contributes to the interaction with mdm2 but not HPV E6. *Oncogene* **10**, 1709-1715 (1995).
56. Chehab,N.H., Malikzay,A., Appel,M. & Halazonetis,T.D. Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53. *Genes Dev.* **14**, 278-288 (2000).
57. Jones,S.N., Hancock,A.R., Vogel,H., Donehower,L.A. & Bradley,A. Overexpression of Mdm2 in mice reveals a p53-independent role for Mdm2 in tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 15608-15612 (1998).
58. Xiao,Z.X. *et al.* Interaction between the retinoblastoma protein and the oncoprotein MDM2. *Nature* **375**, 694-698 (1995).
59. Martin,K. *et al.* Stimulation of E2F1/DP1 transcriptional activity by MDM2 oncoprotein. *Nature* **375**, 691-694 (1995).
60. Juven-Gershon,T. *et al.* The Mdm2 oncoprotein interacts with the cell fate regulator Numb. *Mol. Cell Biol.* **18**, 3974-3982 (1998).
61. Pomerantz,J. *et al.* The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* **92**, 713-723 (1998).
62. Kamijo,T. *et al.* Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 8292-8297 (1998).
63. Stott,F.J. *et al.* The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J* **17**, 5001-5014 (1998).
64. Grossman,S.R. *et al.* p300/MDM2 complexes participate in MDM2-mediated p53 degradation. *Mol. Cell* **2**, 405-415 (1998).
65. Lill,N.L., Grossman,S.R., Ginsberg,D., DeCaprio,J. & Livingston,D.M. Binding and modulation of p53 by p300/CBP coactivators. *Nature* **387**, 823-827 (1997).
66. Gu,W., Shi,X.L. & Roeder,R.G. Synergistic activation of transcription by CBP and p53. *Nature* **387**, 819-823 (1997).

67. Avantaggiati, M.L. *et al.* Recruitment of p300/CBP in p53-dependent signal pathways. *Cell* **89**, 1175-1184 (1997).
68. Scolnick, D.M. *et al.* CREB-binding protein and p300/CBP-associated factor are transcriptional coactivators of the p53 tumor suppressor protein. *Cancer Res* **57**, 3693-3696 (1997).
69. Zhu, Q., Yao, J., Wani, G., Wani, M.A. & Wani, A.A. Mdm2 Mutant Defective in Binding p300 Promotes Ubiquitination but Not Degradation of p53. EVIDENCE FOR THE ROLE OF p300 IN INTEGRATING UBIQUITINATION AND PROTEOLYSIS. *J. Biol. Chem.* **276**, 29695-29701 (2001).
70. Tanner, B. *et al.* mdm 2 mRNA expression is associated with survival in ovarian cancer. *Int. J Cancer* **74**, 438-442 (1997).
71. Ko, J.L. *et al.* MDM2 mRNA expression is a favorable prognostic factor in non-small-cell lung cancer. *Int. J Cancer* **89**, 265-270 (2000).
72. Brown, D.R., Thomas, C.A. & Deb, S.P. The human oncoprotein MDM2 arrests the cell cycle: elimination of its cell-cycle-inhibitory function induces tumorigenesis. *EMBO J* **17**, 2513-2525 (1998).
73. Dilla, T., Velasco, J.A., Medina, D.L., Gonzalez-Palacios, J.F. & Santisteban, P. The MDM2 oncoprotein promotes apoptosis in p53-deficient human medullary thyroid carcinoma cells. *Endocrinology* **141**, 420-429 (2000).
74. Cheney, M.D., Nix, S. & Harris, L.C. MDM2 induces apoptosis in rhabdomyosarcoma cells. 2001.
75. Hanke, J. *et al.* Alternative splicing of human genes: more the rule than the exception? *Trends Genet.* **15**, 389-390 (1999).
76. Verma, I.M. & Somia, N. Gene therapy -- promises, problems and prospects. *Nature* **389**, 239-242 (1997).
77. Bordignon, C. *et al.* Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA-immunodeficient patients. *Science* **270**, 470-475 (1995).
78. Zhang, W.W. Development and application of adenoviral vectors for gene therapy of cancer. *Cancer Gene Ther.* **6**, 113-138 (1999).
79. Horwitz, M. Fundamental virology. Field, J.D., Knipe, D. & Chanock, R. (eds.), pp. 771-813 (Raven Press, New York, 1990).
80. Yang, Y. *et al.* Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 4407-4411 (1994).
81. Yang, Y., Su, Q. & Wilson, J.M. Role of viral antigens in destructive cellular immune responses to adenovirus vector-transduced cells in mouse lungs. *J. Virol.* **70**, 7209-7212 (1996).
82. Armentero, D. *et al.* Characterization of an adenovirus transfer vector containing an E4 deletion. *Hum. Gene Ther.* **6**, 1343-1353 (1995).
83. Yeh, P. *et al.* Efficient transcomplementation of adenovirus E1 and E4 regions from a 293 derived cell line expressing a minimal E4 functional unit. *J. Virol.* **70**, 559-565 (1995).
84. Teoh, G. *et al.* Adenovirus vector-based purging of multiple myeloma cells. *Blood* **92**, 4591-4601 (1998).
85. Chen, L., Agrawal, S., Zhou, W., Zhang, R. & Chen, J. Synergistic activation of p53 by inhibition of MDM2 expression and DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 195-200 (1998).
86. Kondo, S., Barnett, G.H., Hara, H., Morimura, T. & Takeuchi, J. MDM2 protein confers the resistance of a human glioblastoma cell line to cisplatin-induced apoptosis. *Oncogene* **10**, 2001-2006 (1995).
87. Meye, A. *et al.* Colony formation of soft tissue sarcoma cells is inhibited by lipid-mediated antisense oligodeoxynucleotides targeting the human mdm2 oncogene. *Cancer Lett.* **149**, 181-188 (2000).
88. Chen, L. *et al.* Ubiquitous induction of p53 in tumor cells by antisense inhibition of MDM2 expression. *Mol Med.* **5**, 21-34 (1999).

89. Tortora, G. *et al.* A novel MDM2 anti-sense oligonucleotide has anti-tumor activity and potentiates cytotoxic drugs acting by different mechanisms in human colon cancer. *Int. J Cancer* **88**, 804-809 (2000).
90. Wang, H. *et al.* MDM2 oncogene as a target for cancer therapy: An antisense approach. *Int. J Oncol.* **15**, 653-660 (1999).
91. Wang, X.Q., Ongkeko, W.M., Lau, A.W., Leung, K.M. & Poon, R.Y. A possible role of p73 on the modulation of p53 level through MDM2. *Cancer Res* **61**, 1598-1603 (2001).
92. De Giovanni, C. *et al.* Metastatic ability and differentiative properties of a new cell line of human embryonal rhabdomyosarcoma (CCA). *Anticancer Res* **9**, 1943-1949 (1989).
93. Stratton, M.R. *et al.* Mutation of the p53 gene in human soft tissue sarcomas: association with abnormalities of the RB1 gene. *Oncogene* **5**, 1297-1301 (1990).
94. Taylor, A.C. *et al.* P53 mutation and MDM2 amplification frequency in pediatric rhabdomyosarcoma tumors and cell lines. *Med. Pediatr. Oncol.* **35**, 96-103 (2000).
95. Masuda, H., Miller, C., Koeffler, H.P., Battifora, H. & Cline, M.J. Rearrangement of the p53 gene in human osteogenic sarcomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **84**, 7716-7719 (1987).
96. Taubert, H. *et al.* Morphological and molecular characterization of an undifferentiated soft tissue sarcoma cell line and derivative clones. *International Journal of Oncology* **11**, 521-526 (1997).
97. Sugarman, B.J. Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science* **230**, 943-945 (1985).
98. Louis, N. Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line. *J Virol.* **233**, 423-429 (1997).
99. Chen, J., Marechal, V. & Levine, A.J. Mapping of the p53 and mdm-2 interaction domains. *Mol Cell Biol* **13**, 4107-4114 (1993).
100. Potter, P.M. *et al.* Construction of adenovirus for high level expression of small RNAs in mammalian cells. Application to a Bcl-2 ribozyme. *Mol Biotechnol* **15**, 105-114 (2000).
101. Bartel, F. *et al.* Amplification of the MDM2 gene, but not expression of splice variants of MDM2 mRNA, is associated with prognosis in soft tissue sarcoma. *Int. J Cancer* **95**, 168-175 (2001).
102. Schlott, T. *et al.* Point mutations and nucleotide insertions in the MDM2 zinc finger structure of human tumours. *J Pathol.* **182**, 54-61 (1997).
103. Esteller, M. *et al.* p14ARF silencing by promoter hypermethylation mediates abnormal intracellular localization of MDM2. *Cancer Res* **61**, 2816-2821 (2001).
104. Schuster, K. Mikrosatellitenanalyse in Weichteilsarkomen. 2001. Universität Halle-Wittenberg.
105. Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989).
106. Wright, D.K. & Manos, M.M. PCR protocols: A guide to methods and applications. Innis, M.A. (ed.), pp. 153-158 (Academic Press, San Diego, 1990).
107. Lahiri, D.K. & Nurnberger, J.I., Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* **19**, 5444 (1991).
108. 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**, 1215 (1988).
109. Zhang, W.W., Koch, P.E. & Roth, J.A. Detection of wild-type contamination in a recombinant adenoviral preparation by PCR. *Biotechniques* **18**, 444-447 (1995).
110. Meye, A. Molekulare Charakterisierung (p53, p16^{INK4A}, mdm2) humaner Weichteilsarkome und Etablierung von nichtviralen DNA-Transfektions und Therapiestrategien *in vitro*. 1999. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
111. Lukas, J. *et al.* Alternative and aberrant messenger RNA splicing of the mdm2 oncogene in invasive breast cancer. *Cancer Res* **61**, 3212-3219 (2001).

112. Matsumoto,R. *et al.* Short alternative splice transcripts of the mdm2 oncogene correlate to malignancy in human astrocytic neoplasms. *Cancer Res* **58**, 609-613 (1998).
113. Tamborini,E. *et al.* Analysis of the molecular species generated by MDM2 gene amplification in liposarcomas. *Int. J Cancer* **92**, 790-796 (2001).
114. Evans,S.C. *et al.* An alternatively spliced HDM2 product increases p53 activity by inhibiting HDM2 *Oncogene* **20**, 4041-4049 (2001).
115. Evdokiou,A. *et al.* Expression of alternatively-spliced MDM2 transcripts in giant cell tumours of bone. *Int. J. Oncol.* **19**, 625-632 (2001).
116. Kraus,A. *et al.* Expression of alternatively spliced mdm2 transcripts correlates with stabilized wild-type p53 protein in human glioblastoma cells. *Int. J Cancer* **80**, 930-934 (1999).
117. Padgett,R.A., Grabowski,P.J., Konarska,M.M., Seiler,S. & Sharp,P.A. Splicing of messenger RNA precursors. *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 1119-1150 (1986).
118. Veldhoen,N., Metcalfe,S. & Milner,J. A novel exon within the mdm2 gene modulates translation initiation in vitro and disrupts the p53-binding domain of mdm2 protein. *Oncogene* **18**, 7026-7033 (1999).
119. Chen,J., Lin,J. & Levine,A.J. Regulation of transcription functions of the p53 tumor suppressor by the mdm-2 oncogene. *Mol. Med.* **1**, 142-152 (1995).
120. Piette,J., Neel,H. & Marechal,V. Mdm2: keeping p53 under control. *Oncogene* **15**, 1001-1010 (1997).
121. Hollstein,M., Sidransky,D., Vogelstein,B. & Harris,C.C. p53 mutations in human cancers. *Science* **253**, 49-53 (1991).
122. Freedman,D.A., Wu,L. & Levine,A.J. Functions of the MDM2 oncoprotein. *Cell Mol Life Sci.* **55**, 96-107 (1999).
123. Landers,J.E., Haines,D.S., Strauss,J.F., III & George,D.L. Enhanced translation: a novel mechanism of mdm2 oncogene overexpression identified in human tumor cells. *Oncogene* **9**, 2745-2750 (1994).
124. Landers,J.E., Cassel,S.L. & George,D.L. Translational enhancement of mdm2 oncogene expression in human tumor cells containing a stabilized wild-type p53 protein. *Cancer Res* **57**, 3562-3568 (1997).
125. Gudas,J. *et al.* Differential expression of multiple MDM2 messenger RNAs and proteins in normal and tumorigenic breast epithelial cells. *Clin. Cancer Res* **1**, 71-80 (1995).
126. Oca Luna,R.M. *et al.* The organization and expression of the mdm2 gene. *Genomics* **33**, 352-357 (1996).
127. Hori,M., Shimazaki,J., Inagawa,S., Itabashi,M. & Hori,M. Alternatively spliced MDM2 transcripts in human breast cancer in relation to tumor necrosis and lymph node involvement. *Pathol Int.* **50**, 786-792 (2000).
128. Santoro,I.M. & Groden,J. Alternative splicing of the APC gene and its association with terminal differentiation. *Cancer Res.* **57**, 488-494 (1997).
129. Ermak,G., Jennings,T., Robinson,L., Ross,J.S. & Figge,J. Restricted patterns of CD44 variant exon expression in human papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res.* **56**, 1037-1042 (1996).
130. Ermak,G., Jennings,T., Boguniewicz,A. & Figge,J. Novel CD44 messenger RNA isoforms in human thyroid and breast tissues feature unusual sequence rearrangements. *Clin. Cancer Res.* **2**, 1251-1254 (1996).
131. Li,L., Li,X., Francke,U. & Cohen,S.N. The TSG101 tumor susceptibility gene is located in chromosome 11 band p15 and is mutated in human breast cancer. *Cell* **88**, 143-154 (1997).
132. Gayther,S.A. *et al.* Aberrant splicing of the TSG101 and FHIT genes occurs frequently in multiple malignancies and in normal tissues and mimics alterations previously described in tumours. *Oncogene* **15**, 2119-2126 (1997).

133. Lee, M.P. & Feinberg, A.P. Aberrant splicing but not mutations of TSG101 in human breast cancer. *Cancer Res.* **57**, 3131-3134 (1997).
134. Negrini, M. *et al.* The FHIT gene at 3p14.2 is abnormal in breast carcinomas. *Cancer Res.* **56**, 3173-3179 (1996).
135. Virgilio, L. *et al.* FHIT gene alterations in head and neck squamous cell carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 9770-9775 (1996).
136. Fong, K.M. *et al.* FHIT and FRA3B 3p14.2 allele loss are common in lung cancer and preneoplastic bronchial lesions and are associated with cancer-related FHIT cDNA splicing aberrations. *Cancer Res.* **57**, 2256-2267 (1997).
137. Lambert, S. *et al.* Analysis of intrachromosomal homologous recombination in mammalian cell, using tandem repeat sequences. *Mutat. Res.* **433**, 159-168 (1999).
138. Blanchette, M. & Chabot, B. Modulation of exon skipping by high-affinity hnRNP A1-binding sites and by intron elements that repress splice site utilization. *EMBO J* **18**, 1939-1952 (1999).
139. Metzloff, M., O'Dell, M., Hellens, R. & Flavell, R.B. Developmentally and transgene regulated nuclear processing of primary transcripts of chalcone synthase A in petunia. *Plant J* **23**, 63-72 (2000).
140. Zhang, Y. & Xiong, Y. Control of p53 Ubiquitination and Nuclear Export by MDM2 and ARF. *Cell Growth Differ.* **12**, 175-186 (2001).
141. Buschmann, T., Fuchs, S.Y., Lee, C.G., Pan, Z.Q. & Ronai, Z. SUMO-1 modification of Mdm2 prevents its self-ubiquitination and increases Mdm2 ability to ubiquitinate p53. *Cell* **101**, 753-762 (2000).
142. Hjerrild, M. *et al.* Phosphorylation of murine double minute clone 2 (MDM2) protein at serine-267 by protein kinase CK2 in vitro and in cultured cells. *Biochem. J* **355**, 347-356 (2001).
143. Hay, T.J. & Meek, D.W. Multiple sites of in vivo phosphorylation in the MDM2 oncoprotein cluster within two important functional domains. *FEBS Lett.* **478**, 183-186 (2000).
144. Jardine, L.J., Milne, D.M., Dumaz, N. & Meek, D.W. Phosphorylation of murine p53, but not human p53, by MAP kinase in vitro and in cultured cells highlights species-dependent variation in post-translational modification. *Oncogene* **18**, 7602-7607 (1999).
145. Goetz, A.W., van Der, K.H., Maya, R., Oren, M. & Aulitzky, W.E. Requirement for mdm2 in the survival effects of bcr-abl and interleukin 3 in hematopoietic cells. *Cancer Res.* **61**, 7635-7641 (2001).
146. Reed, J.C. Splicing and dicing apoptosis genes. *Nat Biotechnol* **17**, 1064-1065 (1999).
147. Porter, D.C. & Keyomarsi, K. Novel splice variants of cyclin E with altered substrate specificity. *Nucleic Acids Res* **28**, E101 (2000).
148. Maki, C.G., Huibregtse, J.M. & Howley, P.M. In vivo ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53(1). *Cancer Res.* **56**, 2649-2654 (1996).
149. Roth, J., Dobbstein, M., Freedman, D.A., Shenk, T. & Levine, A.J. Nucleo-cytoplasmic shuttling of the hdm2 oncoprotein regulates the levels of the p53 protein via a pathway used by the human immunodeficiency virus rev protein. *EMBO J* **17**, 554-564 (1998).
150. Freedman, D.A. & Levine, A.J. Nuclear export is required for degradation of endogenous p53 by MDM2 and human papillomavirus E6. *Mol. Cell Biol.* **18**, 7288-7293 (1998).
151. Tao, W. & Levine, A.J. Nucleocytoplasmic shuttling of oncoprotein Hdm2 is required for Hdm2-mediated degradation of p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 3077-3080 (1999).
152. Freedman, D.A., Epstein, C.B., Roth, J.C. & Levine, A.J. A genetic approach to mapping the p53 binding site in the MDM2 protein. *Mol. Med.* **3**, 248-259 (1997).
153. Ladanyi, M. *et al.* MDM2 gene amplification in metastatic osteosarcoma. *Cancer Res.* **53**, 16-18 (1993).

154. Waber,P.G., Chen,J. & Nisen,P.D. Infrequency of MDM2 gene amplification in pediatric solid tumors and lack of association with p53 mutations in adult squamous cell carcinomas. *Cancer Res.* **53**, 6028-6030 (1993).
155. Nakayama,T. *et al.* MDM2 gene amplification in bone and soft-tissue tumors: association with tumor progression in differentiated adipose-tissue tumors . *Int. J Cancer* **64**, 342-346 (1995).
156. Nilbert,M., Rydholm,A., Willen,H., Mitelman,F. & Mandahl,N. MDM2 gene amplification correlates with ring chromosome in soft tissue tumors. *Genes Chromosomes. Cancer* **9**, 261-265 (1994).
157. Pedeutour,F. *et al.* Complex composition and co-amplification of SAS and MDM2 in ring and giant rod marker chromosomes in well-differentiated liposarcoma. *Genes Chromosomes. Cancer* **10**, 85-94 (1994).
158. Patterson,H. *et al.* Abnormalities of the p53 MDM2 and DCC genes in human leiomyosarcomas. *Br. J Cancer* **69**, 1052-1058 (1994).
159. Reid,A.H. *et al.* MDM2 amplification, P53 mutation, and accumulation of the P53 gene product in malignant fibrous histiocytoma. *Diagn. Mol. Pathol.* **5**, 65-73 (1996).
160. Rieske,P. *et al.* A comparative study of P53/MDM2 genes alterations and P53/MDM2 proteins immunoreactivity in soft-tissue sarcomas. *J Exp. Clin. Cancer Res* **18**, 403-416 (1999).
161. Polsky,D. *et al.* HDM2 Protein Overexpression, but not Gene Amplification, is Related to Tumorigenesis of Cutaneous Melanoma. *Cancer Res.* **61**, 7642-7646 (2001).
162. Higashiyama,M. *et al.* MDM2 gene amplification and expression in non-small-cell lung cancer: immunohistochemical expression of its protein is a favourable prognostic marker in patients without p53 protein accumulation. *Br. J. Cancer* **75**, 1302-1308 (1997).
163. Quelle,D.E., Zindy,F., Ashmun,R.A. & Sherr,C.J. Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* **83**, 993-1000 (1995).
164. Meye,A. *et al.* No p16INK4A/CDKN2/MTS1 mutations independent of p53 status in soft tissue sarcomas. *J Pathol.* **184**, 14-17 (1998).
165. Esteller,M. *et al.* Hypermethylation-associated inactivation of p14(ARF) is independent of p16(INK4a) methylation and p53 mutational status. *Cancer Res* **60**, 129-133 (2000).
166. Sato,N. *et al.* Enhancement of drug-induced apoptosis by antisense oligodeoxynucleotides targeted against Mdm2 and p21WAF1/CIP1. *Anticancer Res* **20**, 837-842 (2000).
167. Zhang & Wang,H. MDM2 oncogene as a novel target for human cancer therapy. *Curr. Pharm. Des* **6**, 393-416 (2000).
168. Capoulade,C. *et al.* Apoptosis of tumoral and nontumoral lymphoid cells is induced by both mdm2 and p53 antisense oligodeoxynucleotides. *Blood* **97**, 1043-1049 (2001).
169. Geiger,T. *et al.* Consequences of the inhibition of Hdm2 expression in human osteosarcoma cells using antisense oligonucleotides. *Anticancer Drug Design* **15**, 423-430 (2001).
170. Agrawal,S. Antisense oligonucleotides: towards clinical trials. *Trends Biotech.* **14**, 376-387. 1996.
171. Diasio,R.B. & Zhang,R. Pharmacology of therapeutic oligonucleotides. *Antisense Nucleic Acid Drug Develop* **7**, 239-243. 1997.
172. Dubs-Poterszman,M.C., Tocque,B. & Wasylyk,B. MDM2 transformation in the absence of p53 and abrogation of the p107 G1 cell-cycle arrest. *Oncogene* **11**, 2445-2449 (1995).
173. Lundgren,K. *et al.* Targeted expression of MDM2 uncouples S phase from mitosis and inhibits mammary gland development independent of p53. *Genes Dev.* **11**, 714-725 (1997).
174. Jones,S.N. *et al.* The tumorigenic potential and cell growth characteristics of p53- deficient cells are equivalent in the presence or absence of Mdm2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 14106-14111 (1996).

175. Zeng,X. *et al.* MDM2 suppresses p73 function without promoting p73 degradation. *Mol. Cell Biol.* **19**, 3257-3266 (1999).
176. Reifenberger,G., Liu,L., Ichimura,K., Schmidt,E.E. & Collins,V.P. Amplification and overexpression of the MDM2 gene in a subset of human malignant gliomas without p53 mutations. *Cancer Res.* **53**, 2736-2739 (1993).
177. Watanabe,T. *et al.* The MDM2 oncogene overexpression in chronic lymphocytic leukemia and low-grade lymphoma of B-cell origin. *Blood* **84**, 3158-3165 (1994).
178. Schlott,T. *et al.* Fragments of human oncoprotein MDM2 reveal variable distribution within and on cultivated human hepatoma cells. *Biochem. Biophys. Res Commun.* **283**, 956-963 (2001).
179. Pan,Y. & Haines,D.S. The pathway regulating MDM2 protein degradation can be altered in human leukemic cells. *Cancer Res* **59**, 2064-2067 (1999).
180. Peng,Y. *et al.* Stabilization of the MDM2 oncoprotein by mutant p53. *J Biol Chem* **276**, 6874-6878 (2001).
181. Zambetti,G.P. & Levine,A.J. A comparison of the biological activities of wild-type and mutant p53. *FASEB J* **7**, 855-865 (1993).
182. Grunbaum,U. *et al.* Transfection with mdm2-antisense or wtp53 results in radiosensitization and an increased apoptosis of a soft tissue sarcoma cell line. *Anticancer Res.* **21**, 2065-2071 (2001).
183. Campaign,J.A. *et al.* Lipid- and adenoviral-mediated gene transfer into AIDS-Kaposi's sarcoma cell lines. *Cancer Gene Ther.* **5**, 131-143 (1998).
184. Tamm,I., Dorken,B. & Hartmann,G. Antisense therapy in oncology: new hope for an old idea? *Lancet* **358**, 489-497 (2001).
185. Kappler,M. *et al.* Increased survivin transcript levels: An independent negative predictor of survival in soft tissue sarcoma patients. *Int. J Cancer* **95**, 360-363 (2001).

8 Anhang

8.1 Sequenz der *MDM2*-cDNA (Genbank-Accession-No. NM_002392)

```
1 gcaccgcgag agcttggctg cttctggggc ctgtgtggcc ctgtgtgtcg gaaagatgga
61 gcaagaagcc gagccccgagg ggcggccgag acccctctga ccgagatcct gctgctttcg
121 cagccaggag caccgtccct ccccggatta gtgcgtacga gcgcccagtg ccctggcccc
181 gagagtggaa tgatccccga ggcccagggc gtcgtgcttc cgcagtagtc agtccccgtg
241 aaggaaaactg gggagtcttg agggaccccc gactccaagc gcgaaaacc cggatggtga
      ----- MDM5 ---->                               ----- MDM9 -----
301 ggagcaggca aATGtgcaat accaacatgt ctgtacctac tgatggtgct gtaaccacct
      ----->                               ----- MDM1 ----->
361 cacagattcc agcttcggaa caagagacc tggttagacc aaagccattg cttttgaagt
421 tattaaagtc tgttggtgca caaaaagaca cttatactat gaaagaggtt ctttttatc
481 ttggccagta tattatgact aaacgattat atgatgagaa gcaacaacat attgtatatt
541 gttcaaatga tcttctagga gatttgtttg gcgtgccaag cttctctgtg aaagagcaca
601 ggaaaatata taccatgatc tacaggaact tggtagtagt caatcagcag gaatcatcgg
661 actcaggtag atctgtgagt gagaacaggt gtcaccttga aggtgggagt gatcaaaagg
721 accttgtaga agagcttcag gaagagaaac cttcatcttc acatttggtt tctagaccat
781 ctacctcatc tagaaggaga gcaattagtg agacagaaga aaattcagat gaattatctg
841 gtgaacgaca aagaaaacgc cacaaatctg atagtatttc ctttccttt gatgaaagcc
901 tggctctgtg tgtaataagg gagatatggt gtgaaagaag cagtagcagt gaatctacag
961 ggacgccatc gaatccggat cttgatgctg gtgtaagtga acattcaggt gattggttgg
1021 atcaggattc agtttcagat cagtttagtg tagaatttga agttgaatct ctgactcag
1081 aagattatag ccttagtgaa gaaggacaag aactctcaga tgaagatgat gaggtatatt
1141 aagttactgt gtatcaggca ggggagagtg atacagattc atttgaagaa gatcctgaaa
1201 tttccttagc tgactattgg aatgcactt catgcaatga aatgaatccc cccttccat
      ----- MDM7 ----->
1261 cacattgcaa cagatggttg gcccttcgtg agaattggct tctgaagat aaagggaaag
1321 ataaagggga aatctctgag aaagccaaac tggaaaactc aacacaagct gaagagggct
1381 ttgatgttcc tgattgtaaa aaaactatag tgaatgattc cagagagtca tgtggtgagg
1441 aaaatgatga taaaattaca caagcttcac aatcacaaga aagtgaagac tattctcagc
      -----<
1501 catcaacttc tagtagcatt atttatagca gccagaaga tgtgaaagag tttgaaaggg
      - MDM2 -
1561 aagaaaccca agacaaagaa gagagtgtgg aatctagttt gcccttaat gccattgaac
1621 cttgtgtgat ttgtcaaggt cgacctaaaa atggttgcac tgtccatggc aaaacaggac
```

Fortsetzung Sequenz *MDM2*-cDNA

8.2 Genbank-Einträge der bisher veröffentlichten *MDM2*-Spleißvarianten

1. **FB55:** Accession-No.: AF385327
Homo sapiens MDM2 variant FB55 (MDM2) mRNA, complete cds, alternatively spliced
2. **FB30:** Accession-No.: AF385326
Homo sapiens MDM2 variant FB30 (MDM2) mRNA, complete cds, alternatively spliced
3. **FB29:** Accession-No.: AF385325
Homo sapiens MDM2 variant FB29 (MDM2) mRNA, complete cds, alternatively spliced
4. **FB28:** Accession-No.: AF385324
Homo sapiens MDM2 variant FB28 (MDM2) mRNA, complete cds, alternatively spliced
5. **FB26:** Accession-No.: AF385323
Homo sapiens MDM2 variant FB26 (MDM2) mRNA, complete cds, alternatively spliced
6. **FB25:** Accession-No.: AF385322
Homo sapiens MDM2 variant FB25 (MDM2) mRNA, complete cds, alternatively spliced
7. **EU2:** Accession-No.: AJ278978
Homo sapiens mRNA for p53-binding protein (MDM2 gene), alternatively spliced variant EU2
8. **PM2:** Accession-No.: AJ278977
Homo sapiens mRNA for p53-binding protein (MDM2 gene), alternatively spliced variant PM2
9. **IS1:** Accession-No.: AJ278976
Homo sapiens mRNA for p53-binding protein (MDM2 gene), alternatively spliced variant IS1
10. **KB2:** Accession-No.: AJ278975
Homo sapiens mRNA for p53-binding protein (MDM2 gene), alternatively spliced variant KB2
11. **DS2:** Accession-No.: AJ276888
Homo sapiens non-productive mRNA for p53-binding protein, alternatively spliced variant DS2 (MDM2 gene)

8.3 Zusammenfassung klinischer und molekularer Daten der WTS-Patienten

Tab. 8-1: Zusammenfassung der klinischen und molekulareren Daten der WTS-Patienten

Schlüssel	Tumor- art ^s	Gesch	verst.	ÜZT	Grad	Stad	Spleiß	MDM2- Ampl	ARF	TP53/Actin	MDM2/Actin
24/92	Fibro	m	nein	31	1	12	ja	ja		0,37	0,03
47/92	Lipo	w	ja	38	3	32	ja	nein		0,00	0,00
48/92	Fibro	m	nein	94	2	22	ja	ja		0,00	0,00
54/92	MFH	w	nein	63	3	31	ja			0,00	0,01
59/92	Lipo	w	nein	23	2	22	nein	nein		0,00	0,06
1/93	Lipo	w	nein	58	1	12	ja			0,00	0,19
2/93	MFH	m	nein	60	3	31	nein	nein		0,00	0,04
7/93	andere	w	ja	11	3	32					
20/93	LMS	w	ja	25	1	12	nein	ja		0,09	0,01
23/93	Fibro	m	nein	104	1	12					
5/94	MFH	m	nein	20	3	31	nein	nein		0,06	0,00
11/94	syn	m	nein	124	2	22	nein	ja		0,26	0,41
28/94	neuro	w	ja	16	3	32	ja	nein		0,08	0,01
45/94	MFH	w	ja	57	3	32	ja	nein		0,31	0,00
1/95	neuro	m	nein	4	2	22	ja			0,73	0,00
12/95	LMS	w	nein	10	2	22	ja	ja		0,07	0,00
16/95	MFH	w	nein	31	2	22	ja				
23/95	Lipo	m	nein	6	1	12	ja	ja		0,03	0,00
37/95	NB	m	ja	5	3	42	ja			0,53	0,00
11/96	neuro	w	ja	14	3	32	nein			0,02	0,00
LZ1	MFH	w	nein	63	2	22	ja	nein	ja		
LZ2	MFH	w	ja	7	3	32	ja	nein	ja		
LZ3	Lipo	w	ja	68	2	22	nein	ja	ja	0,00	0,70
LZ4	Fibro	m	nein	94	2	22	nein	nein	ja		
LZ5	LMS	w	ja	23	3	32	ja	nein	ja		
LZ6	neuro	m	nein	35	2	21	nein	nein	ja		
LZ7	MFH	m	ja	26	2	22	nein	nein	0	0,07	0,15
LZ8							nein	ja	ja	0,05	0,29
LZ9	Lipo	w	nein	38	1	12	ja	ja	ja	0,00	0,12
LZ10	Lipo	m	nein	35	2	22	nein	nein	ja	0,04	0,02
LZ11	Lipo	m	ja	11	2	22	nein	nein	ja	0,40	0,14
LZ12							nein	nein		0,14	0,08
LZ13	RMS		ja	2	3	42	ja	nein	ja	0,40	0,16
LZ14	Fibro	w	nein	34	1	12	nein	nein	0	0,18	0,00
LZ15	syn	m	nein	57	2	22	ja	nein	ja	0,18	0,09
LZ16							ja	nein	ja	0,01	0,02
LZ17	Lipo	w	nein	37	1	12	ja	nein		0,02	0,05
LZ18	9	m		13	2	41	ja	nein	ja	0,06	0,05
LZ19							nein	ja	ja	0,05	0,00
LZ20	MFH	w	ja	3	3	32	ja	nein	ja	0,10	0,005
LZ21	Lipo	m	nein	37	1	12	nein	nein	ja	0,00	0,04
LZ22							nein	nein	ja	0,52	0,12
LZ23	MFH	w	ja	6	3	32	nein	nein	ja	0,15	0,07
LZ24	neuro	w	nein	31	2	22	nein	nein	ja	0,01	0,05
LZ25	Lipo	m	nein	35	1	12	nein	ja	ja	0,00	0,01
LZ26	Lipo	w	nein	23	1	12	nein	nein	ja	0,00	0,03

Tab. 8-1: Fortsetzung

Schlüssel	Tumorart	Gesch	verst.	ÜZT	Grad	Stad	Spleiß	MDM2-Ampl	ARF	TP53/Actin	MDM2/Actin
LZ27	MFH	w	nein	34	2	22	nein	nein	ja	0,01	0,00
LZ28	RMS	w	ja	8	3	41	ja			0,04	0,01
LZ29	RMS	m	ja	18	3	32	ja	nein	nein		0,00
LZ30	Lipo	w	ja	18	2	22	ja	nein	nein	0,97	0,19
LZ31	Fibro	m	ja	96	2	21	nein	nein	ja		
LZ32	Fibro	m	ja	96	2	21	ja	ja	ja	0,38	0,04
LZ33	MFH	m	nein	25	3	32	ja	nein	ja	0,46	0,00
LZ34	RMS	w	ja	3	3	42	0	nein	ja		0,18
LZ35	LMS	w	ja	26	2	22	0	nein	nein	0,83	0,01
LZ36	Lipo	w	nein	31	1	12	ja	ja	ja	0,89	0,00
LZ37	MFH	w	ja	25	3	31	nein	ja	ja	0,28	0,00
LZ38	syn	w	nein	105	2	21	ja	nein	ja	0,36	0,00
LZ45	MFH	m	ja	80	2	21			nein		
LZ46	neuro	w	nein	30	1	21	ja	ja	ja	0,43	0,27
LZ47	Lipo	m	ja	19	3	31	ja	nein	ja	0,22	0,11
LZ48	Lipo	m	nein	32	1	21	nein	ja	ja	0,58	0,22
LZ49	LMS	w	nein	30	2	42	ja	nein	ja	0,51	0,14
LZ50	neuro	m	nein	30	1	21	ja		ja	0,17	0,08
LZ51	NB	m	nein	29	2	22	ja	nein	ja	0,61	0,19
LZ52	Lipo	w	ja	18	2	22	ja	nein	ja	0,00	0,16
LZ53	Lipo	m	nein	27	1	11	nein	nein	ja	0,02	0,03
LZ54	LMS	m	nein	4	3	32	ja	ja	ja	0,56	0,08
LZ55	NB	m	ja	9	2	42	ja	nein	nein	0,70	0,31
LZ56	Lipo	w	ja	32	2	22	ja		ja	1,61	0,24
LZ57	MFH	w	nein	24	3	32	ja	nein	ja	0,28	0,19
LZ58	RMS	w	nein	26	3	32	ja	nein	ja	0,00	0,03
LZ59	Lipo	w	nein	26	1	12	nein	ja	ja	0,00	0,35
LZ60	LMS	w	nein	37	2	22	ja	nein	ja	0,01	0,84
LZ61	Lipo	m	nein	24	1	12	ja	nein	ja	0,44	0,08
LZ62								nein			
LZ63	LMS	w	1	44	2	22				0,78	0,01
LZ64	MFH	m	nein	30	3	32				0,62	0,13
LZ65	andere	m	ja	2	3	42				0,00	0,00
LZ66	LMS	w	nein	37	3	31				0,24	0,09
LZ67	NB	m	nein	86	2	22				0,69	0,30
LZ68	MFH	w	nein	14	3	32	ja	nein			
LZ69							ja	nein			
LZ70	LMS	m	nein	16	2	22	nein	nein			
LZ71	LMS	w	nein	13	1	12	v	nein			
LZ72				15			nein	nein			
LZ73	MFH	w	nein	12	3	32	ja	nein			
LZ74							ja				
LZ75							ja	ja	ja		
LZ76	LMS	w	nein	15	2	22	nein	ja	nein		
LZ77	Lipo	m	nein	16	2	22	nein	nein	ja		
LZ78	MFH	m	nein	50	3	32	nein	ja	ja		
LZ79	LMS	m	nein	12	3	32	ja	nein	ja		
LZ80	syn	w	nein	107	2	22	nein		ja		

§ Verschlüsselung der klinischen Daten

Schlüssel: interne Schlüsselnummer des Patienten

Tumorart: - Lipo – Liposarkom
- Fibro – Fibrosarkom
- MFH – malignes fibröses Histiozytom
- neuro – neurogenes Sarkom
- RMS – Rhabdomyosarkom
- Leio – Leiomyosarkom
- syn – synoviales Sarkom
- NB – Neuroblastom

Gesch – Geschlecht: m – männlich, w – weiblich

verst. – während der Beobachtungszeit am Tumor verstorben: ja/nein

ÜZT – Überlebenszeit des Patienten in Monaten

Grad – Grading des Primärtumors

Stad – Stadium des Primärtumors

Spleiß – *MDM2*-mRNA-Spleißvariante(n) nachgewiesen: ja/nein

MDM2-Ampl – Amplifikation des *MDM2*-Gens

ARF – *p14ARF*-mRNA-Expression nachgewiesen: ja/nein

TP53/Actin: Verhältnis der Intensitäten der TP53- und der Actin-Bande im Western Blot

MDM2/Actin: Verhältnis der Intensitäten der MDM2- und der Actin-Bande im Western Blot

8.4 Zusammenfassung der *MDM2-AS*-Therapiestudien

Tab. 8-2: Zusammenfassung der Daten der Versuchsreihe 1

Tier-Nr.	Therapie	Tiergewicht (g)	Tumormasse (g)	Tumorzahl
1	100 µg <i>MDM2-AS</i>	219	12,2	3
2	100 µg <i>MDM2-AS</i>	182	5,8	3
3	100 µg <i>MDM2-AS</i>	183	2,82	1
4	100 µg <i>MDM2-AS</i>	192	1,5	4
5	200 µg <i>MDM2-AS2</i>	167	6,8	5
6	200 µg <i>MDM2-AS2</i>	180	5,2	4
7	200 µg <i>MDM2-AS2</i>	179	5,8	6
8	200 µg <i>MDM2-AS2</i>	212	6,5	5
9	bidest	226	4,16	3
10	bidest	182	5,5	4
11	bidest	207	6,96	3
12	bidest	202	5	5
13	100 µg SE-ODN	210	13,6	2
14	100 µg SE-ODN	195	14,7	2
15	100 µg SE-ODN	184	8,24	6
16	100 µg SE-ODN	184	15,4	2

Tab. 8-3: Zusammenfassung der Daten der Versuchsreihe 1

Tier-Nr.	Therapie	Tumormass	Tumorzahl	MDM2/Actin	TP53/Actin
1/7	AS 100 µg	1,25	4		1,87
2/7	AS 100 µg	0,71	3	0,11	0,42
3/7	AS 100 µg	1,16	3	0,02	0,39
4/7	AS 100 µg	1,08	2	0,02	0,42
5/7	AS 100 µg	0,63	2	0,02	0,48
6/7	AS 100 µg	0,5	2	0,03	
7/7	AS 100 µg	2,16	1		0,21
8/7	AS 200 µg	0,17	1	0,01	
9/7	AS 200 µg	1,34	3		3,33
10/7	AS 200 µg	0,25	1	0,22	
11/7	AS 200 µg	0,92	4		1,48
12/7	AS 200 µg	0,3	2	0,08	
13/7	AS 200 µg	1,3	3		
14/7	AS 200 µg	1,24	2		0,78
22/7	SE 100 µg	3,2	2		2,43
23/7	SE 100 µg	1,95	5	0,22	1,86
24/7	SE 100 µg	1,07	5		1,86
25/7	SE 100 µg	2,36	3	0,08	2,18
26/7	SE 100 µg	0,15	2		
39/7	phys. Kochsalz.	2,4	3		3,37
40/7	phys. Kochsalz	2,8	4	0,03	9,07
41/7	phys. Kochsalz	4,7	5	0,46	3,26
42/7	phys. Kochsalz	1	4	0,19	1,06
43/7	phys. Kochsalz	2,3	6	0,24	2,68

[§] TP53/Actin: Verhältnis der Intensitäten der TP53- und der Actin-Bande im Western Blot

MDM2/Actin: Verhältnis der Intensitäten der MDM2- und der Actin-Bande im Western Blot

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt zu haben. Ich habe keine anderen als die im Literaturverzeichnis angeführten Quellen benutzt und sämtliche Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen wurden, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, als solche kenntlich gemacht. Ebenfalls sind alle von anderen Personen bereitgestellten Materialien oder erbrachten Leistungen als solche gekennzeichnet.

A handwritten signature in blue ink that reads "Frank Bartel". The signature is written in a cursive style with a large initial 'F' and 'B'.

Halle/Saale, 24. Februar 2002

Frank Bartel

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. habil. Friedrich-Wilhelm Rath für die Überlassung dieses interessanten und herausfordernden Themas meiner Dissertation sowie für seine vielseitige und großzügige Unterstützung der Forschungsarbeiten unserer Arbeitsgruppe Molekularpathologie über viele Jahre hinweg bedanken.

Während der Anfertigung meiner Arbeit bin ich im Wesentlichen von meinem Betreuer PD Dr. Helge Taubert gelenkt, unterstützt und durch seinen unerschütterlichen Optimismus auch immer wieder aufgebaut worden. Des Weiteren bin ich PD Dr. Peter Würfl zu Dank verpflichtet, der als klinischer Partner die Arbeit durch seine konstruktiven Diskussionen und die Bereitstellung der Tumorproben wesentlich vorangetrieben hat.

Frau Dr. Hannelore Schmidt als Arbeitsgruppenleiterin gilt mein besonderer Dank für die Schaffung und Wahrung einer wohltuenden Arbeitsatmosphäre.

Des Weiteren möchte ich folgenden Kollegen für ihre Unterstützung bei meiner Arbeit danken: den technischen Assistentinnen der Arbeitsgruppe Molekularpathologie/ Gewebzüchtung (Frau Birgit Wypior, Frau Ute Rolle, Frau Ilona Wiederhold) für die allseitige und exzellente Hilfe, Dipl.-Biol. Matthias Kappler für seine Unterstützung bei den zahllosen RT-PCRs und Klonierungen und die vielen kritischen Diskussionen, Frau Dipl.-Bioch. Katja Schuster für die Bereitstellung unveröffentlichter Daten sowie den DiplomandInnen unserer Arbeitsgruppe für ihre hilfreiche Mitarbeit am Gesamtkonzept.

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

Die Sequenzanalysen wurden freundlicherweise von Frau Dr. Barbara Thamm am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Leipzig (AöR) und von Herrn PD Dr. Georg Kaltenborn am Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung der Medizinischen Fakultät der Universität Halle durchgeführt.

Ein weiterer besonderer Dank gilt Frau Dr. Anne-Kathrin Rost und Herrn Dr. Thomas Köhler der Fa. Roboscreen (Leipzig) für die Entwicklung eines Assays zur Echtzeit-Quantifizierung des Transkripts der Spleißvariante MDM2-B.

Alle Arbeiten mit Adenoviren, die ich an der Martin-Luther-Universität durchgeführt habe, erfolgten im S2-Labor der Klinik für Neurochirurgie der Medizinische Fakultät der MLU. Die Laborkapazitäten wurden mir freundlicherweise von Prof. N. Rainov zur Verfügung gestellt.

Furthermore, I wish to thank Dr. Linda Harris and Prof. Peter Houghton from the Department of Molecular Pharmacology of the St. Jude Children's Research Hospital (Memphis, TN) for giving me the possibility to work a couple of months in their lab. I have experienced a very nice and fruitful working atmosphere at St. Jude, inspired by the motto of the founder, the late Danny Thomas: "No child should die in the dawn of life". I also would like to thank the members of Linda Harris' lab, Alan, Misty, Pam, Queen and Amy, for their hospitality, as well as, for teaching me everything about adenoviruses, and, last but not least, for their patience with my imperfect English. "John, Speak slowly please!" – you know?

My gratitude also applies for the American Lebanese Syrian Associated Charities (ALSAC) and the St. Jude Children's Research Hospital (SJCRH) to the generous financial support of my working stay at the SJCRH (Memphis, TN).

Ferner danke ich Dr. Jane Stommel vom Gene Expression Laboratory am Salk Institute in San Diego (CA, USA), Dr. Ute Moll vom Department of Pathology an der State University of New York (Stony Brook, NY, USA), Dr. Stephen Jones vom Baylor College of Medicine (Houston, TX, USA) sowie Dr. Jan Taplick vom Weizmann-Institut in Rehovot (Israel) für die spannenden und überaus konstruktiven Diskussionen über MDM2 und die Überlassung unveröffentlichter Daten.

Wichtige Ergebnisse dieser Arbeit wurden von mir auf mehreren internationalen Kongressen in Form von Posterbeiträgen vorgestellt, u.a. auf dem Keystone-Symposium „The molecular basis of cancer“ im März 1999 in Taos, NM, auf der AACR-Jahrestagung, im April 2000 in San Francisco, CA, und im März 2001 in New Orleans, LA. Des Weiteren hatte ich die Gelegenheit, die Forschungsarbeit unsere Arbeitsgruppe auf dem 4. Internationalen Kongress über Fortschritte in der Onkologie (Oktober 2001, Hersonissos, Kreta) und auf dem 1. Internationalen MDM2-Workshop in Dundee (Schottland, November 2001) als eingeladener Sprecher zu präsentieren. Diese Kongresse wurden finanziell von der GlaxoSmithKline-Stiftung (München) sowie der Fa. Promega unterstützt, wofür ich mich herzlich bedanken möchte.

Mein besonderer Dank gilt meiner Frau Marion und meinen Eltern für ihre vielfältige Unterstützung und den steten Zuspruch bei der Anfertigung der Arbeit sowie meinem Sohn Jasper, der mich beim Schreiben mit seinem Lachen immer wieder aufgemuntert hat.

Curriculum vitae

Frank Bartel

Anschrift Cöthner Str. 55
 04155 Leipzig

Familienstand verheiratet
 1 Kind

22.04.72 geb. in Ludwigslust

1978 - 1988 Besuch der Polytechnischen Oberschule "Willy Bredel" in
 Ludwigslust

1988- 1990 Besuch des Gymnasiums "Johann Wolfgang Goethe" in
 Ludwigslust

1990 Abitur

1990 - 1991 Wehrdienst

Wissenschaftlicher Werdegang

1991-1996 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-
 Wittenberg

1996 Abschluss des Studiums als Diplombiochemiker (Spezialisierung Immu-
 nologie, Molekularbiologie) am Institut für Medizinische Immunologie
 (Prof. Langner)

1996 – 1998 wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universität Leipzig Institut für
 Immunologie und Transfusionmedizin, Abt. für Medizinische Biotechno-
 logie (Prof. Emmrich, Dr. Uwe Marx)

seit 1998 wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universität Halle-Wittenberg Insti-
 tut für Pathologie, Abt. Molekularpathologie (Prof Rath, Dr. Helge Tau-
 bert)

10 – 12/2000 Gastwissenschaftler am St. Jude Children's Research Hospital, Mem-
 phis, TN, USA, Dept. of Molecular Pharmacology

