

Aus dem Institut für Pathologie
der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Ärztlicher Direktor: PD Dr. T. Klöss)

**Prognostische Bedeutung von Mutationen und
Polymorphismen im p53-Tumorsuppressorpathway
in Ovarialkarzinomen**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

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

von

Juliane Jung

geboren am 17.04.1981 in Neuruppin

Betreuer: PD Dr. F. Bartel

Gutachter: Prof. Dr. J. Dittmer (Universität Halle-Wittenberg)

Prof. Dr. J. Sehouli (Universität Berlin)

Eröffnungsdatum: 01.11.2011

Datum der Verteidigung: 07.05.2012

Meinen Eltern

Referat

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, in Ovarialkarzinomen und Borderline-Tumoren Alterationen im p53-MDM2-Pathway zu finden und deren prognostische Relevanz zu untersuchen. Dabei standen die Analysen von Veränderungen auf DNA- und Proteinebene des Tumorsuppressors p53 und des Onkogens MDM2 im Vordergrund.

Das Patientenkollektiv bestand aus 107 Patientinnen mit epithelialen Ovarialkarzinomen und 64 Patientinnen mit Borderline-Tumoren, die zwischen 1997 und 2005 am Institut für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg diagnostiziert wurden.

Dieses Kollektiv wurde hinsichtlich des p53-Mutations- und Expressionsstatus untersucht. Zusätzlich wurde der Status des SNP309-Polymorphismus im P2-Promotor des MDM2-Gens sowie der Expressionsstatus des Östrogenrezeptors analysiert.

Die erhaltenen Ergebnisse wurden mit klinischen Daten wie Alter bei Diagnosestellung, Tumorstadium, Resttumor, Gesamtüberleben und Ansprechen auf Chemotherapie korreliert, um Auswirkungen in Hinblick auf die Prognose der Patientinnen zu ermitteln.

Es konnte gezeigt werden, dass Patientinnen mit Veränderungen im p53-Pathway generell eine schlechtere Prognose haben, eine verkürzte Überlebenszeit aufweisen und schneller ein Rezidiv entwickeln. Patientinnen, deren Tumoren das Wildtyp-p53-Protein überexprimierten, zeigten dabei die kürzeste Überlebenszeit. Die alleinige Betrachtung von Mutationen im p53-Gen hatte keine prognostische Bedeutung bei Ovarialkarzinompatientinnen. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die isolierte Betrachtung des p53-Gen- und Proteinexpressionsstatus wenig prognostische Aussagekraft besitzt. Darüber hinaus zeigte sich, dass Patientinnen mit p53-Veränderungen (Mutation und/oder Überexpression) signifikant resistenter gegenüber der Chemotherapie waren und häufiger an einem Frührezidiv erkrankten als Frauen, deren Tumoren p53-Wildtypsequenz besitzen und keine nachweisbare p53-Proteinexpression aufwiesen. Zudem stützen unsere Ergebnisse die Hypothese, dass das G-Allel des SNP309 einen intakten Östrogen-Signalweg benötigt, um die Tumorentstehung zu beschleunigen. Denn das Vorliegen des G-Allels ist mit einem früheren Alter des Tumorauftritts bei Ovarialkarzinompatientinnen verbunden, deren Tumoren eine starke Östrogenrezeptor-Expression aufwiesen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Ovarialkarzinom	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Risikofaktoren	1
1.1.3	Symptome und Diagnose	1
1.1.4	Prognosefaktoren	2
1.1.5	Histologische Klassifikation der Ovarialkarzinome	3
1.1.6	Borderline-Tumoren	4
1.1.7	Therapie des Ovarialkarzinoms	5
1.1.8	Molekulare Mechanismen der Tumorentstehung und deren Progression	6
1.2	Das Tumorsuppressorgen p53	7
1.2.1	Die Struktur von p53	7
1.2.2	Funktionen von p53	8
1.3	Das Onkogen MDM2	9
1.3.1	Die Struktur von MDM2	9
1.3.2	Funktionen von MDM2	10
1.4	SNP309 des MDM2	10
1.5	Der p53-MDM2 autoregulatorische Feedback-Loop	11
1.6	p53 und MDM2 als prognostische Indikatoren in Ovarialkarzinomen	12
1.7	Zielstellung	13
2	Material	14
2.1	Tumormaterial	14
2.2	Chemikalien und Reagenzien	15
2.3	Enzyme	16
2.4	Kits	16
2.5	Antikörper	16
2.6	Primer	16
2.7	Geräte und Verbrauchsmaterialien	17
2.8	Puffer und Lösungen	18
3	Methoden	19
3.1	DNA- Isolation aus Paraffinmaterial	19
3.1.1	Konzentrationsbestimmung	20
3.2	Polymerasekettenreaktion (PCR)	20
3.3	Sequenzierreaktion und Reinigung der Sequenzierprodukte	21
3.4	DNA-Arbeiten	22
3.4.1	Agarose-Gelelektrophorese	22

3.4.2	Isolierung der DNA aus Agarose-Gelen	22
3.4.3	TBE-Gelelektrophorese	22
3.4.4	Immunhistochemie	23
3.5	Statistische Analysen	24
4	Ergebnisse	25
4.1	Patientenkollektiv	25
4.2	Mutationsanalyse von p53	26
4.2.1	Ergebnisse der SSCP-Gele der Ovarialkarzinome	26
4.2.2	Ergebnisse der Sequenzierung der Ovarialkarzinome	27
4.2.3	Ergebnisse der SSCP-Gele der Borderline-Tumoren	29
4.2.4	Ergebnisse der Sequenzierung der Borderline-Tumoren	29
4.3	p53-Proteinexpression	29
4.3.1	p53-Expression in Ovarialkarzinomen	29
4.3.2	p53-Expression in Borderline-Tumoren	30
4.4	Verhältnis von p53-Expression und Genstatus	30
4.5	Zusammenhang zwischen p53-Status und klinischen Daten	32
4.5.1	Korrelation zwischen p53-Status und Histologie	32
4.5.2	Korrelation zwischen p53-Status und FIGO-Stadium	33
4.5.3	Korrelation zwischen p53-Status und Aszites	33
4.5.4	p53-Status und Nachweis von Resttumor	34
4.5.5	p53-Status, Ansprechen auf Chemotherapie und Rezidivnachweis	34
4.5.6	Korrelation zwischen p53-Gesamtstatus sowie low-grade, high-grade und Borderline-Tumoren	36
4.6	SNP309-Allelfrequenz und Alter bei Diagnosestellung	37
4.6.1	SNP309-Status im MDM2-P2-Promotor	37
4.6.2	SNP309-Status in Borderline-Tumoren	40
4.7	Korrelation von p53- und SNP309-Status auf das Gesamtüberleben	40
4.7.1	p53-Mutationsstatus und Gesamtüberleben	40
4.7.2	p53-Expressionsstatus und Gesamtüberleben	41
4.7.3	p53-Gesamtstatus und Gesamtüberleben	41
4.7.4	SNP309-Status und Gesamtüberleben	42
5	Diskussion	46
5.1	Analyse des p53-Status	46
5.2	Analyse des MDM2-SNP309	50
5.3	Zusammenfassung	52
6	Literaturverzeichnis	54
7	Anhang	61

8	Thesen
---	--------

62

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APST	atypisch proliferativer Tumor („atypical proliferative tumor“)
bidest.	bidestilliert
BOT	Borderline-Tumor(en)
bp	Basenpaar(e)
ca.	circa
CA	Cancer Antigen
cm	Zentimeter
Del.	Deletion
DNA	Desoxyribonukleinsäure („desoxy ribonucleic acid“)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat(e)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Östrogenrezeptor
et al.	et altera
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d`Obstétrique
g	Gramm
h	Stunde
Ig	Immunglobulin(e)
IHC	Immunhistochemie
L	Liter
mA	Milliampere
max.	maximal
MDM2	„murine double minute 2“
min	Minute
MPSC	mikropapillär seröses Karzinom („micropapillary serous carcinoma“)
µL	Mikroliter
ng	Nanogramm
OD	optische Dichte
OVCA	Ovarialkarzinom(e)
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung („phosphate buffered saline“)
PCR	Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“)
pmol	Pikomol
Rb	Retinoblastom
RING	„really interesting new gene domain“
RR	relatives Risiko („Hazard ratio“)

RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde(n)
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus („single nucleotid polymorphism“)
SSCP	„single strand conformation polymorphism“
Tab.	Tabelle
TBE	Tris/Borsäure/EDTA
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
U	Unit
U/min	Umdrehungen/min
UV	ultraviolett
ÜN	über Nacht
V	Volt
vs.	versus
wt	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Das Ovarialkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das Ovarialkarzinom ist nach dem Endometrium- und Zervixkarzinom der dritthäufigste maligne Genitaltumor der Frau in der westlichen Welt. Er weist jedoch von den gynäkologischen Tumoren die höchste Sterblichkeitsrate auf [1]. Mit über 9900 Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland ist es die fünfthäufigste Malignomerkrankung bei Frauen [2]. Das Manifestationsalter liegt zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr, der Tumor kann aber auch bei jungen Mädchen auftreten. Zu Beginn ihrer Entwicklung verursachen Ovarialtumoren keine charakteristischen Frühsymptome, so dass sich zum Zeitpunkt der Diagnosestellung mehr als die Hälfte der Patientinnen bereits in einem fortgeschrittenen Tumorstadium befinden [3]. Dies erklärt den prognostisch ungünstigen Verlauf der Ovarialkarzinome.

1.1.2 Risikofaktoren

Bezüglich der Anzahl der Neuerkrankungsfälle des Ovarialkarzinoms und somit auch der Mortalität bestehen zwischen unterschiedlichen Bevölkerungsgruppen und in verschiedenen Ländern der Erde erhebliche Unterschiede. In den hoch entwickelten Industrieländern Westeuropas und Nordamerikas zeigen sich hohe Inzidenzraten. Im Vergleich dazu sind in den wenig entwickelten Ländern Asiens und Afrikas die Inzidenzraten niedrig [4].

Ein Risikofaktor ist neben familiärer Veranlagung (Ovarialkarzinomfamilien, Ovarial-Mamma-Karzinomfamilien, Li-Fraumeni-Syndrom) das Alter der Frauen [5,6]. Auch hormonelle Einflüsse scheinen Bedeutung für die Tumorentstehung in Ovarien zu haben. Eine frühe Menarche, eine späte Menopause, Kinderlosigkeit oder fehlende Stillzeiten wirken sich ungünstig aus. Hingegen sind hormonelle Ovulationshemmer, Schwangerschaften und Laktation mit einem reduzierten Risiko verbunden [7]. Eine mögliche Erklärung liefert die Incessant-ovulation-Hypothese. Dabei begünstigen regelmäßige Ovulationen mit Ruptur des ovariellen Oberflächenepithels und nachfolgender reparativer Proliferation die maligne Transformation von epithelialen Zellen [8].

1.1.3 Symptome und Diagnose

Ovarialkarzinome verursachen unabhängig von ihrer Dignität selten Frühsymptome. Deshalb sind Diagnosen in Frühstadien meist nur Zufallsbefunde. Fassbare Symptome treten relativ spät auf. Zu ihnen gehören Zyklusstörungen, Dysmenorrhoe, Blutungen in der Postmenopause,

unklare diffuse Unterleibsbeschwerden, Zunahme des Leibesumfanges und Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens.

Eine sichere Methode zur Früherkennung von malignen Ovarialtumoren gibt es bisher nicht. Bei Verdacht auf ein Karzinom erfolgt eine gynäkologische Untersuchung in Verbindung mit einer vaginalen Ultraschalldiagnostik. Zur Abklärung der Diagnose erfolgt des Weiteren die Bestimmung des Tumormarkers CA (Cancer Antigen) 125 im Blut. Erhöhte Konzentrationen des Markers sind bei der Mehrheit der Patientinnen im fortgeschrittenen Tumorstadium nachzuweisen. Es können jedoch auch falsch positive Werte bei Leber- oder anderen entzündlichen intraabdominellen Erkrankungen auftreten. Zuverlässigere Aussagen anhand des CA 125-Wertes lassen sich nach chirurgischer und systemischer Primärchirurgie bei Ovarialkarzinompatientinnen im Sinne der Verlaufskontrolle machen. Auch bildgebende Verfahren wie Computer- oder Kernspintomographie werden zur Beurteilung des Befundes durchgeführt. Mit eindeutiger Sicherheit lässt sich ein Ovarialtumor jedoch nur mittels laparoskopischer Entnahme einer Gewebeprobe und deren histologischer Untersuchung feststellen.

1.1.4 Prognosefaktoren

Die Prognose von Patientinnen mit Ovarialkarzinomen wird in erster Linie durch klinische Indikatoren wie Stadium der Erkrankung, Histologie und Größe des Tumors, Erkrankungsalter und vor allem vom postoperativem Tumorrest bestimmt. Tumorbiologische Faktoren, die direkt auf den malignen Eigenschaften der Tumorzelle wie Proliferation, Invasion und Metastasierung beruhen, liefern wichtige Zusatzinformationen für den weiteren Verlauf. Frauen mit einem Ovarialtumor im Stadium FIGO I haben eine 5-Jahres-Überlebensrate von 80 - 90 %, im Stadium FIGO III liegt sie bei 25 - 40 % und im Stadium FIGO IV beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate nur noch 11 % [9]. Die Klassifikation ist ein von der Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO) vorgeschlagenes System zur Einteilung gynäkologischer Tumoren (Tab. 1).

Tabelle 1: FIGO-Stadien des Ovarialkarzinoms

<i>FIGO Stadium</i>		<i>Ausbreitung</i>
I		Tumor auf Ovarien begrenzt
	Ia	Tumor auf ein Ovar begrenzt; Kapsel intakt, kein Tumor auf der Oberfläche des Ovars, keine malignen Zellen in Aszites oder bei Peritoneallavage
	Ib	Tumor auf beide Ovarien begrenzt; Kapsel intakt, kein Tumor auf der Oberfläche beider Ovarien, keine malignen Zellen in Aszites oder bei Peritoneallavage
	Ic	Tumor begrenzt auf ein oder beide Ovarien mit Kapselruptur, Tumor an Ovaroberfläche oder maligne Zellen im Aszites oder bei Peritoneallavage
II		Tumor befällt ein Ovar oder beide Ovarien und breitet sich im Becken aus
	IIa	Ausbreitung auf und/oder Implantate an Uterus und/oder Tuben; keine malignen Zellen in Aszites oder bei Peritoneallavage
	IIb	Ausbreitung auf andere Beckengewebe, keine malignen Zellen in Aszites oder bei Peritoneallavage
	IIc	Ausbreitung im Becken und maligne Zellen im Aszites oder bei Peritoneallavage
III		Tumor befällt ein oder beide Ovarien mit mikroskopisch nachgewiesenen Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens und/oder regionären Lymphknotenmetastasen
	IIIa	Mikroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens
	IIIb	Makroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens, größte Ausdehnung < 2cm
	IIIc	Makroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens, größte Ausdehnung > 2cm, und/oder regionäre Lymphknotenmetastasen
IV		Fernmetastasen (ausschließlich Peritonealmetastasen)

1.1.5 Histologische Klassifikation der Ovarialkarzinome

Die Ovarien gehören zu den inneren weiblichen Geschlechtsorganen und liegen intraperitoneal beidseits des Uterus. Histologisch gliedert man das Ovarium in ein Oberflächenepithel, eine periphere Rindenschicht und eine zentrale Marksicht. Dem histologischen Aufbau des Ovars entsprechend, werden die Ovarialtumoren von der WHO (world health organization) und FIGO in die 3 folgenden Gruppen unterteilt: epitheliale Ovarialtumoren, Stromatumoren und Keimzelltumoren. Die vom Oberflächenepithel ausgehenden Tumoren machen mit mehr als 90% die Mehrheit der malignen Ovarialkarzinome aus. Daher beziehen sich im weiteren Verlauf die Erläuterungen auf diese Gruppe. Neben benignen und malignen Neoplasien werden bei den epithelialen Ovarialkarzinomen die Gruppe der Borderline-Tumoren unterschieden (=Tumoren mit niedrigem Malignitätspotential). Die Epitheltumoren werden nach der WHO-Klassifikation entsprechend dem Zelltyp eingeteilt in:

- seröse,
- muzinöse,
- endometroide,
- klarzellige sowie
- undifferenzierte Ovarialkarzinome.

Die serösen Karzinome sind der häufigste histologische Typ der Ovarialtumoren. Sie zeichnen sich durch Zysten mit serösem Inhalt und filigranartigen Papillen aus. Charakteristisch für muzinöse Neoplasien sind zystische Formationen, die mit einem schleimbildenden Epithel ausgekleidet sind. Endometroide Tumoren weisen endometroide Drüsenformationen auf. Das klarzellige Karzinom besteht aus zystischen oder papillären Drüsen, die aus hellen Epithelien aufgebaut sind. Tumoren, die histologisch nicht eindeutig zuzuordnen sind, fasst man zu undifferenzierten Ovarialkarzinomen zusammen.

1.1.6 Borderline-Tumoren

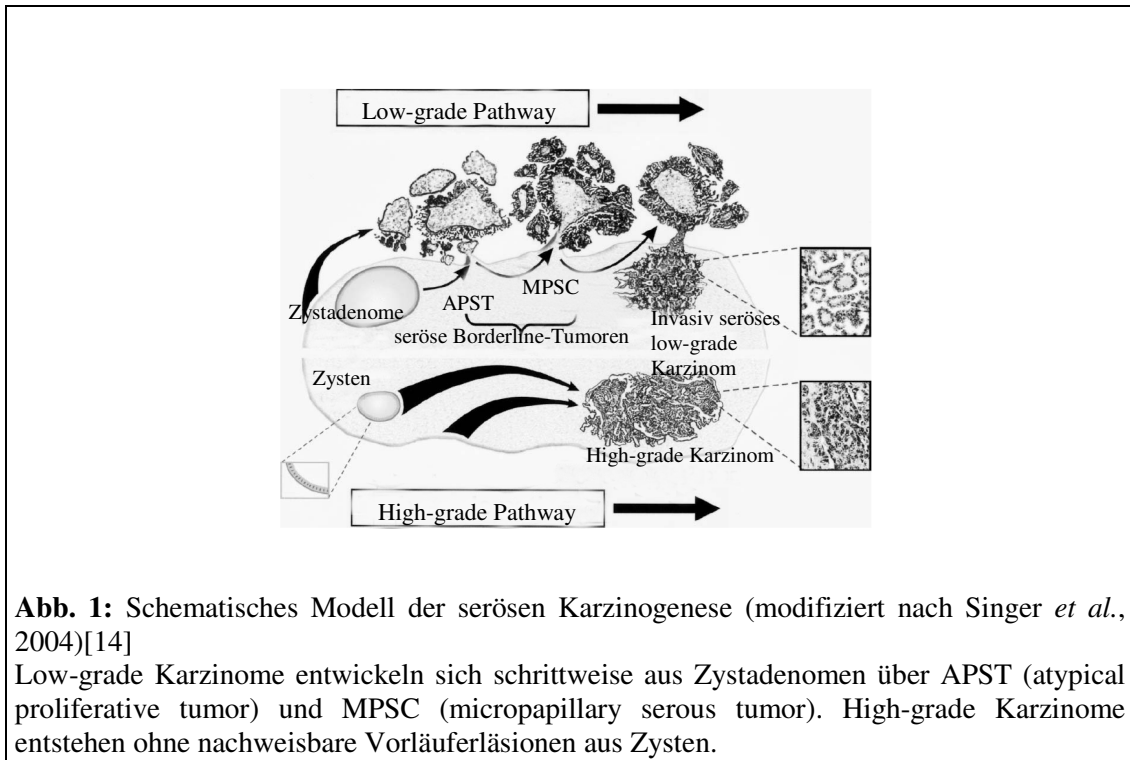
15 % der malignen epithelialen Ovarialtumoren gehören zur Gruppe der Borderline-Tumoren. Diese Gruppe fasst Tumoren zusammen, die eine signifikant bessere Prognose verglichen mit den invasiven Karzinomen haben, auch im fortgeschrittenen Tumorstadium und bei nur ungenügender Behandlung [10].

Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass es zwei unterschiedliche Wege der Tumorgenese gibt, entsprechend der Entstehung von serösen low-grade und high-grade Karzinomen. Dies führte zu der Annahme eines neuen Modells der serösen Karzinogenese, das zum einen die fehlende Assoziation von serösen Borderline-Tumoren mit serösen Karzinomen beinhaltet. Zum anderen beschreibt es das maligne Potential von serösen Borderline-Tumoren [11].

Seröse low-grade Karzinome entstehen schrittweise aus einem atypisch proliferativen Tumor (APST= atypical proliferative tumor), dessen Vorläufer ein exophytisch wachsender Tumor aus dem Oberflächenepithel oder ein seröses Zystadenom sein kann. Über das *in situ* Stadium des intraepithelialen mikropapillären serösen Karzinoms (MPSC= micropapillary serous carcinoma) kann es zur Bildung eines serösen invasiven low-grade Karzinoms kommen. Diese Karzinome sind häufig mit Mutationen der Onkogene KRAS oder BRAF assoziiert und weisen nur selten Mutationen im Tumorsuppressorgen p53 auf. Die atypisch proliferativen Tumoren und die serösen intraepithelialen low-grade Karzinome entsprechen den serösen Borderline-Tumoren (Abb. 1) [12].

Im Gegensatz dazu entwickeln sich die serösen high-grade Karzinome aus dem Oberflächenepithel des Ovars oder aus eingeschlossenen Zysten. Morphologisch erkennbare

Vorläuferläsionen konnten bisher nicht festgestellt werden, daher wird diese als *de novo*-Entwicklung bezeichnet. Seröse high-grade Karzinome weisen häufig p53-Mutationen, jedoch selten Mutationen des KRAS- bzw. BRAF-Gens auf [13].



1.1.7 Therapie des Ovarialkarzinoms

Jeder klinisch nachgewiesene Tumor des Ovars muss operativ entfernt und histologisch beurteilt werden. Das Ausmaß des Eingriffes wird vor allem von der Art des Tumors und dessen Ausbreitung bestimmt, aber auch das Alter und der Allgemeinzustand der Patientin sind zu berücksichtigen. Die Bedeutung der radikalen Primärchirurgie mit der vollständigen Entfernung des makroskopisch sichtbaren Tumorgewebes liegt in der verlängerten Überlebenszeit der Patientinnen. Während der Operation erfolgt die Exploration des gesamten Bauchraums und seiner Organe einschließlich einer Peritoneallavage des Beckens und die Bestimmung des Lymphknotenstatus. Einem optimalen Tumordebulking folgt bei fortgeschrittenen Stadien ab FIGO-Stadium IIb eine adjuvante Chemotherapie [15]. Als Standard wird eine Kombinationsbehandlung aus einem Platinanalogon und Taxol angewandt [16].

Platinhaltige Verbindungen gehören im weiteren Sinne in die Gruppe der alkylierenden Substanzen. Diese führen zur Quervernetzung von DNA-Einzel- und Doppelsträngen. Bei Taxol handelt es sich um einen Mitosehemmstoff, der durch pathologische Bildung und Stabilisierung der Mikrotubuli eine Störung der Mitose bewirkt und somit zum Zelltod führt [17].

Patientinnen mit Ovarialkarzinomen in frühen Stadien (FIGO Ia) erhalten keine zusätzliche adjuvante Therapie. Sie haben eine 5 Jahres-Überlebensrate von 90-95 % [18].

Rezidive bei Ovarialkarzinomen sind innerhalb eines relativ kurzen Zeitraumes sehr häufig. Es werden dabei „Platin-resistente“ und „Platin-sensitive“ Rezidive unterschieden. Treten innerhalb von 6 Monaten nach Abschluss der primären Therapie Rezidive auf, sind diese häufig durch eine Platinresistenz gekennzeichnet. Hingegen konnte beim Auftreten von Rezidiven nach über 2 Jahren bei bis zu 80 % ein Ansprechen auf eine erneute platinbasierte Therapie nachgewiesen werden [19]. Das bedeutet, je später das Rezidiv manifest wird, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit eines Ansprechens auf eine erneute Platinexposition.

So genannte Platin-resistente Ovarialkarzinome haben auch bei zahlreichen anderen Zytostatika eine schlechte Prognose. Remissionsraten von über 20 % werden nur selten erreicht. Die mediane progressionsfreie Überlebenszeit liegt bei etwa 22 Wochen. Die mediane Gesamtüberlebenszeit wird mit etwa 40 Wochen angegeben. Daher wird bei diesen Tumorpatientinnen beispielsweise die Behandlung mit Hemmstoffen der Topoisomerase (Topotecan) oder mit DNA-interkalierenden Substanzen (Doxorubicin) empfohlen [20].

Die Therapie des Ovarialkarzinoms führt oft nicht zur Heilung, bei Rezidiven ist die Heilung in der Regel unmöglich. Daher sind Faktoren, die die Chemoresistenzentwicklung beeinflussen und somit prognostischen Wert haben, von großem Interesse. Ein Schlüsselprotein für die zelluläre Antwort auf platinhaltige Chemotherapeutika ist p53. Die Funktionalität des Tumorsuppressors kann durch Mutationen oder Polymorphismen im p53-Gen verändert werden. Eine mögliche Ursache für die Chemoresistenz könnte daher im Fehlen von funktionsfähigem p53 liegen.

1.1.8 Molekulare Mechanismen der Tumorentstehung und deren Progression

Etwa 90 % aller Ovarialtumoren treten bei Patientinnen ohne erkennbaren familiär-hereditären Hintergrund auf. Sie werden als sporadische Ovarialkarzinome bezeichnet [21]. Die maligne Transformation der normalen Epithelzellen wird durch genetische Alterationen induziert, welche kontrollierte Vorgänge wie z.B. Zellproliferation, Apoptose oder Zellalterung stören oder deren geregelten Ablauf aufheben. Das Tumorsuppressorgen p53 nimmt eine zentrale Bedeutung in der Regulation des Zellüberlebens ein. Neben Missense- und Nonsense-Mutationen führen auch Frameshift-Mutationen im p53-Gen zu einem selektiven Vorteil bei der Entstehung und Ausbreitung neoplastischer Zellen [22]. Die häufigsten Veränderungen im p53-Gen sind Missense-Mutationen. Jedoch können auch bei Vorliegen von Wildtyp-p53 Veränderungen wie die Amplifikation des MDM2-Gens oder die Überexpression des MDM2-Proteins zu einer Blockade von p53 führen. In der Folge kann es zum unkontrolliertem Zellwachstum kommen [23]. Zusätzlich gibt es viele Hinweise darauf, dass MDM2 selbst eine

wichtige Rolle in der Zellzyklusregulation oder Tumorgenese spielt. Daher ist ein zentrales Ziel in der Forschung die Aufklärung der Rolle von p53 und MDM2 in der Karzinogenese sowie die Nutzung dieses Wissens in der Behandlung von Tumoren [24].

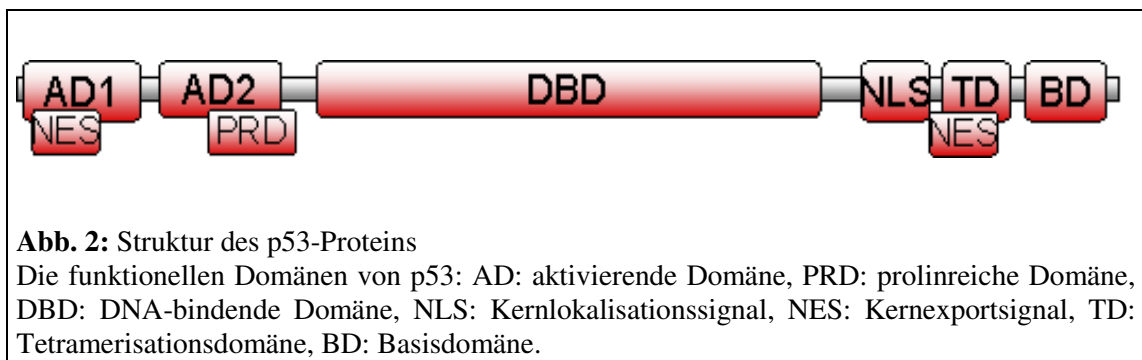
1.2 Das Tumorsuppressorgen p53

In zahlreichen Untersuchungen wird p53 als eine wichtige Kontrollinstanz für die Integrität der DNA angesehen. Es ist ein bedeutender Mediator der zellulären Wachstumskontrolle und wird daher auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet [25]. Als Tumorsuppressor registriert p53 veränderte Proliferationssignale und leitet entsprechende Maßnahmen ein, um so eine Transformation von beschädigten Zellen zu verhindern. Daher spielt es eine entscheidende Rolle zum Schutz vor einer potentiellen Tumorentstehung. Schlüsselmechanismen umfassen dabei u.a. die Einleitung des Zellzyklus-Arrests oder der Apoptose, die Zelldifferenzierung und die vorzeitige Alterung der Zelle [26]. p53 kann bei Zellschädigung direkt in DNA-Reparaturvorgänge eingreifen [27].

Aufgrund der entscheidenden Funktion, die p53 in Hinblick auf die Regulation des Zellzyklus und die Induktion der Apoptose besitzt, wird verständlich, dass enge Zusammenhänge zwischen dem Verlust der Tumorsuppressorfunktion von p53 und der Tumorentstehung bestehen. So werden in mehr als 50 % aller Tumoren Mutationen des p53-Gens gefunden [28].

1.2.1 Die Struktur von p53

Das Tumorsuppressorgen p53 kodiert für ein nukleäres Phosphoprotein, welches aus 393 Aminosäuren besteht. Das humane p53-Gen ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17 (17p13.1) lokalisiert.



Es lassen sich fünf funktionelle Domänen unterscheiden (Abb. 2). Am N-terminalen Ende befindet sich eine transaktivierende Domäne, welche mit Proteinen des Transkriptionsapparates interagiert. Eine spezifische DNA-Bindungsdomäne ist im zentralen Teil des Proteins

lokalisiert. Diese verleiht p53 die Fähigkeit, als Transkriptionsfaktor zu agieren. Die Region zwischen dem N-Terminus und der zentralen DNA-bindenden Domäne ist eine hydrophobe Domäne mit vielen Prolinresten. Eine Deletion dieser Region reduziert den p53-vermittelten Zellzyklusarrest und die Apoptose, begünstigt jedoch die transkriptionelle Aktivierung [29]. Am C-Terminus erfolgt durch Bildung einer amphipathischen helikalen Struktur die Tetramerisation von p53-Monomeren. Der Prozess der Oligomerisierung des Proteins zu Tetrameren ist die Voraussetzung für die DNA-Bindung und die Funktionalität des p53-Proteins.

1.2.2 Funktionen von p53

Als „Wächter des Genoms“ besitzt p53 zwei Hauptfunktionen. Die Zellzyklus-Arretierung und der programmierte Zelltod verhindern bei genomischen Schäden eine mögliche Transformation der Zelle. Aktiviert wird p53 durch endogene und exogene Stressfaktoren [30]. Zu diesen Signalen gehören DNA-Schäden, ausgelöst durch UV-Licht oder ionisierende Strahlen, aber auch durch physiologische Stimuli wie Hypoxie und Kälte- oder Hitzeschock. Diese induzieren chemische Modifikationen des Proteins (u.a. Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung) und führen zu einer erhöhten Halbwertszeit, die normalerweise bei nur 20 min liegt. Somit wird die Funktion des p53-Proteins sowohl über dessen Konzentration als auch über den Phosphorylierungsgrad gesteuert. Eine wichtige Funktion von p53 besteht in der Arretierung des Zellzyklus am G₁/S- bzw. am G₂/M-Übergang, um Korrekturen von genomischen Schäden zu ermöglichen. Dafür werden die Wege der transkriptionellen Aktivierung beim G₁-Block [31] und der transkriptionellen Repression im Falle des G₂-Blocks [32] genutzt. So erfolgen zum Beispiel bei direkter DNA-Schädigung durch UV- oder γ -Strahlen eine Aktivierung von p53 und eine Modulation der p21-Transkription zur Regulation des Zellzyklus. Die damit verbundene Expression von p21, einem universellen Inhibitor von Cyclin/CDK-Komplexen, führt zur Blockade der DNA-Replikation in der G₁-Phase. Ein G₂-Arrest wird durch die transkriptionelle Hemmung von Cyclin B/CDK-Komplexen induziert und verhindert damit die Einleitung der Mitose [33].

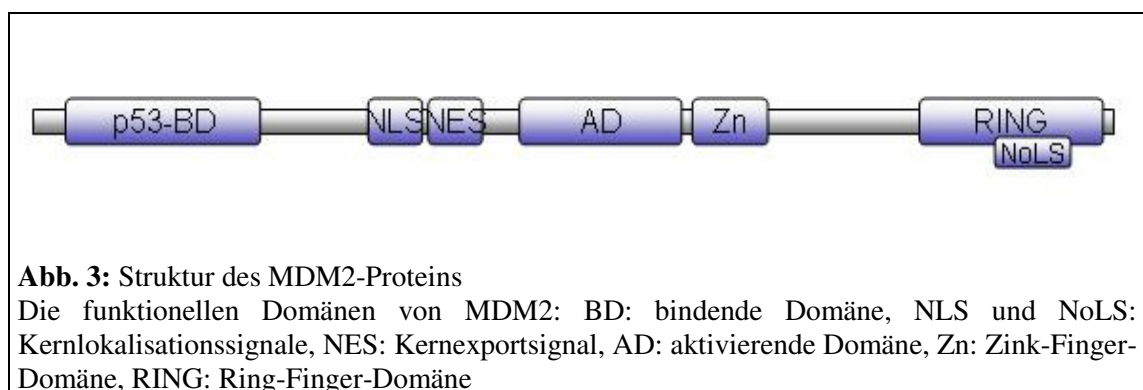
Bei irreparablen Schäden leitet das p53-Protein durch Aktivierung einer Enzymkaskade den programmierten Zelltod ein. In erster Linie erfolgt dies durch Regulation des bax-Gens, durch das die Apoptosegeschwindigkeit reguliert wird [34]. p53 induziert die Expression von bax und verändert somit das Gleichgewicht zwischen bax und bcl-2 zu Gunsten von bax, welches dann den Apoptoseweg initiiert [35].

1.3 Das Onkogen MDM2

Das MDM2 (murine double minute 2) -Gen wurde erstmalig als eines von 3 Genen (MDM1, 2, 3) in der transformierten Mauszelllinie BALB/c 3T3 als amplifizierte Sequenz entdeckt. Die Sequenzen lagen in Form von 25-30 Kopien gepaarter, azentrischer Chromatinkörperchen vor, die als „double minutes“ bezeichnet werden [36]. In weiteren Untersuchungen zeigte nur MDM2 nach Überexpression onkogene Eigenschaften und war in der Lage, spontan zur Transformation von Zellen zu führen [37]. Momand *et al.* fanden 1992 heraus, dass MDM2 an das Tumorsuppressorgen p53 bindet und dessen Funktion als Transkriptionsfaktor verhindert [38]. Im selben Jahr stellten Wissenschaftler fest, dass das humane MDM2-Gen in nahezu einem Drittel aller Sarkome amplifiziert vorliegt [39].

1.3.1 Die Struktur von MDM2

Das MDM2-Gen besteht aus 12 Exonen und codiert für ein nukleoläres Phosphoprotein. Das humane MDM2-Gen ist auf der Chromosomenregion 12q13-14 lokalisiert. Die Abbildung 3 zeigt die Struktur des Proteins. Das MDM2-Gen besitzt zwei verschiedene Promotoren, von denen der Zweite durch p53 aktiviert werden kann. Dies führt zu zwei Proteinen unterschiedlicher Größe, dem sogenannten „full-length“ oder p90-Transkript und dem p76-Protein. Dem kürzeren Transkript p76 fehlt ein Teil der p53-bindenden Domäne und kann somit als negativer Inhibitor von p90 fungieren [40]. Von MDM2 sind darüber hinaus verschiedene Isoformen bekannt, die durch alternatives Spleißen entstehen [41]. Diese Spleißvarianten von MDM2 und die Entstehung verkürzter Proteine lassen sich in vielen humanen Neoplasien und Maustumoren nachweisen, aber auch im Normalgewebe [42].



Im N-terminalen Bereich befindet sich die p53-bindende Domäne. Dieser Bereich ist für die Interaktion von MDM2 mit der amino-terminalen Transaktivierungsdomäne von p53 verantwortlich, die dessen transkriptionelle Aktivität verhindert [43]. Die Fähigkeit des

Transfers zwischen Zytoplasma und Zellkern wird mithilfe von Kernlokalisationssequenzen (NLS und NoLS) und eines Kernexportsignals (NES) gewährleistet [44]. Diese sind notwendig, um das gebundene p53 aus dem Nukleus für den proteosomalen Abbau in das Zytoplasma zu transportieren. Als weiteres Strukturmerkmal enthält MDM2 eine zentrale saure Domäne. Diese wird für die Bindung mit dem ribosomalen Protein L5 und mit p300/CBP benötigt. Argentini *et al.* konnten 2001 zeigen, dass diese Domäne wichtig für den Abbau von p53 ist [45]. MDM2-Mutanten, denen diese saure Region fehlte, waren zwar in der Lage, p53 zu ubiquitinylieren, konnten es aber nicht degradieren [46]. Zwischen der sauren Domäne und dem C-Terminus befindet sich ein Zink-Finger-Motiv, dessen Funktion bisher noch unklar ist. Am carboxy-terminalen Bereich vom MDM2-Protein liegt eine RING-Finger-Domäne, die eine Ubiquitin-Ligase-Aktivität besitzt. Diese ermöglicht die Ubiquitinylierung von p53, welche zum zytoplasmatischen Abbau des Tumorsuppressorgens führt [47].

1.3.2 Funktionen von MDM2

Das Protein MDM2 besitzt eine Vielzahl von unterschiedlichen Funktionen. MDM2 ist in der Lage, auf zwei verschiedenen Wegen p53 zu regulieren. Zum einen kann MDM2 mit der amino-terminalen Domäne p53 direkt binden und auf diese Weise dessen Transkriptionsaktivierungsfunktion im Zellkern inhibieren [48]. Durch Bildung von MDM2-p53-Komplexen im Nukleus wird der Transport ins Zytoplasma erst möglich. Zum anderen fungiert MDM2 durch die RING-Finger-Domäne als E3-Ubiquitin-Ligase, welche für die Ubiquitinylierung und folgende Degradation von p53 verantwortlich ist. Mittels Ubiquitinylierung wird p53 dann für den proteolytischen Abbau im Zytoplasma markiert [49]. MDM2 besitzt aber auch p53-unabhängige Funktionen, welche ebenfalls zu Tumorformationen beitragen können. Zum Beispiel ist MDM2 in der Lage, das Tumorsuppressorgen Rb (Produkt des Retinoblastomgens) zu binden. Auf diese Weise wird die Rb-vermittelte Inhibierung der E2F1-Funktion gehemmt, welche die Rb-vermittelte G₁-Zellzyklusarrest inhibiert [50].

1.4 SNP309 des MDM2

Das Onkogen MDM2 ist ein wichtiger negativer Regulator des p53-Proteins [51]. Bond *et al.* detektierten 2004 bei ihren Untersuchungen einen Single-nucleotid-Polymorphismus (SNP T/G) im Bereich des P2-Promotors des MDM2-Gens, der zu einer Abschwächung des p53-Pathways führt [52]. Bei Einzelnukleotidpolymorphismen kommt es zum Austausch eines Nukleotides im DNA-Molekül. Es handelt sich um die häufigsten angeborenen Sequenzvariationen. Die Arbeitsgruppe von Bond fand heraus, dass bei Vorliegen des G-Allels von SNP309 eine verstärkte MDM2-mRNA und -Proteinexpression vorliegt und somit die Aktivität von p53 negativ beeinflusst wird. So stellte sich in weiteren Untersuchungen heraus, dass dieser SNP309

mit einer beschleunigten Tumorgenese in angeborenen und sporadischen Karzinomen assoziiert ist.

Darüber hinaus wurde der Polymorphismus in einem Bereich des MDM2-Gens gefunden, der auch Bindungsstellen für Hormone besitzt. Denn diese Region vermittelt die Regulierung der MDM2-Expression durch Östrogen und Schilddrüsenhormone. Dies könnte ursächlich für die Beobachtungen sein, dass das G-Allel des SNP309 die Wirkung von Östrogen auf die Tumorgenese beeinflusst und somit geschlechtsspezifische Unterschiede hervorruft [53].

1.5 Der p53-MDM2 autoregulatorische Feedback-Loop

In Abwesenheit von genomischen Schäden hat p53 eine relativ kurze Halbwertszeit. Sichergestellt wird dies über einen autoregulatorischen Mechanismus, der ein Gleichgewicht zwischen p53 und MDM2 aufrecht erhält (Abb. 4). Kommt es aber zur DNA-Schädigung, steigt die Konzentration von p53 an [54]. p53 bindet an den Promotor P2 des MDM2, und es resultiert eine gesteigerte Expression des Onkogens. Dies führt zu einer Bindung von MDM2 an p53, fördert dessen Degradation und hemmt letztendlich die Tumorsuppressorfunktion von p53. Somit existiert ein autoregulatorischer Feedback-Mechanismus, in dem aktiviertes p53 die MDM2-Expression positiv stimuliert, MDM2 jedoch gleichermaßen das p53-Niveau und dessen Aktivität negativ reguliert [55].

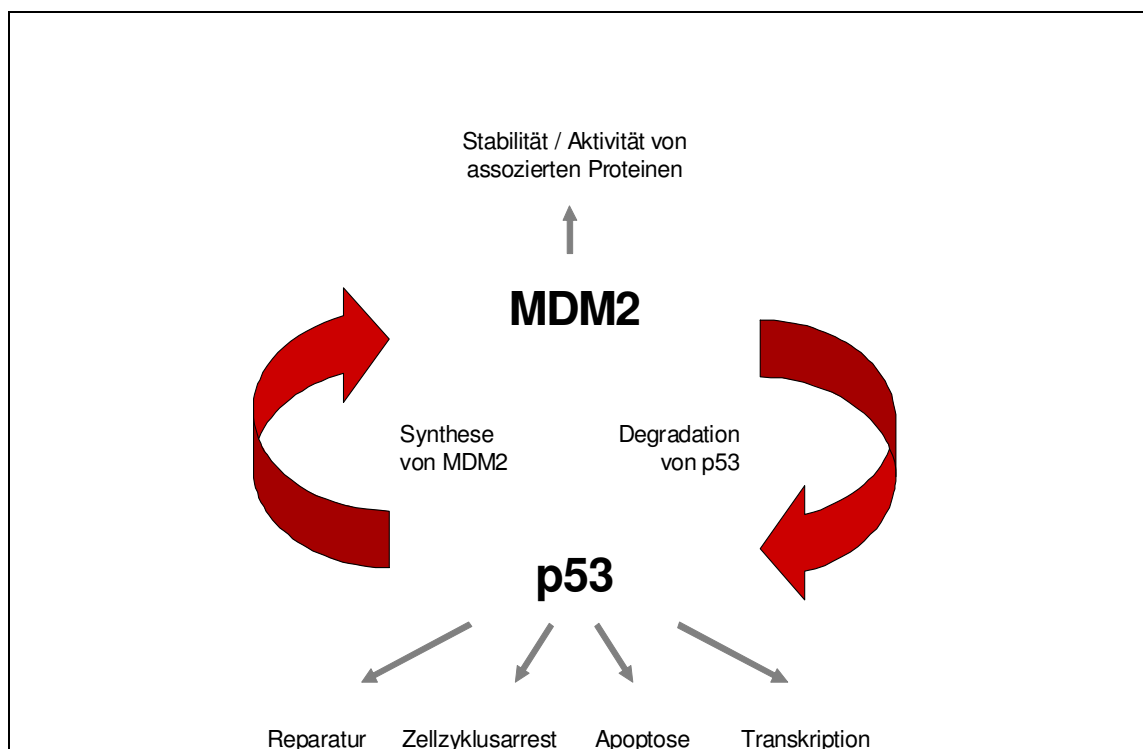


Abb. 4: Autoregulatorischer Feedback-Loop (modifiziert nach Alarcon-Vargas und Ronai, 2002) [56]

p53 und MDM2 sind über einen autoregulatorischen Mechanismus miteinander verbunden, der ein Gleichgewicht sicherstellt. Weitere Details siehe Text.

1.6 p53 und MDM2 als prognostische Indikatoren in Ovarialkarzinomen

Die prognostische Bedeutung der Expression von p53 und MDM2 in epithelialen Ovarialkarzinomen und deren Aussagekraft über klinisch-pathologische Faktoren bleibt weiterhin umstritten.

Das Tumorsuppressorgen p53 ist in ungefähr 40–80 % aller epithelialen Ovarialtumoren mutiert [57-59]. Die Aktivität von p53 kann auf verschiedene Weise verändert werden. Dazu gehören Mutationen des p53-Gens, aber auch Alterationen durch transkriptionale oder posttranskriptionale Mechanismen. Veränderungen des p53-Proteins durch Missense-, Nonsense- oder Frameshift-Mutationen bedeuten einen selektiven Vorteil für die klonale Ausbreitung von neoplastischen Zellen [22]. Die meisten p53-Mutationen sind in den konservierten Regionen von Exon 5 bis 8 zu finden [60]. Mithilfe der Immunhistochemie ist es möglich, mutierte p53-Proteine zu detektieren, da der Abbau im Vergleich zum p53-Wildtyp verlangsamt abläuft [61]. Die Überexpression von mutiertem p53 ist in den fortgeschrittenen Tumorstadien FIGO III/IV signifikant höher (40-60 %) als in den Stadien FIGO I und II mit nur 10-20 % [62]. Einige Wissenschaftler haben diese Erkenntnis so interpretiert, dass die Überexpression ein spätes Ereignis in der ovariellen Karzinogenese ist. Andere sind hingegen der Meinung, dass die p53-Überexpression ein Zeichen für ein aggressiveres Verhalten des Tumors sein könnte. Weitere Untersuchungen ergaben einen Zusammenhang zwischen p53-Überexpression, einem erhöhten Serumwert des Tumormarkers CA 125 und dem Auftreten von Aszites [63]. Da MDM2 in der Lage ist, die Aktivität von p53 durch Bindung zu hemmen, hat eine Überexpression des Onkogens einen ähnlichen Effekt wie die durch Mutation hervorgerufene Inaktivierung von p53 [64]. Experimente *in vivo* zeigten, dass der Status von p53 und MDM2 entscheidend für die Chemosensitivität von Tumorzellen ist [65]. Dies legt die Vermutung nahe, dass sowohl MDM2 als auch p53 eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Chemoresistenzen spielen, was möglicherweise einen Effekt auf das Überleben der Patientinnen hat. In Zellkultur-Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Effektivität verschiedener chemotherapeutischer Agenzien einschließlich Cisplatin ein intaktes p53-Protein für die Induktion der Apoptose voraussetzt. Andernfalls erhöht sich die Entwicklung von Resistenzen bei der Anwendung von Zytostatika [66]. Eine Überexpression von p53 und MDM2 hat eine schlechtere Prognose zur Folge als ein überexprimiertes MDM2 oder p53 allein [67].

1.7 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit war die molekulare Charakterisierung von Ovarialkarzinomen und serösen Borderline-Tumoren in Bezug auf Veränderungen von p53 und MDM2 und die Korrelation der Ergebnisse mit klinischen Daten der Patientinnen. Im Einzelnen sollten dabei folgende Aspekte bearbeitet werden:

1. Bestimmung des p53-Mutationsstatus in Ovarialkarzinomen und serösen Borderline-Tumoren sowie deren Korrelation mit klinischen Daten
2. Immunhistochemischer Nachweis der p53-Proteinexpression unter Verwendung des Antikörpers DO-7 sowie Bestimmung der Gruppeneinteilung und die Analyse der Östrogenrezeptorexpression unter Verwendung des anti-ER-Antikörpers SP1
3. Ermittlung des SNP309-Status in Ovarialkarzinomen und Borderline-Tumoren sowie Vergleich der Ergebnisse mit klinischen Daten (Alter bei Diagnosestellung, klinischer Verlauf, Gesamtüberleben, Ansprechen auf Chemotherapie)
4. Vergleich der serösen Borderline-Tumoren, der low-grade und der high-grade Ovarialkarzinome anhand der unter Punkt 1-3 erhaltenen Daten

2 Material

2.1 Tumormaterial

Paraffin-fixiertes Tumorgewebe von 107 Ovarialkarzinomen und 64 Borderline-Tumoren wurde nach Verfügbarkeit des Materials ausgewählt. Das Material wurde aus den Kliniken der Gynäkologie und der Chirurgie der Martin-Luther-Universität (MLU) sowie des Elisabeth-Krankenhauses Halle und der Merseburger Klinik zur Verfügung gestellt. Die ausführliche Beschreibung der Tumorproben und des Patientenkollektivs sind in der Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Zusammenfassung klinischer Daten der Ovarialkarzinompatientinnen

<i>Klinische Parameter</i>	<i>Patientinnen (n=107)</i>	
	<i>Anzahl</i>	<i>%</i>
<u>Tumortyp</u>		
serös	62	57,9
endometroid	14	13,1
gemischt	11	10,3
klarzellig	9	8,4
transitionalzellig	1	0,9
undifferenziert	8	7,5
muzinös	2	1,9
<u>Tumorstadium</u>		
FIGO I	30	28,0
FIGO II	9	8,4
FIGO III	63	58,8
FIGO IV	5	4,7
<u>Alter der Patientinnen</u>		
Durchschnitt	63,5 Jahre	
Median	64,0 Jahre	
<u>Therapie</u>		
Cisplatin+Taxol	62	57,9
Platin-haltig, ohne Taxol	21	29,7
andere	2	1,9
keine (FIGO Ia)	5	4,7
abgelehnt, gestorben	13	12,1
keine Daten	4	3,7
<u>Resttumor (n=95)</u>		
kein	39	41
< 1 cm	22	23,1
> 1 cm	34	35,8

2.2 Chemikalien und Reagenzien

Agar	Invitrogen, Karlsruhe
Agarose	Serva, Heidelberg
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Desoxyribonukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 100mM)	Promega, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
DNA-Standard (100bp-Leiter)	Invitrogen, Karlsruhe
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol (96 %)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
LDS Probenpuffer (4x)	Invitrogen, Karlsruhe
Methanol (100 %)	VWR, Darmstadt
Natriumacetat	Serva, Heidelberg
Natriumchlorid	Serva, Heidelberg
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumphosphat	Serva, Heidelberg
Natriumpyruvat	Invitrogen, Karlsruhe
Trichloressigsäure	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg
25 % Trypsin-EDTA (1x)	Invitrogen, Karlsruhe
Tween-20	Serva, Heidelberg
Xylencyanol	Serva, Heidelberg
Zitronensäure	Serva, Heidelberg

Zur Herstellung aller Puffer wurde bidestilliertes Wasser verwendet.

2.3 Enzyme

HotStarTaq™ –DNA-Polymerase (5 U/μL)	Qiagen, Hilden
Proteinase K	Serva, Heidelberg

2.4 Kits

BigDye Terminator v1.1/v3.1 Sequencing Kit	Applied Biosystem, USA
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden

2.5 Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Antikörper

<i>Antigen</i>	<i>Klon</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Ursprungstier</i>	<i>Firma</i>
MDM2	N-20	1:1000	Kaninchen	Santa Cruz
p53 (IHC)	DO-7	1:100	Maus	Dako
ERα (IHC)	SP-1	1:100	Maus	Labvision
Anti-Maus		1:10000	Kaninchen	Dako
Anti-Kaninchen		1:10000	Ziege	Dako

2.6 Primer

Mit Hilfe des Programms CloneManager wurden die Primer erstellt und von TIB MOLBIOL (Berlin) synthetisiert. Die verwendeten Primer für jedes Exon waren im Intron lokalisiert, so dass Spleißstellen in die Analyse mit eingeschlossen waren (Tab. 4).

Tabelle 4: Primer

<i>Name</i>	<i>Sequenz 5' → 3'</i>	<i>Orientierung</i>	<i>Referenzen</i>
GAPDH-3	5'-AGGAGCGAGATCCCTCCAAA-3'	sense	
GAPDH-5	5'-AGGAGCGAGATCCCTCCAAA-3'	antisense	
p53 Ex3fw	5'-TAGCAGAGACCTGTGGGAAGC-3'	sense	Reles et al.,2001
p53 Ex3rev	5'-AGAGCAGTCAGAGGACCAGGT-3'	antisense	Reles et al.,2001
p53 Ex4fw	5'-CGTTCTGGTAAGGACAAGGGT-3'	sense	Reles et al.,2001
p53 Ex4rev	5'-AAGAAATGCAGGGGGATACGG-3'	antisense	Reles et al.,2001
p53 Ex5fw	5'-CTGTTCACTTGTGCCCTGAC-3'	sense	Reles et al.,2001
p53 Ex5rev	5'-AACCAGCCCTGTCGTCTCTC-3'	antisense	Reles et al.,2001
p53 Ex6fw	5'-GCTGGAGAGACGACAGGGCT-3'	sense	Reles et al.,2001
p53 Ex6rev	5'-CAACCACCCTTAACCCCTCC-3'	antisense	Reles et al.,2001
p53 Ex7fw	5'-CTTGCCACAGGTCTCCCAA-3'	sense	Reles et al.,2001
p53 Ex7rev	5'-AGGGGTCAGCGGCAAGCAGA-3'	antisense	Reles et al.,2001
p53 Ex8fw	5'-TTCCTTACTGCCTCTTGCTT-3'	sense	Reles et al.,2001
p53 Ex8rev	5'-AGGCATAACTGCACCCTTGG-3'	antisense	Reles et al.,2001
p53 Ex9fw	5'-AGCAAGCAGGACAAGAAGCG-3'	sense	Reles et al.,2001
p53 Ex9rev	5'-GCAAATGCCCAATTGCAGG-3'	antisense	Reles et al.,2001
SNP309fw	5'-CGGGAGTTCAGGGTAAAGGT-3'	sense	
SNP309rev	5'-AGCAAGTCGGTGCTTACCTG-3'	antisense	

2.7 Geräte und Verbrauchsmaterialien

BioDocAnalyze (Gelauswertung)	Biometra, Göttingen
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Einweg-Plastikartikel (Pipetten, Pipettenspitzen, Zentrifugationsröhrchen)	Greiner, Frickenhausen
Elektrophorese-Gerät	BioPlex, Freiburg
Magnetrührer	IKA-Labortechnik, Staufen
Mettler AM 100 (Analysewaage)	Mettler, Giessen
Mikropipetten	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop Eclipse 80i	Nikon, Düsseldorf
Peltier Thermal-Cycler	Biorad, München
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Trio-Thermalblock TB1	Biometra, Göttingen

Vakuumheizplatte PheroTemp 60	Biotech-Fischer, Reiskirchen
Vakuumzentrifuge (Concentrator 5301)	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg

2.8 Puffer und Lösungen

Auftragspuffer: (Gelelektrophorese)	Formamid	10,0 mL
	Xylencyanol	10,0 mg
	Bromphenolblau	10,0 mg
	EDTA (0,5 M, pH 8,0)	0,2 mL
5x TBE-Puffer:	Tris-HCl	54,0 g
	Borsäure	27,5 g
	EDTA (0,5 M, pH 8,0)	20,0 mL
	→ Aqua bidest. auf 1 L auffüllen	

3 Methoden

3.1 DNA- Isolation aus Paraffinmaterial

Die DNA- Isolation aus Paraffinmaterial erfolgte durch ein modifiziertes Protokoll nach Wright und Manos und Lahiri und Nurnberger (Manos und Lahiri, 1996). Sie umfasst die Schritte Entparaffinierung, Proteinase-K-Verdau und DNA-Extraktion.

1. 5-10 ca. 20 µm dünne Gewebsschnitte mit 1 mL Xylol versetzen
2. 10 min bei Raumtemperatur (RT) schütteln
3. 3 min bei 12.000 U/min zentrifugieren, den Überstand verwerfen
4. die Schritte 1 bis 3 zweimal wiederholen, bis das Paraffin vollständig gelöst ist
5. zweimal mit 1 mL 99 % Ethanol waschen und jeweils 3 min bei 12.000 U/min bei 21°C zentrifugieren
6. das Pellet in der Vakuumzentrifuge 5 min bei 45 °C trocknen
7. über Nacht (ÜN) das Pellet mit 720 µL Verdaupuffer und 80 µL Proteinase-K-Stammlösung bei 37 °C inkubieren
8. Inkubation für 10 min bei 95 °C im Thermomixer, anschließend auf RT abkühlen
9. Zentrifugation für 5 min bei 12.000 U/min bei 4 °C
10. den Überstand in ein 2 mL Reaktionsgefäß geben, dazu 800 µL Salzpuffer und 25 µL SDS (20 %, w/v) geben und gut mischen
11. Inkubation für 10 min bei 55 °C, anschließend auf RT abkühlen
12. für ca. 5-10 min bei 12.000 U/min und 4 °C zentrifugieren
13. den Überstand in zwei 1,5-mL-Reaktionsgefäße geben
14. das gleiche Volumen Isopropanol hinzugeben
15. Fällung der DNA bei -20 °C ÜN oder für 30 min bei -80 °C
16. Zentrifugation für ca. 20-30 min bei 15.000 U/min (4 °C), Überstand verwerfen
17. Pellet aus dem einen Reaktionsgefäß mit 1 mL 70 % Ethanol in das andere Reaktionsgefäß überführen
18. für 10 min bei 10.000 U/min und 4 °C zentrifugieren, Überstand verwerfen
19. in Vakuumzentrifuge für 5 min bei 45 °C trocknen
20. DNA-Pellet in ca. 50-100 µL DNA-Lösungspuffer auflösen

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

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

3.1.1 Konzentrationsbestimmung

Zur Konzentrations- und Reinheitsbestimmung wurden die DNA-Proben geeignet verdünnt (üblicherweise 1:100) und im Spektralphotometer vermessen. Die Extinktion wurde jeweils bei 260 und 280 nm gemessen. Die Konzentration ergibt sich aus folgender Beziehung: 1 OD_{260 nm} entspricht 50 µg DNA /mL. Die Reinheit der Präparation errechnet sich aus dem Quotienten der OD_{260 nm} / OD_{280 nm} und nimmt bei hoher Reinheit einen Wert zwischen 1,8 und 2 an.

3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion diente der gezielten Amplifikation spezifischer Gensequenzen für weitere Analysen. Die jeweiligen Reaktionsbedingungen, wie anealing-Temperatur, Primer- und Nukleotidkonzentration, Zyklenzahl und DNA-Menge wurden für jedes Gen entsprechend optimiert. Grundsätzlich betrug das Reaktionsvolumen 25 µL. Ein PCR-Ansatz bestand aus folgenden Komponenten:

17,25 µL H₂O
2,5 µL 10x Puffer B
2,5 µL MgCl₂ (25mM)
2,0 µL dNTPs (100mM)
je 0,25 µL Primer (20µM)
0,25 µL HotStar-Taq-Polymerase
25 µL Reaktionsansatz

Dem Reaktionsansatz wurde je 1 µL DNA mit einer Konzentration von 200 ng hinzugefügt. Die PCR-Reaktion erfolgte im Peltier Thermal-Cycler PT200 nach folgendem Programm:

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

3.3 Sequenzierreaktion und Reinigung der Sequenzierprodukte

Zur Sequenzierung der DNA wurden BigDye™ Terminator Sequencing Kits 1.1 oder 3.1 der Firma ABI Prism verwendet.

Der Sequenzierungsansatz enthielt 2 µL BigDye™ Sequencing Mix, 4 µL (3,2 pmol/µL) eines spezifischen Primers, 5 µL des gereinigten PCR-Produktes sowie 9 µL des 5x Sequenzierpuffers (ABI Prism). Somit umfasste der Ansatz ein Volumen von 20 µL. Die Sequenzierreaktion lief in 0,5 mL-Reaktionsgefäßen im Trioblock™ – Thermocycler mit Heizdeckel nach folgendem Programm ab:

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

Das Reinigen der Sequenzierprodukte erfolgte mit Inachtnahme vor direkter Lichteinwirkung auf die Reaktionsgefäße in folgenden Schritten:

1. Zugabe von 2 µL Natriumacetat (3 M, pH 4,6) und 2 µL EDTA-Lösung (125 mM), dazu 50 µL Ethanol (96 %) geben
2. vortexen und 15 min bei Raumtemperatur inkubieren
3. Zentrifugation für 20 min bei 10.000 U/min und 4 °C, Überstand verwerfen
4. Pellet mit 70 µL Ethanol (70 %) waschen
5. Zentrifugieren für 10 min bei 6000 U/min (4 °C), Überstand abpipettieren
6. Pellet im Thermocycler ca. 10 min bei 80 °C trocknen

Die Probenanalyse erfolgte im Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter Nutzung eines ABI Prism DNA-Sequencers und wurde von Dr. Kaltenborn und Mitarbeitern durchgeführt.

3.4 DNA-Arbeiten

3.4.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte anhand einer Agarose-Gelelektrophorese. In Abhängigkeit von der zu erwartenden Fragmentlänge der PCR-Produkte wurden 1-2 %-ige Agarosegele angefertigt (jeweils 100 mL 0,5x TBE-Puffer versetzt mit 5 µL Ethidiumbromidstammllösung [10 mg/L]). Durchgeführt wurde die Gelelektrophorese in Gelkammern der Firma Bioplex mit 0,5x TBE als Laufpuffer. Jeweils 5 µL des PCR-Produktes wurden mit 1,5µL Auftragspuffer (siehe Kap. 2.8) gemischt und auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für eine Laufzeit von ca. 30 min bei 90 V. Nach dem Gellauf wurden die Banden mittels UV-Licht sichtbar gemacht und mithilfe des Geldokumentationssystems BioDocAnalyse (Biometra) ausgewertet. DNA-Längenstandards dienten der Größenbestimmung der DNA-Fragmente.

3.4.2 Isolierung der DNA aus Agarose-Gelen

Für die Isolierung der DNA wurden zunächst ca. 20 µL des Ansatzes im Agarosegel aufgetrennt (3.4.1). Mithilfe eines sterilen Skalpells wurden die gewünschten Banden unter UV-Licht ausgeschnitten. Im Anschluss erfolgte die Reinigung der DNA mit dem QiaQuick Gelextraktionskit (Qiagen) entsprechend der Angaben des Herstellers, mit der Ausnahme, dass zum Lösen der Agarose QX1-Puffer aus dem QiaEx-Gelextraktionskit verwendet wurde.

3.4.3 TBE-Gelelektrophorese

Zur Untersuchung von Mutationen wurden die erhaltenen PCR-Produkte nach Denaturierung einer hochauflösenden TBE-Gelelektrophorese unterzogen (SSCP-Analyse). Mittels Silberfärbung wurden die Banden nach dem Gellauf sichtbar gemacht.

Zunächst wurden ca. 20 µL des PCR-Produktes über Nacht mit 100 µL Isopropanol bei -20 °C gefällt. Anschließend wurden die Proben 15 min bei 4 °C und 12.000 U/min zentrifugiert, das Isopropanol abgossen und die Proben dann ca. 10 min bei 80 °C getrocknet. Das erhaltene Pellet wurde mit 8 µL Auftragspuffer versetzt und erneut bei 80 °C für 10 min getrocknet. Nach weiteren 10 min bei -20 °C konnte die Auftragung der Proben auf ein 8 %-iges TBE-Gel (Invitrogen) erfolgen. Zusätzlich wurde ein Gemisch aus 3 µL DNA-Längenstandard und 2 µL Auftragspuffer auf das Gel aufgetragen. Dabei diente TBE-Puffer als Laufpuffer. Der Gellauf

erfolgte bei 175 V im Kühlschrank, bis die untere Farbstoffbande (Bromphenolblau) aus dem Gel gelaufen war (ca. 1 h).

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

Nach dem Gellauf wurde das Gel unter Verwendung eines Gelmessers aus der Kassette entfernt und die Silberfärbung durchgeführt.

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

Nach der Silberfärbung wurde das Gel auf Filterpapier übertragen und für ca. 1 h bei 70 °C unter der Vakuumheizplatte getrocknet.

3.4.4 Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Untersuchungen wurden entweder an Formalin- oder Acetonfixierten Kryoschnitten durchgeführt, die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 3 aufgelistet.

1. Schritt: Anfertigung von 4 µm-dicken Schnitten
2. Schritt: Schnitte auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger (Superfrost) aufziehen
3. Schritt: Objektträger 15 min bei 60 °C inkubieren
4. Schritt: Entparaffinierung im Xylolbad (2x 5 min)
5. Schritt: Schnitte in folgender Reihe mit Alkohol rehydrieren (2x 3 min 99 % Ethanol, 2x 1 min 95 % Ethanol, 2x 1 min 70 % Ethanol)
6. Schritt: Objektträger für 5 min in PBS pH 7,4 spülen

7. Schritt: 30 min in 2 %-iger H₂O₂-Lösung inkubieren
8. Schritt: 5 min Inkubation in 6 %-iger Trägerproteinlösung zur Blockierung unspezifischer Bindungen
9. Schritt: unter Vorsicht die Trägerproteinlösung vom Präparat abtupfen
10. Schritt: Auftragen des Primär-Antikörpers in entsprechender Verdünnung
11. Schritt: Inkubation in feuchter Kammer 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C
12. Schritt: 2x für 5 min mit PBS pH 7,4 spülen
13. Schritt: 10 min mit biotinyliertem Sekundär-AK bei Raumtemperatur inkubieren (Anti-Maus- oder Anti-Kaninchen-Ig)
14. Schritt: 2x für 5 min mit PBS pH 7,4 spülen
15. Schritt: 10 min mit Peroxidase-konjugierter Streptavidin-Lösung bei RT inkubieren
16. Schritt: 2x für 5 min mit PBS pH 7,4 spülen
17. Schritt: 3 bis 5 min mit Chromogen-Lösung (DAKO) inkubieren, 2x für 5 min mit PBS pH 7,4 spülen
18. Schritt: mit Hämatoxin gegenfärben und bläuen
19. Schritt: Eindecken der Schnitte mit Gelatine (Merck)

Die gefärbten Präparate wurden jeweils von zwei Personen unabhängig voneinander ausgewertet. Im Falle von unterschiedlichen Ergebnissen in der Begutachtung mithilfe des Mikroskops Nikon Eclipse wurde die Färbung für diese Präparate an neuen Schnitten wiederholt. Eine Probe wurde als positiv bewertet, wenn mindestens 10 % der Tumorzellen eine signifikante Färbung aufwiesen.

3.5 Statistische Analysen

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der Software SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Dabei wurden alle Werte als signifikant eingestuft, die innerhalb des Wahrscheinlichkeitsintervalls von 0,05 lagen. Unsere Analysen umfassten Überlebenszeitanalysen (Kaplan-Meier-Analyse, multivariate Cox-Regressionsanalyse), t-Tests, Chi²-Tests (Kreuztabellen).

4 Ergebnisse

4.1 Patientenkollektiv

Es wurde paraffin-fixiertes Tumorgewebe von insgesamt 107 Patientinnen mit epithelialen Ovarialkarzinomen (OVCA) und 64 Patientinnen mit Borderline-Tumoren (BOT) untersucht. Die 107 Ovarialtumoren können, entsprechend der Tumorgenese, in 30 low-grade und 77 high-grade Tumoren untergliedert werden. Die Fälle wurden zwischen 1997 und 2005 am Institut für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg diagnostiziert. Das Material wurde aus den Kliniken der Gynäkologie und der Chirurgie der MLU sowie des Elisabeth-Krankenhauses Halle und der Merseburger Klinik zur Verfügung gestellt. Die Studie wurde durch das lokale Ethikkomitee genehmigt. Alle histologischen Präparate wurden durch 2 Pathologen (Elise Gradhand & Steffen Hauptmann) reevaluiert. Die histologische Klassifikation erfolgte nach den Richtlinien der WHO und dem Grading nach Silverberg [68].

Daten zum Tumorzelltyp, Stadium, Patientenalter und adjuvanter Chemotherapie der Ovarialkarzinome sind in Tabelle 2 aufgeführt. Das Alter der Patientinnen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung reicht von 41 bis 90 Jahren mit einem durchschnittlichen Alter von 63,5 Jahren. Die Einstufung der Ovarialtumoren nach FIGO ergab, dass sich neben 28 % der Tumoren im Stadium FIGO I der Großteil der Tumoren (63,5 %) im fortgeschrittenen Stadium (FIGO III und FIGO IV) befand. Als FIGO-Stadium II wurden 8,4 % eingestuft. Die histologische Klassifizierung zeigte zum größten Teil seröse Ovarialkarzinome (57,9 %), gefolgt von endometrioiden (13,1 %) und klarzelligem Tumoren (8,4 %) sowie gemischten (10,3%), undifferenzierten (7,5 %) transitionalzelligen (0,9 %) und muzinösen (1,9 %).

Die Standardtherapie bei Patientinnen mit fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen umfasst neben primär chirurgischer Intervention eine adjuvante Chemotherapie. Von den 107 Patientinnen wurden 62 mit einer Kombinationstherapie von Cisplatin/Taxol behandelt (57,9 %). Eine Monotherapie mit einer platinhaltigen Substanz erhielten 21 Frauen (29,7 %). Ovarialkarzinompatientinnen mit dem FIGO-Stadium Ia und Ib profitieren nur wenig von einer adjuvanten Chemotherapie [69], daher wurden Patientinnen in diesen FIGO-Stadien (4,7 %) keiner medikamentösen Behandlung unterzogen.

Eine wesentliche unabhängige prognostische Bedeutung weist der postoperative Tumorrest auf. In unserer Studie wurde bei 56 Frauen mit Ovarialkarzinomen Resttumor gefunden. Von diesen war in 22 Fällen (23,1 %) der verbleibende Resttumor kleiner als 1 cm, bei 34 Patientinnen war der Durchmesser größer als 1 cm. Bei 41 % der Patientinnen konnte kein Tumorrest nachgewiesen werden.

Neben den Ovarialkarzinomen untersuchten wir 64 Patientinnen mit Borderline-Tumoren. Das Alter der Patientinnen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung reicht von 15 bis 100 Jahren mit

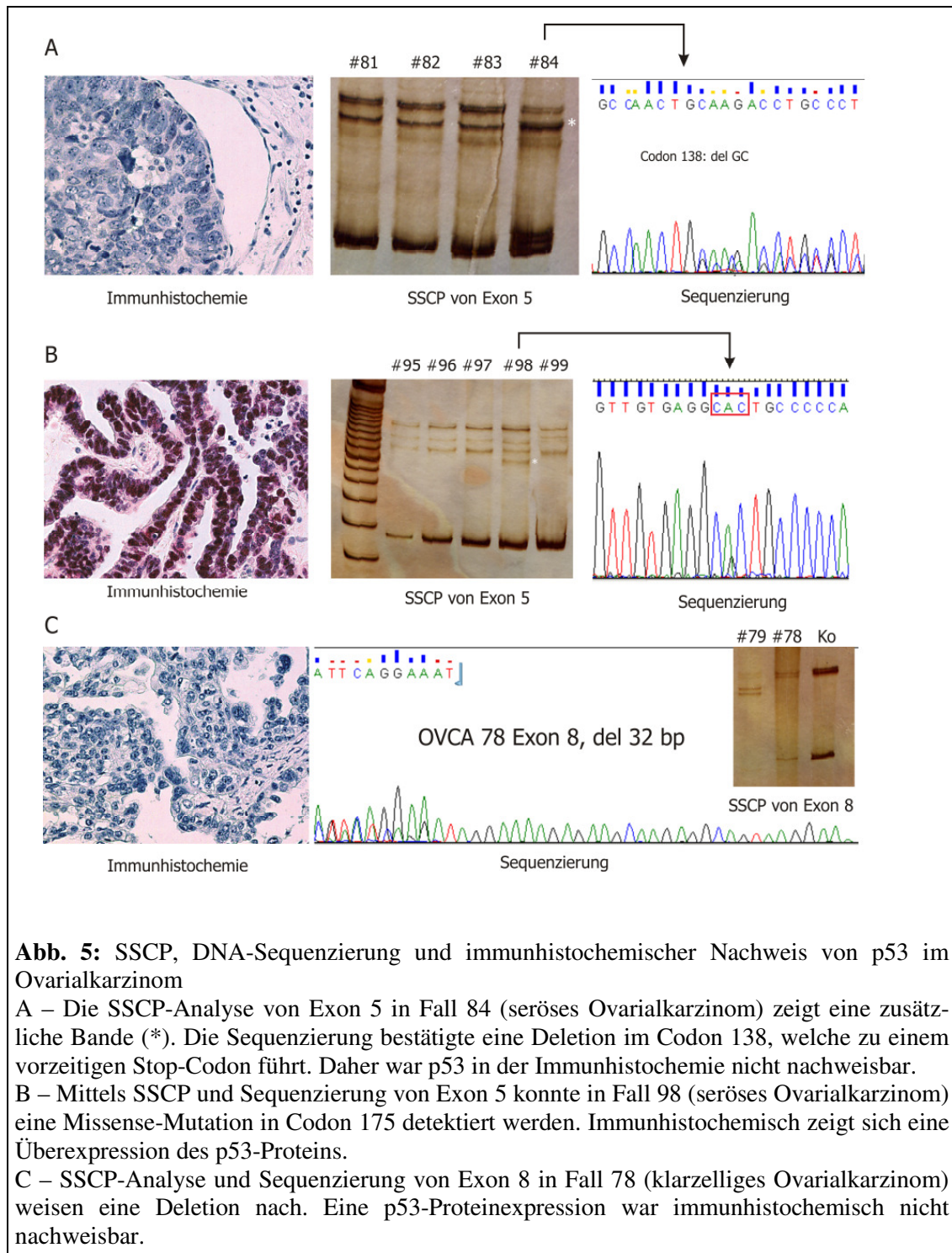
einem durchschnittlichen Alter von 54 Jahren. Bei der histologischen Einteilung fanden sich größtenteils seröse Borderline-Tumoren (64 %), gefolgt von muzinösen Tumoren (17 %).

Die Standardtherapie der Patientinnen mit Borderline-Tumoren besteht in der radikalen Primäroperation, da der Nutzen einer adjuvanten postoperativen Chemotherapie bislang nicht gezeigt werden konnte [70].

4.2 Mutationsanalyse von p53

4.2.1 Ergebnisse der SSCP-Gele der Ovarialkarzinome

Um den p53-Mutationsstatus zu bestimmen, wurden die Proben in SSCP-Gelen (single strand conformation polymorphism-Gele), einer hochauflösenden DNA-Gelelektrophorese, untersucht. Die Methode stellt ein praktisches und preiswertes Verfahren zum Screening möglicher Mutationen dar. Dafür wurden die Exone 3, 4, 9, 10 und 11 des p53-Gens mittels PCR amplifiziert und anhand der folgenden SSCP-Analyse beurteilt. Bei Fällen mit veränderten Bandenmustern im Vergleich zu Kontrollen von gesunden Blutspendern mit Wildtyp-Status, wurden die PCR-Produkte weiterhin sequenziert (Abb. 5). Unter Verwendung des BigDye Terminator Cycle Sequencing Kits 1.1 oder 3.1 erfolgte die Sequenzierung in sense- und antisense-Richtung. Da die meisten p53-Mutationen in den konservierten Regionen von Exon 5 bis 8 zu finden sind, wurde für alle Proben eine Sequenzanalyse dieser Abschnitte ohne vorherige SSCP-Beurteilung durchgeführt.



4.2.2 Ergebnisse der Sequenzierung der Ovarialkarzinome

In den 107 untersuchten Patientenproben wurden insgesamt 111 Sequenzveränderungen detektiert. Von diesen befinden sich 42 Mutationen im Bereich von Exon 4 bis Exon 8. Jeweils eine Mutation wurde im Intron 5 und im Intron 7 entdeckt (Tab. 5, siehe Anhang). In 22 Fällen handelte es sich um eine 16bp-Insertion im Intron 3 und weitere 45 Sequenzveränderungen

wurden im Codon 72 von Exon 4 detektiert. Beide Alterationen sind als Polymorphismen des p53-Gens bereits bekannt. Mutationen, die eine Veränderung der Aminosäuresequenz bewirken, wurden vorwiegend im Bereich von Exon 5 bis Exon 8 gefunden (39 von 42). Im Einzelnen wurden 12 Mutationen im Exon 5, jeweils 10 Mutationen im Exon 7 und im Exon 8, 7 Mutationen wurden im Exon 6 entdeckt und 3 im Exon 4.

Von den 42 Mutationen waren 63 % Missense-Mutationen und bei 19 % handelte es sich um Deletionen. 9,3 % waren Nonsense-Mutationen, bei denen der Basenaustausch zu einem vorzeitigen Stopcodon führt, und 7 % Insertionen. Am häufigsten von Sequenzveränderungen betroffen waren dabei mit jeweils 3 Fällen Codon 175 und Codon 245, bei denen es sich um bereits bekannte Hotspot-Mutationsstellen handelt. 8 der 42 Mutationen im Exonbereich konnten in dieser Arbeit erstmalig im Ovarialkarzinom nachgewiesen werden, weitere 4 Mutationen wurden in dieser Studie das erste Mal beschrieben [71].

Die überwiegende Mehrzahl der Missense-Mutationen detektierten wir in unserer Arbeit zwischen Codon 141 und 280. Innerhalb dieses Bereiches finden sich Veränderungen häufig in vier verschiedenen Regionen, welche den am höchsten konservierten Domänen (Domäne II bis V) des p53 entsprechen (Abb. 6) [72].

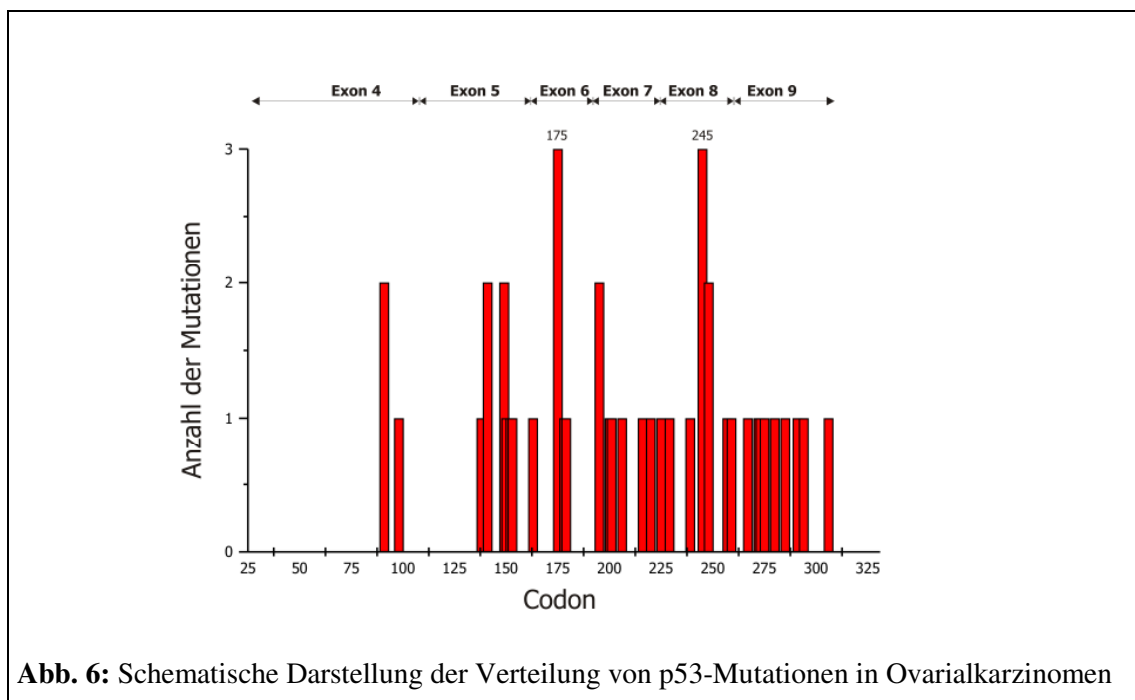


Abb. 6: Schematische Darstellung der Verteilung von p53-Mutationen in Ovarialkarzinomen

4.2.3 Ergebnisse der SSCP-Gele der Borderline-Tumoren

Mittels PCR wurde Exon 4 bis 8 des p53-Gens amplifiziert und anschließend ein SSCP-Gel angefertigt. Bei auffälligen Bandenmustern im Vergleich mit Kontrollen wurden diese im Anschluss sequenziert, da mögliche Veränderungen des genetischen Materials vorlagen.

4.2.4 Ergebnisse der Sequenzierung der Borderline-Tumoren

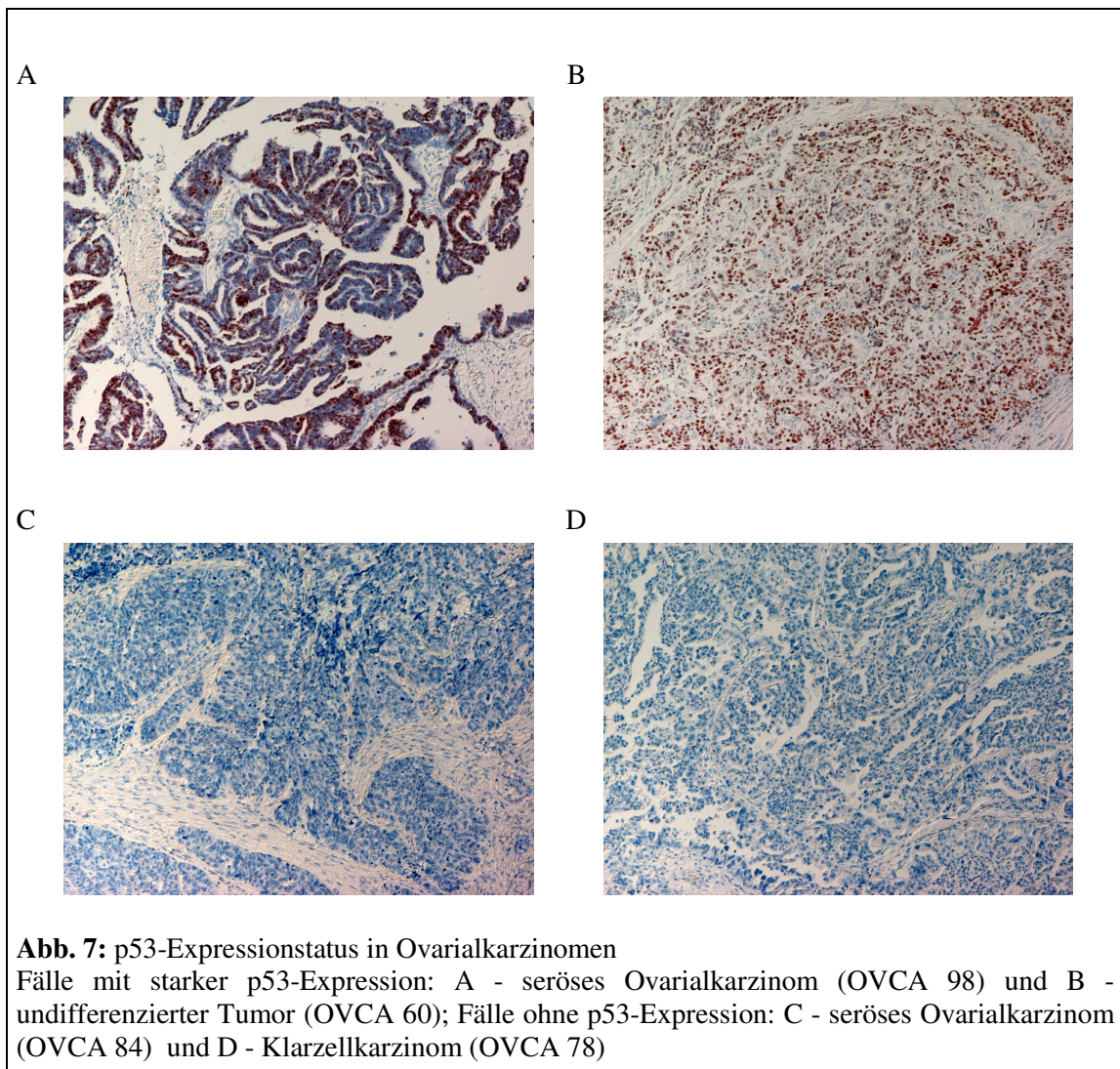
Von den 45 untersuchten Borderline-Tumoren wiesen 6 eine Sequenzveränderung auf. Im Einzelnen wurden jeweils 2 Mutationen im Exon 4 und Exon 7, sowie jeweils eine im Exon 5 und Exon 6 detektiert (Tab. 5, siehe Anhang).

Bei den Mutationen handelte es sich um eine Missense-Mutation, zwei Insertionen, eine Deletion sowie zwei stille Mutationen.

4.3 p53-Proteinexpression

4.3.1 p53-Expression in Ovarialkarzinomen

Die Analyse der p53-Proteinexpression erfolgte unter Verwendung des monoklonalen Maus-Antikörpers DO-7 (DAKO, Hamburg). Dabei wurde die Immunreaktivität für p53 als Prozentzahl von gefärbten Zellen durch das Auszählen von durchschnittlich 150 Tumorzellen bestimmt. Tumoren mit mehr als 10 % gefärbten Zellen wurden als p53-positiv eingestuft. Bei der immunhistochemischen Auswertung vom p53-Protein zeigte sich sowohl ein zytoplasmatisches als auch ein nukleäres Expressionsmuster. 51,4 % der Fälle wiesen eine Überexpression des p53-Proteins auf. 18,7 % der Ovarialkarzinome zeigten eine Färbung von 10 % der Tumorzellen oder weniger und 30,2 % wurden als p53-negativ bewertet (Abb. 7). Benignes Ovarialgewebe diente als Kontrolle und wies keine Expression von p53 auf.



4.3.2 p53-Expression in Borderline-Tumoren

Bei der immunhistochemischen Auswertung der Borderline-Tumoren konnte eine Überexpression des p53-Proteins in 16,2 % (7/43) der Fälle nachgewiesen werden. Bei zwei Proben war die Bestimmung der p53-Expression aufgrund des fehlenden Materials nicht möglich.

4.4 Verhältnis von p53-Expression und Genstatus

Korreliert man die erhobenen Daten der Immunhistochemie mit denen des Genstatus von p53 bei den Ovarialkarzinomen, so ergibt sich folgendes Bild: in 54 % der Fälle mit mutiertem p53 konnte auch eine Überexpression des p53-Proteins nachgewiesen werden (Tab. 6). Im Gegensatz dazu wiesen 49 % der Fälle mit Wildtyp-Gen eine Überexpression von p53 auf. Dies war ein unerwartet hoher Prozentsatz, denn intaktes p53 sollte immunhistochemisch aufgrund

der kurzen Halbwertszeit nicht nachweisbar sein. Somit korreliert in unseren Untersuchungen die Überexpression von p53 nicht mit dem Mutationsstatus ($p=0,59$; χ^2 -Test).

In Hinblick auf den Mutationstyp konnte in unseren Untersuchungen eine Überexpression von p53 lediglich in Missense- und Spleißstellen-Mutationen detektiert werden. Von den 27 Fällen mit Missense-Mutationen lag der Nachweis von überexprimiertem p53 bei 81 %. Bei den Fällen mit Nachweis einer Nonsense-Mutation sowie Deletionen/Insertionen fand sich erwartungsgemäß keine Expression von p53.

Tabelle 6: Zusammenhang von p53-Mutationstyp und p53-Expression

<i>Mutationstyp</i>	<i>p53-Expression</i>	
	<i>negativ n</i>	<i>positiv n (%)</i>
Missense	5	22 (81,5)
Nonsense	4	0 (0)
Deletionen/Insertionen	11	0 (0)
Spleißstellen	0	2 (100)
Signifikanz (p)	p=0,0001	
p53-Mutationen	20	24 (54,5)
p53-Wildtyp	32	31 (49,2)

Für die weitere Auswertung unterteilten wir die Fälle entsprechend ihres Expressions- und Mutationsstatus in vier Gruppen (I-IV). Als „p53 normal“ wurden Proben mit Wildtyp-Gen p53 und nicht nachweisbarem Protein eingestuft (I), da hier vermutlich funktionsfähiges p53-Protein vorlag. In unserer Studie waren dies 29,9 % der Fälle. Die weiteren drei Gruppen enthielten Fälle mit Veränderungen von p53: (II) Fälle mit p53-Wildtyp-Gen, jedoch mit p53-Überexpression, (III) Fälle mit p53-Mutation und p53-Überexpression und (IV) Fälle mit p53-Mutation, jedoch ohne nachweisbare p53-Proteinexpression. Verglichen mit den Werten aus der Literatur zeigen unsere Ergebnisse einen relativ hohen Anteil an Ovarialkarzinomen mit p53-Wildtyp-Sequenz und Proteinüberexpression. Der Prozentsatz der Tumoren mit intaktem p53 liegt bei 29,9 %, bei denen mit Nachweis einer p53-Mutation und Proteinüberexpression bei 22,4 % (Tab. 7). Anhand unserer Untersuchungen wird deutlich, dass mittels Genstatus allein keine Vorhersage der Proteinexpression möglich ist.

Tabelle 7: Einteilung der OVCA anhand p53-Expressions- und Mutationsstatus

<i>Gruppeneinteilung der OVCA</i>	<i>Anzahl</i>	
	<i>n=107</i>	<i>Prozent</i>
p53 intakt	32	29,9 %
p53-Wildtyp-Gen/Überexpression	31	29,0 %
p53-Mutation/Überexpression	24	22,4 %
p53-Mutation	20	18,7 %

4.5 Zusammenhang zwischen p53-Status und klinischen Daten

In unserer Studie analysierten wir, ob es einen Zusammenhang zwischen dem Mutations- und Expressionsstatus der Ovarialkarzinome mit verschiedenen klinisch-pathologischen Daten gibt. Diese umfassten neben der Histologie der Tumoren die Stadieneinteilung, den Nachweis von Aszites, das Ansprechen auf die Chemotherapie und die Größe des Resttumors.

4.5.1 Korrelation zwischen p53-Status und Histologie

Wir untersuchten, ob es Unterschiede zwischen den histologischen Subtypen der Ovarialkarzinome und dem p53-Status gibt. Dabei fanden wir heraus, dass der Anteil an Fällen mit mutiertem p53 bei den serösen Ovarialkarzinomen 43,5 % betrug; bei den nicht-serösen lag dieser bei 37,8 % und bei den undifferenzierten Tumoren bei 37,5 %. Ebenso konnten wir feststellen, dass der Anteil der Fälle mit p53-Überexpression bei den serösen und den undifferenzierten Ovarialkarzinomen höher war als bei den klarzelligen und endometroiden Tumoren (Tab. 8). Die Aussagekraft der Ergebnisse ist jedoch eingeschränkt, da teilweise nur wenige Fälle der unterschiedlichen Histologien vorlagen und damit begrenzt vergleichbar sind.

Tabelle 8: Zusammenhang von p53-Status und Histologie

<i>Histologie</i>	<i>p53-Mutationsstatus</i>		<i>p53-Expression</i>	
	<i>Wildtyp</i>	<i>mutiert</i>	<i>negativ</i>	<i>positiv</i>
serös	35	27 (43,5 %)	25	37 (59,7 %)
muzinös	1	1 (50 %)	0	2 (100 %)
endometroid	11	3 (21,4 %)	13	1 (7,1 %)
klarzellig	6	3 (33,3 %)	7	2 (22,2 %)
transitionalzellig	0	1 (100 %)	0	1 (100 %)
undifferenziert	5	3 (37,5 %)	3	5 (62,5 %)
gemischt	5	6 (54,5 %)	4	7 (63,6 %)

4.5.2 Korrelation zwischen p53-Status und FIGO-Stadium

Wir analysierten, ob es einen Zusammenhang zwischen Expressions- und Mutationsstatus von p53 und dem FIGO-Stadium der Ovarialkarzinome gibt. Dabei konnten generell Veränderungen von p53 im Sinne von Mutationen und/oder Proteinüberexpression häufiger in fortgeschrittenen Ovarialtumoren nachgewiesen werden. Es zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen Proteinüberexpression und Tumorstadium ($p=0,01$; Tab. 9). Mutiertes p53 wurde in den frühen Stadien nach FIGO I und II seltener detektiert als in den fortgeschrittenen Stadien. Das Ergebnis erreichte keine statistische Signifikanz ($p=0,096$), ein Trend war jedoch erkennbar.

Tabelle 9: Zusammenhang von p53-Status und FIGO-Stadium beim Ovarialkarzinom

<i>FIGO Stadium</i>	<i>p53-Mutationsstatus</i>		<i>p53-Expression</i>	
	<i>Wildtyp</i>	<i>mutiert</i>	<i>negativ</i>	<i>positiv</i>
I	22	8 (26 %)	22	8 (27 %)
II	7	2 (22 %)	5	4 (44 %)
III	32	31 (49 %)	23	40 (63 %)
IV	2	3 (60 %)	2	3 (66 %)
p	p=0,096		p=0,01	
Zusammenfassung	63	44 (41,1 %)	53	55 (51,4 %)

4.5.3 Korrelation zwischen p53-Status und Aszites

Weder der p53-Mutationsstatus noch die p53-Expression korrelierten mit dem Auftreten von Aszites (Tab. 10). In nur 34,5 % der Fälle mit mutiertem p53 konnte auch Aszites nachgewiesen werden, verglichen dazu lag der Prozentsatz der Fälle mit p53-Mutationen ohne Aszites bei 40,6%.

Tabelle 10: Zusammenhang von p53-Status und Aszites

<i>Klinische Daten</i>	<i>p53-Mutationsstatus</i>		<i>p53-Expression</i>	
	<i>Wildtyp</i>	<i>mutiert</i>	<i>negativ</i>	<i>positiv</i>
Aszitesnachweis	19	10 (34,5 %)	13	16 (55,2 %)
kein Aszites	19	13 (40,6 %)	17	15 (46,9 %)
p	p=0,621		p=0,517	

4.5.4 p53-Status und Nachweis von Resttumor

Weiterhin untersuchten wir, ob es einen Zusammenhang zwischen Mutations- und Expressionsstatus von p53 und dem Nachweis eines Resttumors gibt. Betrachtet man zunächst den Expressionsstatus, so zeigt sich ein signifikantes Ergebnis, denn bei knapp einem Drittel der Patientinnen ohne Resttumor, jedoch bei 62 % der Frauen mit Resttumor konnte eine Überexpression von p53 detektiert werden ($p=0,05$; Tab. 11). Im Gegensatz dazu fanden wir keine Korrelation zwischen p53-Mutationsstatus und Resttumor ($p=0,125$).

Tabelle 11: Zusammenhang von p53-Status und Nachweis eines Resttumors

<i>Nachweis von Resttumor</i>	<i>p53-Mutationsstatus</i>		<i>p53-Expression</i>	
	<i>Wildtyp</i>	<i>mutiert</i>	<i>negativ</i>	<i>positiv</i>
ja	30	26 (46,4 %)	21	35 (62,5 %)
nein	27	12 (30,8 %)	26	13 (33,3 %)
p	p=0,125		p=0,05	
Zusammenfassung	57	38	47	48

4.5.5 p53-Status, Ansprechen auf Chemotherapie und Rezidivnachweis

Da Patientinnen mit Ovarialkarzinomen häufig ein Rezidiv erleiden, analysierten wir, ob der p53-Status Einfluss auf das Ansprechen von Chemotherapeutika und auf den Nachweis eines Rezidivs hat. Frührezidive, die nach weniger als 6 Monaten nach der Primäroperation auftraten, werden als platinresistent bezeichnet.

Wir fanden heraus, dass Patientinnen mit p53-Veränderungen (Mutationen und/oder Überexpression) signifikant resistenter (78 %) gegenüber der Chemotherapie waren und früher an einem Rezidiv erkrankten als Patientinnen mit „normalem“ p53 (52 %; $p=0,027$), d.h. mit Wildtyp-Gen und keiner nachweisbaren Proteinexpression (Tab. 12). Dies galt für die Ergebnisse der immunhistochemischen Proteinexpression beim Vergleich von Tumoren mit p53-Überexpression (82 %; $p=0,02$) mit Tumoren ohne p53-Anfärbung (58 %). Ebenso waren Patientinnen mit Mutationen im p53-Gen resistenter gegenüber einer Chemotherapie (78 %) im Vergleich zu Patientinnen mit p53-Wildtyp-Gen (65 %), dies erreichte jedoch keine statistische Signifikanz ($p=0,22$).

Tabelle 12: Zusammenhang von p53-Status, p53-Expression und Ansprechen auf Chemotherapie

<i>Ansprechen auf Chemotherapie</i>	<i>p53-Mutationsstatus</i>		<i>p53-Expression</i>	
	<i>Wildtyp</i>	<i>mutiert</i>	<i>negativ</i>	<i>positiv</i>
sensitiv	15	7 (31,8 %)	15	7 (31,8 %)
resistent	28	25 (47,2 %)	21	32 (60,4 %)
p	p=0,221		p=0,024	
Zusammenfassung	43	32	36	39

Zudem stellten wir fest, dass der Nachweis eines Rezidivs in 64 % der Fälle mit einer Überexpression von p53 einhergeht und somit die Proteinüberexpression mit einem Rezidiv korreliert ($p=0,05$). Verglichen dazu wurde bei nur 30 % der Patientinnen ohne Rezidiv eine Überexpression von p53 detektiert (Tab. 13). Die Ergebnisse beim Vergleich zwischen Mutationsstatus und Auftreten eines Rezidivs waren nicht signifikant.

Tabelle 13: Zusammenhang von p53-Status, p53-Expression und Nachweis eines Rezidivs

<i>Nachweis eines Rezidivs</i>	<i>p53-Mutationsstatus</i>		<i>p53-Expression</i>	
	<i>Wildtyp</i>	<i>mutiert</i>	<i>negativ</i>	<i>positiv</i>
ja	34	30 (46,9 %)	23	41 (64,1 %)
nein	16	7 (30,4 %)	16	7 (30,4 %)
p	p=0,171		p=0,05	
Zusammenfassung	50	37	39	48

Unsere Ergebnisse zeigen anhand der Einteilung des p53-Gesamtstatus, dass bei Patientinnen, deren Tumoren verändertes p53 (durch Mutationen und/oder Überexpression) besitzen, jene schlechter auf eine platinhaltige Chemotherapie ansprechen und somit ein höheres Rezidivrisiko aufweisen. Die Ergebnisse waren besonders deutlich bei den Patientinnen mit p53-Überexpression und Vorliegen einer Mutation des p53-Gens, interessanterweise jedoch auch bei Patientinnen mit p53-Wildtyp und Überexpression (Tab. 14).

Tabelle 14: Zusammenhang von p53-Status, p53-Expression und Nachweis eines Rezidivs

<i>p53-Mutations- und Expressionsstatus</i>	<i>Nachweis eines Rezidivs</i>	
	<i>ja</i>	<i>nein</i>
p53 intakt	12	11
Wildtyp +Überexpression	22	5
Mutation +Überexpression	19	2
Mutation	11	5
Zusammenfassung	64	23

4.5.6 Korrelation zwischen p53-Gesamtstatus sowie low-grade, high-grade und Borderline-Tumoren

Bei der Einteilung der Tumoren nach deren Genese in low-grade, high-grade und Borderline-Tumoren konnten Veränderungen von p53 (Mutation und/oder Überexpression) in 84 % der high-grade Karzinome nachgewiesen werden. Verglichen dazu lag der Prozentsatz bei den low-grade Tumoren bei 33 % sowie bei 22 % bei den Borderline-Tumoren (Tab. 15).

Eine Proteinüberexpression bei vorhandener p53-Wildtypsequenz fand sich bei 36 % in den high-grade Karzinomen. Hingegen lag der Prozentsatz bei den low-grade Tumoren bei lediglich 10 %, vergleichbar mit 7 % bei den Borderline-Tumoren.

Die deutlich geringere Anzahl der p53-Mutationen in den low-grade und Borderline-Tumoren verglichen zu den high-grade Karzinomen weisen auf die unterschiedliche Rolle hin, die die p53-Mutationen bei der Entstehung der low-grade und high-grade Karzinome haben und unterstützen das dualistische Modell der Tumorgenese.

Tabelle 15: Zusammenhang von p53-Status und Borderline sowie low-grade und high-grade Karzinomen

<i>p53-Mutations- und Expressionsstatus</i>	<i>Ovarialkarzinome</i>		
	<i>Borderline-Tumoren</i>	<i>low-grade Tumoren</i>	<i>high-grade Tumoren</i>
p53 intakt	21	20	12
p53-Wildtyp+Überexpression	2	3	28
p53-Mutation+Überexpression	1	4	20
p53-Mutation	3	3	17
Gesamt	27	30	77

4.6 SNP309-Allelfrequenz und Alter bei Diagnosestellung

4.6.1 SNP309-Status im MDM2-P2-Promotor

MDM2 ist ein wichtiger Regulator im p53-Pathway. Bond *et al.* konnten im Bereich des P2-Promotors von MDM2 einen Polymorphismus (Single-Nucleotid-Polymorphism 309) identifizieren, welcher bei Vorliegen des G-Allels mit einer Abschwächung des p53-Tumorsuppressorweges einhergeht [52]. Im Jahre 2006 fand man bei den Untersuchungen von B-Zell-Lymphomen und Weichteilsarkomen heraus, dass das G-Allel des SNP309 geschlechtsspezifisch mit einem früheren Erkrankungsalter bei Frauen, nicht jedoch bei Männern, verbunden ist [53]. Daher analysierten wir neben den p53-Veränderungen den SNP309-Status in 103 der 107 Ovarialkarzinompatientinnen, um herausfinden, welchen Einfluss dieser bei der Tumorentstehung und der Prognose der Patientinnen hat.

In unserer Arbeit zeigte sich folgende Verteilung der drei verschiedenen Genotypen des SNP309: T/T 42,1 %, T/G 50,2 % und G/G 7,7 %. Im Vergleich sieht diese bei gesunden, weiblichen Blutspendern mit ähnlicher Altersverteilung wie folgt aus: T/T 47 %, T/G 43 % und G/G 10 %.

Überraschenderweise konnten wir keine relevanten Unterschiede in Hinblick auf das Erkrankungsalter bei den Patientinnen erkennen ($p=0,53$; Abb. 8).

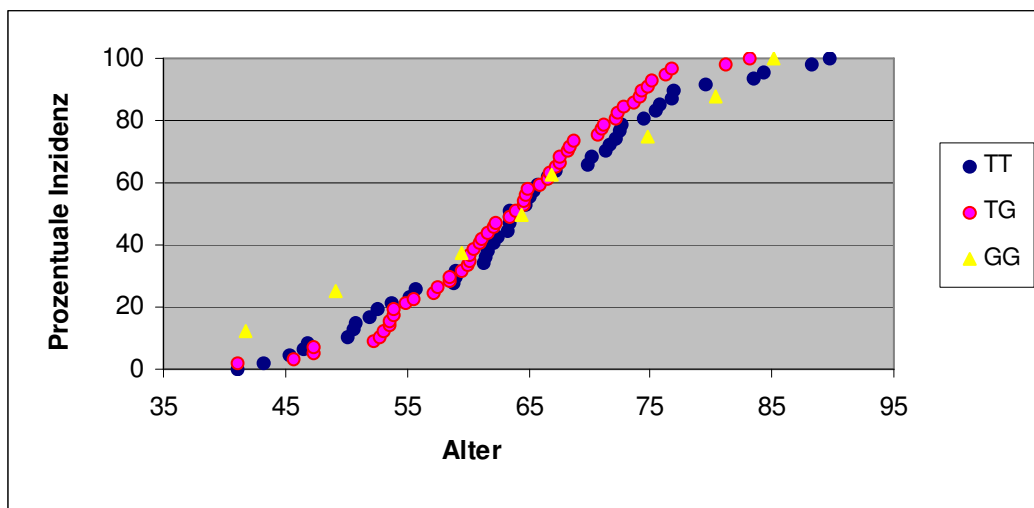


Abbildung 8: Erkrankungsalter abhängig von verschiedenen Genotypen des SNP309

Da dies ein unerwartetes Ergebnis war, und Bond *et al.* in ihrer Studie zeigten, dass das G-Allel einen intakten Östrogenignalweg zur beschleunigten Tumorentstehung benötigt, untersuchten wir zusätzlich die Östrogenrezeptor-Expression- α (ER α -Expression).

Bei Ovarialkarzinompatientinnen mit FIGO Stadium I liegt aufgrund der guten Prognose keine Notwendigkeit für neue therapeutische Ansätze vor, daher wurden im Folgenden weitere

Untersuchungen mit Proben des FIGO-Stadium III vorgenommen, da sich die Mehrzahl der Patientinnen im fortgeschrittenen Stadium befindet und die Ergebnisse wichtige prognostische Hinweise für diese Frauen liefern können.

Wir fanden heraus, dass 43,6 % der Tumoren Östrogenrezeptor-negativ waren, 15,5 % zeigten eine geringe und 40,9 % eine hohe Östrogenrezeptor-Expression. Bei Patientinnen im FIGO Stadium III mit nachweisbarer ER-Expression ist die Existenz des SNP309 mit einem fast 6 Jahre früheren Auftreten des Tumors verbunden (T/T: 70,6 Jahre, T/G+G/G: 64,4 Jahre), obwohl der Unterschied statistisch nicht relevant ist ($p=0,101$). Patientinnen mit stark erhöhter Östrogenrezeptor-Expression weisen hingegen ein signifikant früheres Auftreten des Karzinoms auf, der Unterschied beträgt 7 Jahren ($p=0,025$; Abb. 9).

Bei Patientinnen mit ER-negativen Tumoren ergab sich kein Unterschied hinsichtlich des Alters bei Diagnosestellung ($p=0,44$; Abb. 10). Unsere Ergebnisse stützen somit die Hypothese, dass der Effekt des G-Allels beim SNP309 nur bei stark erhöhter Östrogenrezeptor-Expression eine Rolle spielt und somit der Polymorphismus einen intakten Östrogensignalweg benötigt, um die Tumorentstehung zu beschleunigen.

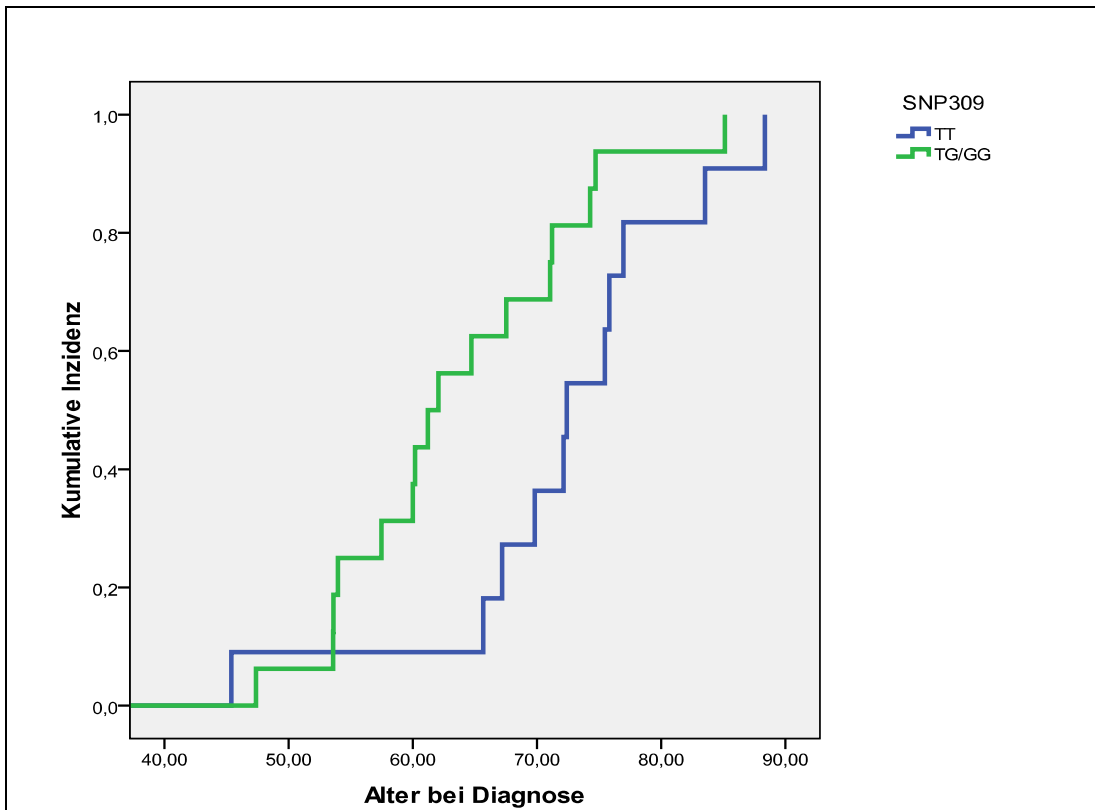


Abb. 9: SNP309-Status und Diagnosealter bei Patientinnen mit ER-stark positiven Tumoren ($p=0,025$)

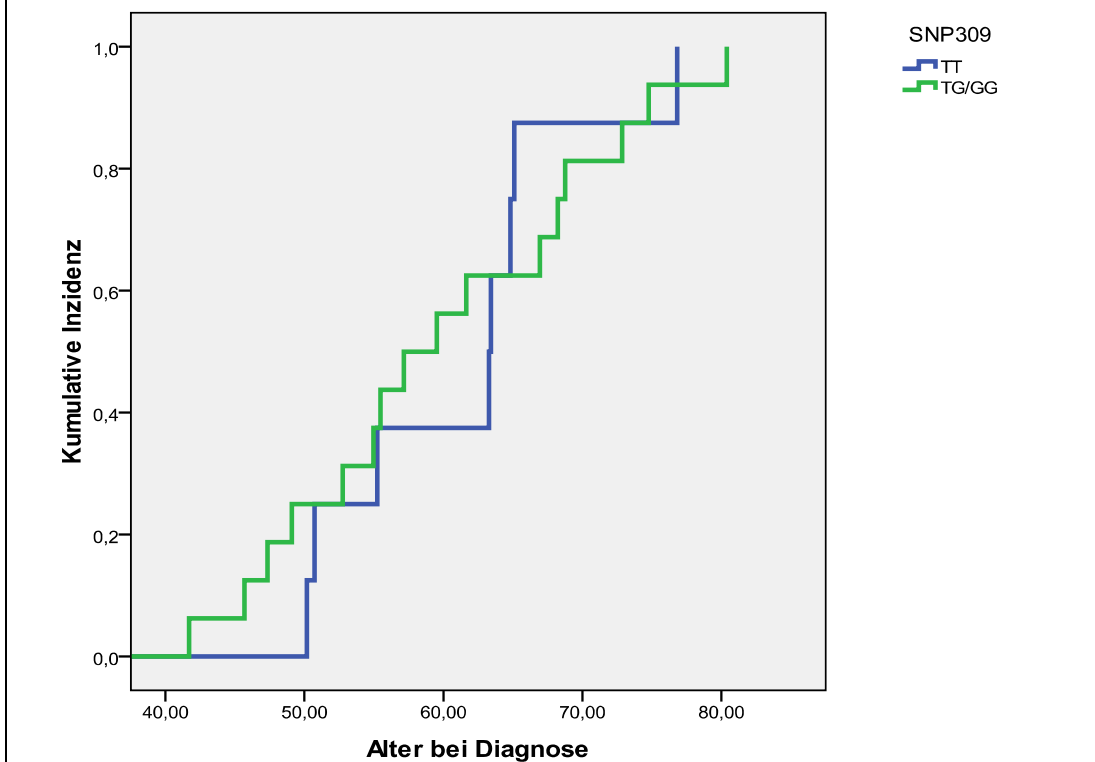


Abb. 10: SNP309-Status und Diagnosealter bei Patientinnen mit ER-negativen Tumoren ($p=0,44$)

4.6.2 SNP309-Status in Borderline-Tumoren

Bei den Borderline-Tumoren wurden 64 Fälle auf den Status des SNP309 untersucht. Dabei konnten wir folgende Verteilung nachweisen: T/G 54,7 %, T/T 34,4 % und G/G 10,9 %. Im Vergleich dazu die Verteilung bei den Kontrollen von gesunden weiblichen Blutspendern: T/T 42,1 %, T/G 50,2 % und G/G 7 %.

Das Alter der Diagnosestellung liegt bei Patientinnen mit Vorliegen eines heterozygoten Zustandes T/G bei 56,3 Jahren, bei T/T liegt diese bei 51,9 Jahren und bei Vorliegen des homozygoten G/G bei 47,9 Jahren. Der Unterschied ist jedoch nicht signifikant ($p=0,39$).

4.7 Korrelation von p53- und SNP309-Status auf das Gesamtüberleben

4.7.1 p53-Mutationsstatus und Gesamtüberleben

Im folgenden Schritt wollten wir herausfinden, ob es einen Zusammenhang zwischen dem p53-Mutationsstatus und der mittleren Überlebenszeit gibt. Dabei stellten wir fest, dass der Nachweis einer Mutation im p53-Gen keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patientinnen hat. Die mittlere Überlebenszeit von Frauen, deren Tumor ein mutiertes p53-Gen aufwies, lag bei 58 Monaten, bei Patientinnen mit p53-Wildtypsequenz im Tumor lag diese bei 62 Monaten ($p=0,86$; Abb. 11).

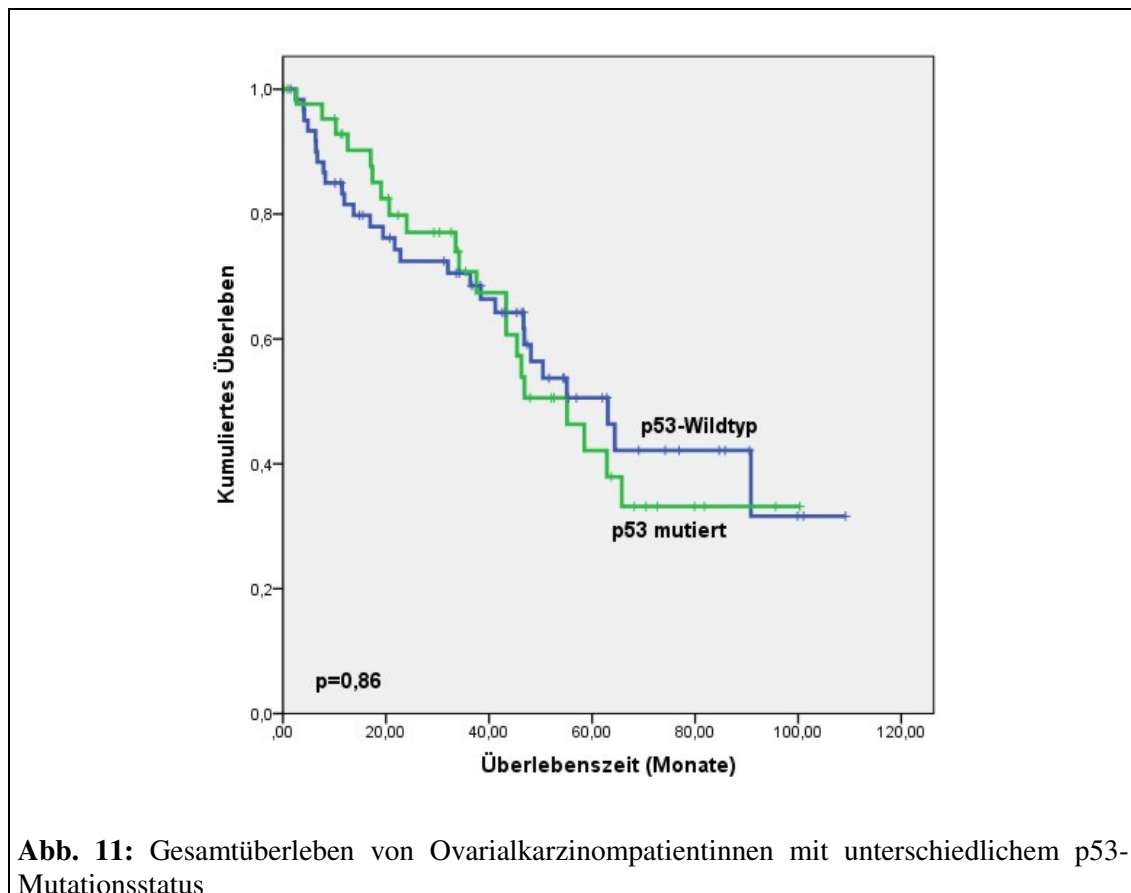


Abb. 11: Gesamtüberleben von Ovarialkarzinompatientinnen mit unterschiedlichem p53-Mutationsstatus

4.7.2 p53-Expressionsstatus und Gesamtüberleben

Wir stellten fest, dass Patientinnen, deren Tumoren überexprimiertes p53 aufwiesen, verglichen zu denen mit fehlender oder schwacher Expression eine signifikant verkürzte Gesamtüberlebenszeit hatten (Abb. 12). Die mittlere Überlebenszeit bei Frauen mit Überexpression des p53 im Ovarialkarzinom lag bei 45 Monaten, im Vergleich dazu lag diese bei 71 Monaten bei Patientinnen, deren Tumoren keine p53-Expression zeigten ($p=0,016$).

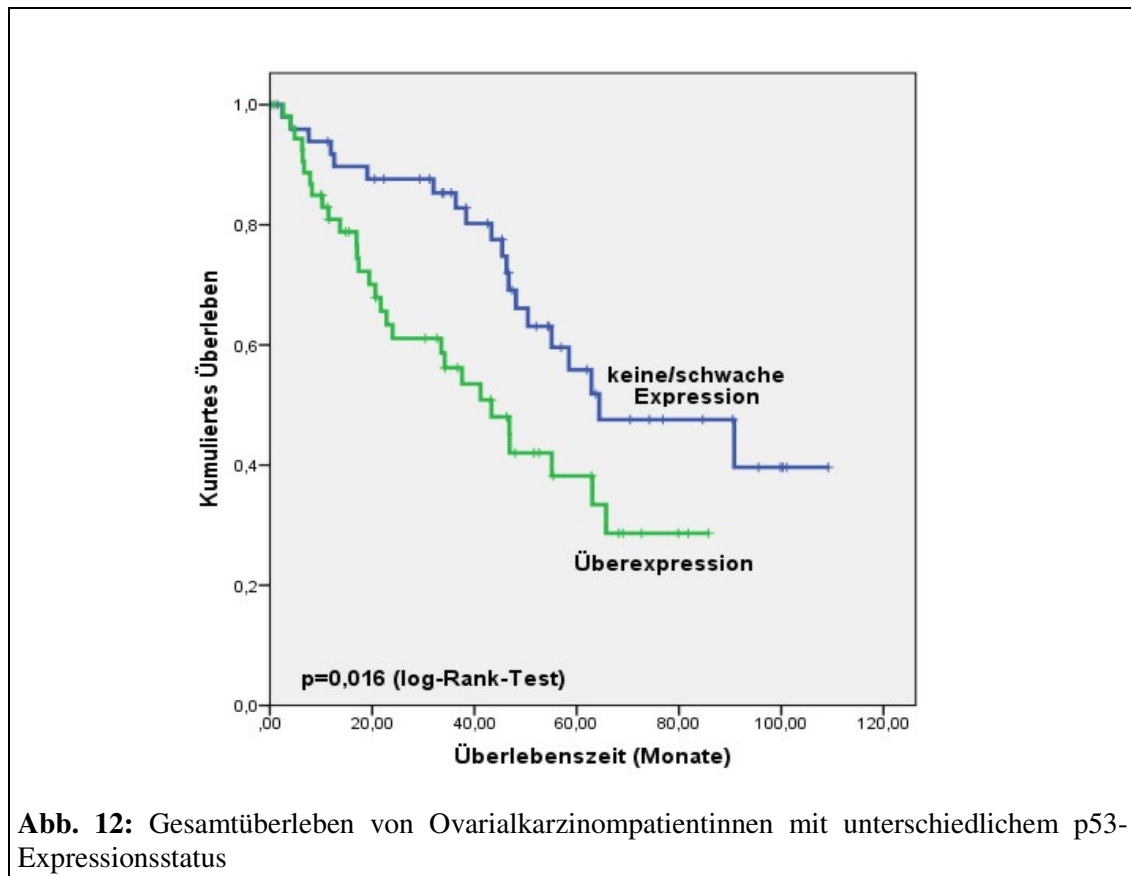
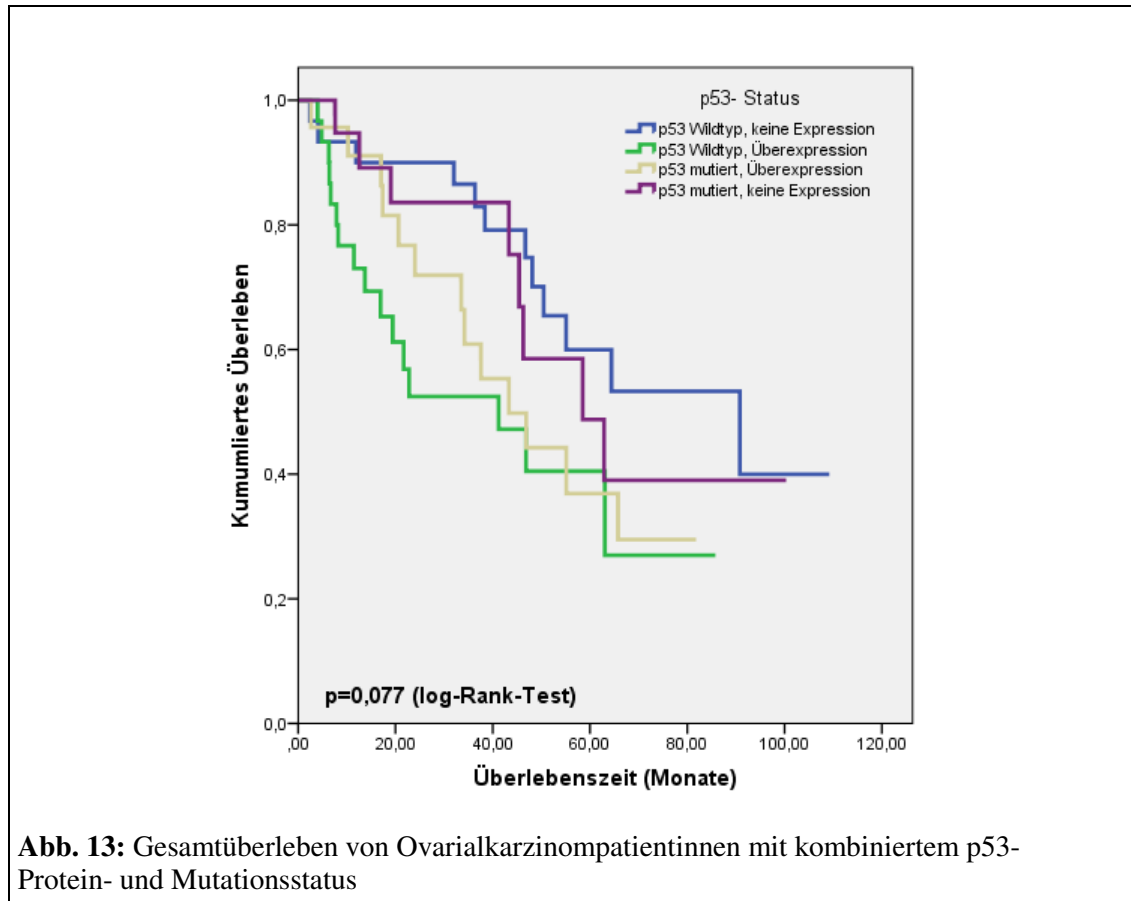


Abb. 12: Gesamtüberleben von Ovarialkarzinompatientinnen mit unterschiedlichem p53-Expressionsstatus

4.7.3 p53-Gesamtstatus und Gesamtüberleben

Betrachtet man die erhobenen Daten des Gesamtstatus von p53 (Mutations- und Expressionsstatus) und die mittlere Überlebenszeit, so zeigt sich überraschenderweise, dass Patientinnen, deren Tumoren das Wildtyp-p53-Protein überexprimierten, die kürzeste Gesamtüberlebenszeit aufweisen (Abb. 13). Die mittlere Überlebenszeit lag hier bei 42,8 Monaten. Im Gegensatz dazu hatten Patientinnen, deren Tumoren eine Überexpression und Mutationen des p53-Gen aufwiesen, eine mittlere Überlebenszeit von 48,2 Monaten. Bei Frauen mit Ovarialkarzinomen ohne nachweisbare p53-Expression und p53-Wildtyp-Gen lag diese bei 74 Monaten und bei denjenigen mit mutiertem p53 im Tumor bei 64,4 Monaten. Der Unterschied zwischen allen Gruppen ist nicht signifikant ($p=0,077$; log-Rank-Test).

Vergleicht man jedoch die Gruppe der Patientinnen, deren Tumoren eine p53-Wildtypsequenz und keine nachweisbare Expression aufwiesen mit denjenigen mit Wildtyp-Gen und p53-Überexpression, so erreicht das Ergebnis statistische Signifikanz ($p=0,02$; log-Rank-Test).



Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass Frauen, deren Karzinome eine p53-Wildtypsequenz und keine nachweisbare Proteinexpression besitzen, die längste Überlebenszeit hatten, verglichen zu denjenigen, deren Tumoren eine Proteinüberexpression mit Wildtypsequenz oder mutiertem p53 aufweisen.

Interessanterweise hatten bei der Analyse von Patientinnen mit Ovarialtumoren im FIGO-Stadium III diejenigen mit Wildtyp-p53-Gen ein verkürztes Gesamtüberleben gegenüber Patientinnen mit mutiertem p53. Dieses Ergebnis ist nahezu statistisch signifikant (40,6 Monate vs. 59 Monate; $p=0,058$).

4.7.4 SNP309-Status und Gesamtüberleben

Unsere Ergebnisse des SNP309-Status zeigen, dass die durchschnittliche Überlebenszeit für Ovarialkarzinompatientinnen mit T/T-Status 59 Monate und für Patientinnen mit G-Allel 62 Monate betrug ($p=0,994$).

Auch hier wurden weitere Untersuchungen bei Patientinnen im FIGO-Stadium III vorgenommen. Dabei stellten wir fest, dass das G-Allel mit einem signifikant verlängerten Gesamtüberleben verbunden ist (57,5 Monate), im Vergleich zu Frauen mit T/T-Status (35,3 Monate, $p=0,045$). Bei der weiteren Unterteilung entsprechend des Östrogenrezeptorstatus konnten wir zeigen, dass Patientinnen mit ER-negativen Tumoren und mit T/G- bzw. G/G-Status eine signifikant verlängerte Überlebenszeit hatten ($p=0,024$), im Vergleich mit Frauen mit T/T-Genotyp des SNP309 (69 vs. 34 Monate; Abb. 14).

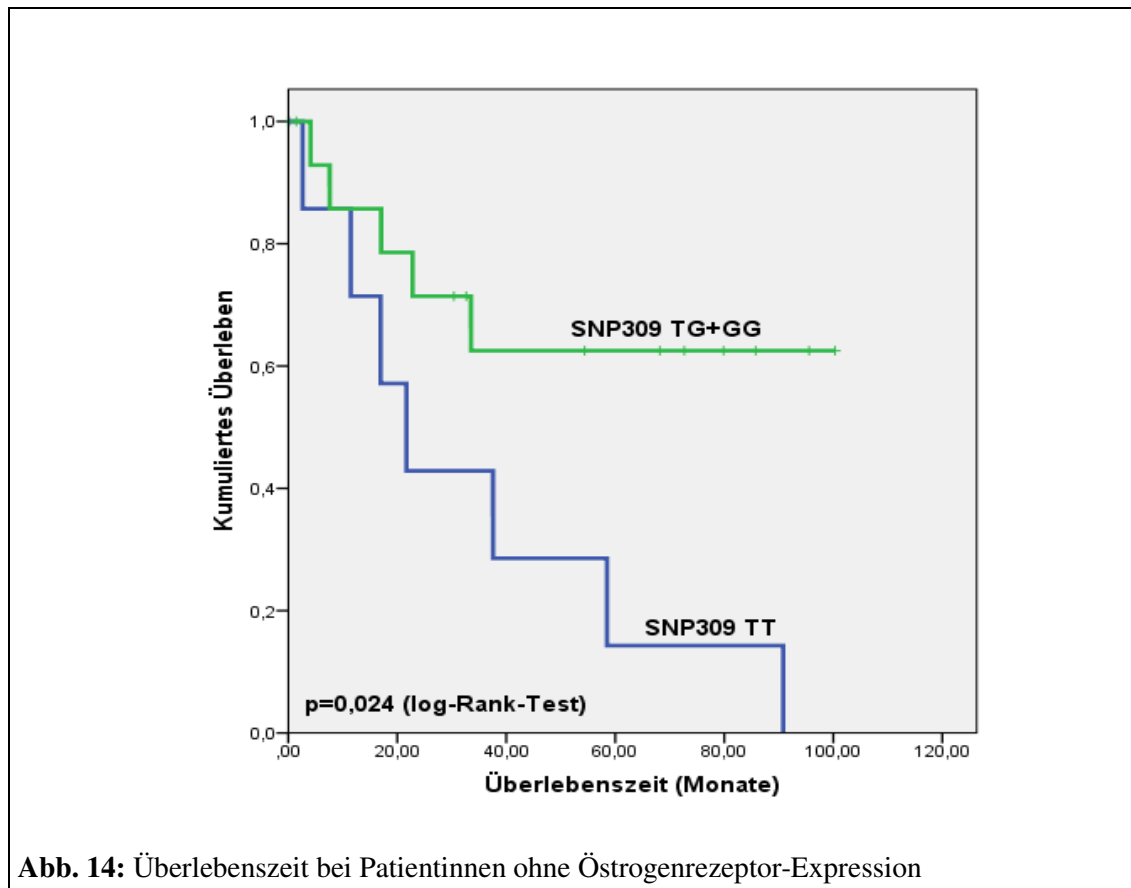


Abb. 14: Überlebenszeit bei Patientinnen ohne Östrogenrezeptor-Expression

Im Gegensatz dazu stellten wir fest, dass das G-Allel keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben von Patientinnen mit ER-positiven Tumoren hat, unabhängig davon, ob eine geringe ($p=0,425$) oder eine starke Expression vorlag ($p=0,828$). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein geschwächter p53-Signalweg, sei es durch Mutation oder dem G-Allel des SNP309, mit einer besseren Prognose für Ovarialkarzinompatientinnen verbunden ist.

Zur Ermittlung prognostischer Faktoren, die Einfluss auf die Überlebenszeiten der Ovarialkarzinompatientinnen haben, erstellten wir ein Cox-Regressionsmodell (Tab. 16). Anhand der univariaten Analyse konnten wir zeigen, dass Tumoren mit p53-

Proteinüberexpression und Wildtypsequenz sowie immunhistochemischer Proteinnachweis wichtige prognostische Faktoren sind. Hingegen liefert der Nachweis einer p53-Mutation keine Rückschlüsse auf die Prognose ($p=0,864$). Weitere prognostische Faktoren waren Resttumorgröße, FIGO-Stadium, Rezidiventwicklung sowie eine undifferenzierte Histologie. In der multivariaten Analyse waren jedoch nur Resttumorgröße, FIGO-Stadium und das Auftreten von Rezidiven unabhängige prognostische Marker für das Gesamtüberleben.

Tabelle 16: ermittelte Signifikanz der molekularen und klinischen Faktoren durch multivariate Cox-Regression

Variablen	univariate Analyse			multivariate Analyse ^a		
	Nicht-adjustiert RR	95% Konfidenzintervall	P	adjustiert RR	95% Konfidenzintervall	P
<u>p53-Immunhistochemie</u>						
negativ	1,00			1,00		
positiv	2,021	1,13 – 3,616	0,018	1,331	0,703 – 2,522	0,38
<u>p53-Mutationen</u>						
Wildtyp	1,00			1,00		
mutiert	1,051	0,596 – 1,851	0,864	0,648	0,333 – 1,26	0,201
<u>p53 IHC+Mutationen</u>						
normal	1,00			1,00		
Wildtyp, Überexpression	2,548	1,188 – 5,465	0,016	1,598	0,662 – 3,856	0,297
mutiert, keine Expression	1,922	0,87 – 4,246		0,884	0,336 – 2,325	
mutiert, Überexpression	1,284	0,524 – 3,145		0,820	0,299 – 2,246	
<u>p53</u>						
normal	1,00			1,00		
verändert	1,901	0,985 – 3,667	0,045	1,107	0,498 – 2,461	0,804
<u>Histologie</u>						
serös	1,00			1,00		
nicht-serös	1,938	1,011 – 3,717		1,449	0,672 – 3,124	
undifferenziert	3,679	1,284 – 10,54	0,032	1,590	0,419 – 6,033	0,496
<u>Aszites</u>						
nein	1,00			1,00		
ja	3,015	1,27 – 7,161	0,01	1,681	0,695 – 1,681	0,249
<u>Rezidiv</u>						
nein	1,00			1,00		
ja	22,340	3,072 – 162,54	0,002	1,177	1,374 – 100,77	0,024
<u>Resttumor</u>						
nein	1,00			1,00		
ja	6,556	2,976 – 14,444	<0,001	5,26	1,648 – 29,588	0,008
<u>FIGO</u>						
I	1,00			1,00		
II	1,462	0,449 – 4,764		1,403	0,378 – 5,210	
III	3,175	1,505 – 6,697	<0,001	1,542	0,523 – 4,541	
IV	9,922	2,932 – 33,577		6,983	1,648 – 29,588	0,008

^a adjustiert nach FIGO-Stadium und Resttumor

5 Diskussion

Das Ovarialkarzinom weist in der westlichen Welt unter den gynäkologischen Tumoren die höchste Sterblichkeitsrate auf, vor allem bedingt durch den symptomarmen Verlauf der Erkrankung und der daraus resultierenden Diagnosestellung in bereits fortgeschrittenen Stadien [73].

Trotz großer Bemühungen, molekulare Prognosemarker zu identifizieren, bleiben in multivariaten Analysen die Resttumorgröße und der Nachweis eines Rezidivs die einzigen signifikanten Parameter für Patientinnen in fortgeschrittenen Stadien.

Karzinogenese ist ein multifaktorieller Prozess, der zu Fehlregulationen in zellulären Stoffwechselvorgängen aufgrund von genetischen Alterationen führt. Ein Schlüsselprotein in der molekularen Tumorgenese ist p53, das in mehr als 50 % der humanen Tumoren verändert ist [74]. Die Funktionalität des Gens wird durch Mutationen oder Polymorphismen verändert und kann als Signalmolekül wiederum die Expression weiterer, in wichtige Signalwege involvierte Gene beeinflussen. So ist beispielsweise das Onkogen MDM2 ein wichtiger negativer Regulator des Tumorsuppressorgens p53 [75].

Das Ziel dieser Arbeit war es, Veränderungen im p53-MDM2-Pathway zu detektieren und Vergleiche mit klinischen Daten wie z.B. Gesamtüberleben und Ansprechen auf Chemotherapie zu erstellen. Wir untersuchten dabei den Status des p53-Gens zusammen mit dessen Proteinexpression sowie den im p53-sensitiven MDM2-P2-Promotor liegenden SNP309 in einer Gruppe von 107 Ovarialkarzinomen und 64 Borderline-Tumoren. Insbesondere betrachteten wir die Alterationen im p53-Signalweg und deren Auswirkungen in Hinblick auf die Prognose der Ovarialkarzinompatientinnen.

5.1 Analyse des p53-Status

Der p53-Status von Ovarialkarzinomen wurde bereits in zahlreichen Studien untersucht. Dabei gibt es jedoch widersprüchliche Ergebnisse. Es zeigen sich Hinweise, dass eher die Überexpression des Proteins [76, 77] als Mutationen [78, 79] des p53-Gens mit einem verkürzten Gesamtüberleben korreliert. Andere Studien konnten wiederum keine signifikante Korrelation zwischen Überexpression und Prognose nachweisen. Problematisch an diesen Untersuchungen ist, dass einerseits mit immunhistochemischen Nachweisverfahren keine verkürzten Proteine erkannt werden, welche durch Nonsense-Mutationen oder Insertionen/Deletionen entstehen können; andererseits ist eine Überexpression von p53 nicht zwangsläufig mit einer Mutation verbunden. Deshalb ist der Gesamtstatus von p53, welcher

sowohl die Genexpression als auch den Genstatus berücksichtigt, aussagekräftiger als nur die Betrachtung des Mutationsstatus oder der Immunhistochemie allein.

Bei 39 % der Ovarialkarzinome detektierten wir Mutationen im p53-Gen, die zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz führen. Dieser Prozentsatz liegt nahe dem in der Literatur beschriebenen Bereich von 40-80 % [58]. In unseren Untersuchungen zeigte sich bei 51 % der Fälle eine positive p53-Immunfärbung. In der Literatur finden sich Werte von 29-62 % [80, 81]. Die unterschiedlichen Ergebnisse lassen sich darauf zurückführen, dass sich viele der publizierten Studien bei Mutationsanalysen auf die Bereiche von Exon 5 bis 8 fokussieren. Entsprechend unserer Ergebnisse befindet sich zwar mit 93 % der Großteil der Mutationen des p53-Gens in diesem Bereich. Dies bedeutet jedoch auch, dass sich 7 % der Mutationen außerhalb der Region befinden. Von diesen wurden in unserer Arbeit weitere 3 Mutationen im Exon 4 nachgewiesen. Das Auftreten von Mutationen im Bereich von Exon 2 bis 4 sowie 9 bis 11 wird in der Literatur mit einem durchschnittlichen Wert von 11 % angegeben [82, 83]. Dies zeigt, dass in Studien, die nur Exon 5 bis 8 im p53-Gen untersuchen, ein Teil der Mutationen nicht detektiert wird.

Anhand des Expressionsstatus ergaben sich in unserer Arbeit keine Rückschlüsse auf den p53-Mutationsstatus. Es zeigte sich, dass 49 % der Fälle mit einem Wildtyp-Gen auch positiv für die p53-Immunfärbung waren. Verglichen mit anderen Publikationen ist dieser Wert sehr hoch. Beispielsweise fanden Havrilesky *et al.* [59] in 28 % und Reles *et al.* [84] in 38 % der von ihnen untersuchten Tumoren eine Überexpression des p53-Proteins bei Vorhandensein eines Wildtyp-Gens. Normalerweise wird das Wildtyp-Protein von p53 aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit nur in geringem Maße expremiert und sollte daher immunhistochemisch nicht nachweisbar sein [85]. Interessant ist das Ergebnis, dass es sich in unserer Studie bei 90 % der Wildtyp-überexpremierenden Tumoren um high-grade Karzinome handelt. Die Ursache für diese unerwartet hohe Expression des p53-Proteins ist bisher nicht bekannt. Da dies nicht auf Sequenzveränderungen von p53 zurückzuführen ist, beeinflussen möglicherweise interagierende Proteine wie MDM2 und MDMX die Halbwertszeit und damit die Funktionalität von p53. Weitere Studien sind notwendig, um fundierte Erklärungen für diese Beobachtungen zu liefern. Insbesondere hinsichtlich der Tatsache, dass in unserer Arbeit 82 % dieser Tumoren rezidierten, während dies nur bei 52 % der Patientinnen mit p53-Wildtypsequenz und ohne Expression gesehen wurde.

Wie auch in der Arbeit von Tachibana *et al.* [86] gezeigt wurde, können die Unterschiede in der Proteinexpression ebenso wie die verschiedenen Ergebnisse der Korrelationen mit klinisch-pathologischen Faktoren und dem Überleben auf das unterschiedliche Verwenden von Antikörpern oder Färbemethoden zurückgeführt werden. So wurden beispielsweise in der Studie von Bauerschlag *et al.* 3 verschiedenen Verfahren (SSCP, Immunhistochemie und FASAY) in Hinblick auf die Bestimmung des p53-Status angewandt [87]. Dabei zeigte sich eine

unterschiedliche Detektionsrate. Eine Veränderung im p53-Gen wurde als Mutation deklariert, wenn eines der genannten Verfahren eine Alteration ermittelte. Mittels SSCP-Gel wurden 31,5%, durch immunhistochemische Verfahren 39,7 % und mittels FASAY 49,3 % Mutationen detektiert. Das bedeutet, dass in dieser Studie FASAY die Methode mit der größten Übereinstimmung mit dem p53-Mutationsstatus zu sein schien. Da dies wiederum abhängig von beispielsweise Färbemethoden oder Antikörperverwendung ist, werden weiterhin Diskrepanzen zwischen unterschiedlichen Studien entstehen und Vergleiche der Ergebnisse nur bedingt möglich sein. Zusätzlich zu den gewählten Nachweismethoden haben aber auch die individuelle Interpretation der immunhistochemischen Befunde sowie das verwendete Tumormaterial Einfluss auf die Ergebnisse der Studie.

In unserer Arbeit handelte es sich bei 63 % der identifizierten Mutationen um Missense-Mutationen. Dies ist mit den Ergebnissen vieler anderer Studien vergleichbar, die Werte zwischen 62 und 85 % anführen [88, 89]. Deletionen werden in der Literatur gewöhnlich in 7 bis 13 % der Fälle beschrieben, jedoch werden abhängig vom Verfahren und den untersuchten Bereichen (Exon 2 bis 11) Prozentsätze von bis zu 22 % angegeben [90]. In unseren Untersuchungen handelte es sich bei 19 % der Fälle um Deletionen. Zudem fanden wir bei 9 % der untersuchten Proben Nonsense-Mutationen und 7 % waren Insertionen.

Zahlreiche Studien analysierten bereits die Zusammenhänge zwischen p53-Mutationen in Ovarialtumoren und klinischen Variablen, um neue therapeutische Ansätze zu erhalten. Abhängig vom p53-Mutationstyp untersuchten Fallows *et al.* das Outcome von Ovarialkarzinompatientinnen nach Behandlung mit einer platinhaltigen Chemotherapie [78]. Dabei zeigten sich beim Vergleich zwischen Wildtyp-p53, Missense-Mutationen und anderen Mutationen keine signifikanten Unterschiede im Hinblick auf das Gesamtüberleben. In Bezug auf das krankheitsfreie Überleben hatten Patientinnen mit Wildtyp-p53 im Tumor die beste Prognose. Im Vergleich dazu hatten Patientinnen mit Nachweis einer Missense-Mutation die schlechteste Prognose und erkrankten deutlich früher an einem Rezidiv.

Sood *et al.* analysierten das Vorhandensein von Metastasen im Leber- oder Milzparenchym oder extraabdominell in Abhängigkeit von p53-Mutationen [91]. Ein wichtiges Ergebnis der Studie war, dass Ovarialkarzinompatientinnen mit Nachweis einer Nonsense-, Frameshift- oder Spleißstellenmutation ein 8-fach erhöhtes Risiko einer Fernmetastase haben im Vergleich mit Patientinnen, deren Tumoren eine Missense-Mutation oder p53-Wildtyp-Sequenz aufwiesen.

In der Studie von Rose *et al.* wurde das Überleben von Patientinnen mit Ovarialkarzinomen in Zusammenhang mit strukturellen Veränderungen von p53 untersucht [92]. Dabei konnte keine Korrelation zwischen Überlebensrate und spezifischer p53-Mutation entdeckt werden. Im Gegensatz dazu beschreiben Reles *et al.* in ihrer Arbeit, dass Mutationen in den hochkonservierten Regionen von p53 bei Patientinnen mit Ovarialkarzinomen mit einem

aggressiveren klinischen Verhalten assoziiert sind, verglichen mit Mutationen in nicht-konservierten Regionen oder bei Vorliegen der Wildtypsequenz [86].

Mögliche Gründe der kontroversen Ergebnisse in der Literatur könnten zudem am unterschiedlichen Studiendesign liegen. Abhängig von der Fallzahl sowie der in einem festgesetzten Zeitraum untersuchten Fälle ergeben sich verschiedene Erkenntnisse. Ein weiterer Grund könnte das unterschiedliche Patientenkollektiv sein, da einige Studien nur seröse Ovarialkarzinome in ihre Betrachtungen einschließen. Daher ist es wichtig, die Kriterien einer Studie genauer festzulegen, um Vergleiche erstellen zu können und die Bedeutung der p53-Veränderungen einheitlicher und übersichtlicher zu betrachten.

In unserer Arbeit zeigten Patientinnen mit Veränderungen im p53-Gen (Mutationen und/oder Überexpression) generell eine schlechtere Prognose und eine verkürzte Überlebenszeit als Patientinnen mit normalem p53. Wir stellten fest, dass das alleinige Auftreten von Mutationen im p53-Gen noch keine Aussage über das Überleben der Patientinnen erlaubt. Denn überraschenderweise haben bei den Patientinnen diejenigen mit Wildtyp-p53 und einer Überexpression die kürzeste Überlebenszeit und weisen durchschnittlich ein früheres Auftreten eines Rezidivs auf.

Da bisher nur wenige Studien (Casey, Havrilesky, Reles) den Gesamtstatus von p53 (Genstatus und Proteinexpression) untersucht haben, zeigt diese Arbeit deutlich, dass der prognostische Wert einer Überexpression von p53-Wildtyp bisher unterschätzt wurde und durch weitere Untersuchungen mögliche Ansätze in der Resistenzentwicklung zu finden sind.

Die Standardtherapie für Ovarialkarzinompatientinnen in fortgeschrittenen Tumorstadien ist die radikale Tumorentfernung, gefolgt von einer Chemotherapie mit Carboplatin und Taxol. Bei der Frage des Benefits dieser Therapie wird in der publizierten Literatur kontrovers diskutiert. In den Studien von Lavarino *et al.* [93] sowie Ueno *et al.* [94] wurde beim Vergleich von Ovarialkarzinompatientinnen mit p53-Wildtypsequenz und jenen mit mutiertem p53 ein besseres Ansprechen auf die Chemotherapie bei Frauen mit Nachweis einer p53-Mutation gefunden. Andere Studien kommen jedoch zu gegenteiligen Ergebnissen, so zum Beispiel Nakayama *et al.* [95] und Gadducci *et al.* [96]. Jedoch muss dabei stets das Patientenkollektiv betrachtet werden. Das bessere Ansprechen der Kombinationstherapie mit Carboplatin und Paclitaxel bei Ovarialkarzinompatientinnen mit mutiertem p53 könnte auf den hohen Anteil an serösen Tumoren in diesen Studien zurückzuführen sein. Ein wichtiges Kriterium ist zudem, welche Art der Chemotherapie (platinumhaltige Monotherapie oder eine Kombinationstherapie) die Patientinnen in den Studien erhalten haben. Unumstritten ist, dass p53 ein Schlüsselprotein für die zelluläre Antwort auf platinhaltige Chemotherapeutika ist. Abhängig von den Veränderungen des p53 könnten diese ursächlich für die Chemoresistenzentwicklung der Ovarialkarzinompatientinnen sein.

Noch immer ist die Pathogenese der Ovarialkarzinome nicht eindeutig geklärt. Unsere Ergebnisse unterstützen die Hypothese des dualen Modells der serösen Ovarialkarzinogenese, ebenso wie die Studie von Singer *et al.* [14]. Vergleichbar mit der Studie aus dem Jahr 2005 detektierten wir signifikant weniger p53-Mutationen in den low-grade und Borderline-Tumoren als in den high-grade Karzinomen. Die Arbeitsgruppe von Singer *et al.* analysierte dabei, welche Ursache dem unterschiedlichen Auftreten von Mutationen und Expression des p53-Gens in den low-grade und Borderline-Tumoren sowie den high-grade Karzinomen zugrunde liegen könnte. Zum einen lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass einer p53-Mutation abhängig von der Karzinogenese eine unterschiedliche Bedeutung zukommt. Bei der Entstehung eines low-grade Karzinoms wird dies eher als ein spätes Ereignis verstanden und trägt somit zur Tumorprogression bei. Im Gegensatz dazu weisen die p53-Mutationen in den high-grade Karzinomen auf ein frühes Ereignis in der Pathogenese hin. Zusätzlich wurden in den serösen Borderline-Tumoren und den serösen low-grade invasiven Karzinomen häufig Mutationen des BRAF- und des KRAS-Gens nachgewiesen, im Gegensatz zu den high-grade Karzinomen. Wie auch in unserer Arbeit konnten Singer *et al.* anhand des p53-Expressionsstatus jedoch keine präzisen Rückschlüsse auf den Mutationsstatus des p53-Gens ziehen.

5.2 Analyse des MDM2-SNP309

Ein abgeschwächter p53-Pathway ist nicht nur auf Veränderungen des p53-Gens zurückzuführen, sondern auch auf Alterationen von interagierenden Genen. Die Identifizierung einer möglichst großen Anzahl von fehlerhaft expremierten Genen ist für die molekulare Karzinogenese von Bedeutung. Daher untersuchten wir zusätzlich zum Gesamtstatus von p53 den Status von SNP309 im p53-sensitiven P2-Promotor des MDM2-Gens. Seit der erstmaligen Beschreibung des SNP309 wurde in zahlreichen Tumorarten ein Zusammenhang mit einem früheren Auftreten des Tumors sowie mit einem höheren Erkrankungsrisiko beschrieben. So fand beispielsweise die Arbeitsgruppe von Menin *et al.* heraus, dass trotz p53-Wildtypsequenz das G-Allel des SNP309 mit einem 10 Jahre früheren Erkrankungsalter bei Patienten mit kolorektalen Tumoren assoziiert ist [97]. Im Gegensatz dazu konnte bei Basalzellkarzinomen und Prostatakarzinomen kein Einfluss des SNP309 auf die Tumorentstehung nachgewiesen werden [98, 99].

Die Arbeitsgruppe von Ohmiya *et al.* analysierte den SNP309-Status bei Patienten mit Magenkarzinomen [100]. Dabei fanden sie ein deutlich schlechteres Outcome für Patienten mit fortgeschrittenen Karzinomen, deren Tumoren homozygot für das G-Allel waren und zudem ein mutiertes p53-Gen aufwiesen. Es zeigten sich abhängig vom Genotyp keine Unterschiede beim Erkrankungsalter. Die Studie schloss jedoch mehr Männer als Frauen ein. Zudem wurde der Östrogenrezeptorstatus bei den Patientinnen nicht berücksichtigt.

Boersma *et al.* untersuchten Patientinnen mit Bronchialkarzinomen und kamen zu folgenden Erkenntnissen [101]. Bei der Betrachtung des p53-Status hatten diejenigen mit Nachweis von p53-Mutationen im Bronchialkarzinom ein signifikant erhöhtes Risiko, am Tumor zu versterben, verglichen mit denjenigen mit p53-Wildtypsequenz. Als die Tumoren der Patientinnen zusätzlich auf den SNP309-Status untersucht wurden, ermittelte die Arbeitsgruppe bei den Patientinnen mit mutiertem p53 und T/T-Verteilung in den Tumoren ein erhöhtes Sterberisiko, nicht wie erwartet bei denjenigen mit G-Allel. Es wird vermutet, dass diese Beobachtungen darauf zurückzuführen sind, dass das G-Allel des SNP309 dominanter als die p53-Funktion ist.

In einer Studie von Bartel und Bond aus dem Jahr 2006 wurde deutlich, dass das G-Allel des SNP309 geschlechtsspezifisch mit einem früheren Erkrankungsalter für Frauen mit B-Zell-Lymphomen und Weichteilsarkomen korreliert [53]. Das Ergebnis unserer Arbeit, dass sich ohne Berücksichtigung des Östrogenrezeptor-Status in den Ovarialkarzinomen für die verschiedenen SNP309-Genotypen kein Unterschied im Diagnosealter findet, war unerwartet. Dies wurde jedoch auch in der Studie von Campbell *et al.* gezeigt, die Patientinnen mit Ovarial- und Bronchialkarzinomen untersuchten [102]. Ebenso konnten Galic *et al.* keinen Zusammenhang zwischen G-Allel und Erkrankungsalter bei Diagnosestellung finden [103]. Daher analysierten wir, ob die Expression des Östrogenrezeptors Einfluss auf den Status des SNP309 und das Erkrankungsalter bei den Ovarialkarzinompatientinnen hat. Denn Untersuchungen von Frauen mit Mammakarzinomen geben Hinweise darauf, dass das G-Allel einen intakten Östrogenrezeptor-Signalweg benötigt. So zeigte sich auch in unserer Studie, dass das G-Allel des SNP309 nur bei Tumoren mit einer hohen Östrogenrezeptor-Expression mit einem früheren Erkrankungsalter korreliert, aber nicht bei Östrogenrezeptor-negativen Ovarialkarzinomen.

Damit liefern unsere Ergebnisse weitere Hinweise für eine Verbindung zwischen dem G-Allel des SNP309 und Östrogenrezeptor-Signalweg. Diese ist möglicherweise auch bedeutsam für Patientinnen mit einer menopausalen Hormontherapie. So wiesen Greiser *et al.* beispielsweise bei Frauen, die eine Östrogen-Behandlung erhalten hatten, ein erhöhtes Risiko nach, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken [104]. Gegebenenfalls korreliert dieses erhöhte Risiko mit dem Vorhandensein des G-Allel des SNP309 bei den Frauen.

Da p53 und MDM2 und deren Wechselwirkungen miteinander in der Karzinogenese eine große Bedeutung zukommen, gibt es bereits Versuche, dort therapeutisch anzusetzen. Mittels kleinemolekularer MDM2-Inhibitoren wie Nutlin-3 und MI-219 gelang es Wissenschaftlern, weitere Einblicke in zelluläre Vorgänge zu bekommen [105, 106]. Dabei wurde in normalen Zellen durch Aktivierung von p53 mithilfe von MDM2-Inhibitoren ein Zellzyklusarrest ausgelöst, jedoch kein Zelltod. Im Gegensatz dazu wurde in Tumorzellen mit Wildtyp-p53 neben Zellzyklusarrest auch der Zelltod induziert. Die MDM2-Inhibitoren Nutlin-3 und MI-219 zeigen

in Versuchen an Xenograft-Modellen mit humanen Tumoren, wie beispielsweise Prostatakarzinom und Osteosarkom, die eine p53-Wildtypsequenz besitzen, eine starke antitumoröse Aktivität. Leider konnte diese bisher nicht bei Tumoren mit verändertem p53 nachgewiesen werden [105-107].

Interessant ist zudem, dass die MDM2-Inhibitoren Nutlin-3 und MI-219 von MDMX, einem Homolog des MDM2, moduliert werden können. Zwar ist die Bindungsaffinität der Inhibitoren zu MDM2 deutlich höher als zu MDMX, aber in Anwesenheit von MDMX können diese p53 nicht in jenem Maße aktivieren [106, 108, 109]. Darüber hinaus können die klein-molekularen Inhibitoren auch mit anderen Proteinen interagieren, wie beispielsweise p73, p63 oder E2F-1 [110, 111].

Entscheidend ist jedoch, dass möglicherweise Karzinompatienten, deren Tumoren eine MDM2-Überexpression aufweisen, beispielsweise durch Amplifikation oder Polymorphismus (SNP309), von diesen Inhibitoren profitieren könnten und somit Einfluss auf Prognose und Resistenzentwicklung nehmen. Dies wäre ein großer Fortschritt in der Krebstherapie und bedarf weiterer Untersuchungen.

5.3 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir Veränderungen im p53-MDM2-Pathway und deren prognostische Bedeutung bei Patientinnen mit Ovarialkarzinomen.

Dabei zeigten Patientinnen mit Veränderungen im p53-Status (Mutationen und/oder Überexpression) generell eine schlechtere Prognose, wiesen eine verkürzte Überlebenszeit auf und entwickelten schneller ein Rezidiv als Patientinnen mit „normalem“ p53 im Tumor. Jedoch ist hervorzuheben, dass Patientinnen mit einer p53-Überexpression im Vergleich zu Patientinnen mit fehlender oder schwacher Expression im Ovarialkarzinom eine signifikant verkürzte Gesamtüberlebenszeit hatten. Anhand des Proteinexpressionsstatus von p53 ergaben sich in unserer Arbeit keine Erkenntnisse auf den p53-Mutationsstatus. Darüber hinaus stellten wir fest, dass das alleinige Auftreten von Mutationen im p53-Gen noch keine Aussage über das Überleben der Patientinnen erlaubt. Denn überraschenderweise haben bei den Patientinnen diejenigen mit Wildtyp-p53 und einer Überexpression die kürzeste Überlebenszeit und weisen durchschnittlich früher ein Rezidiv auf. Damit wird deutlich, wie wichtig die Betrachtung des Gesamtstatus ist, und dass der prognostische Wert einer Überexpression von p53-Wildtyp bisher unterschätzt wurde. Zudem ist überraschend, dass Patientinnen mit Tumoren im FIGO-Stadium III und p53-Wildtypsequenz ein verkürztes Gesamtüberleben gegenüber Patientinnen mit mutiertem p53-Gen hatten.

Ähnliche Beobachtungen erhielten wir bei der Untersuchung des SNP309 auf das Gesamtüberleben. Das Vorliegen eines G-Allels bei Ovarialkarzinompatientinnen ist mit einem

verlängerten Gesamtüberleben verbunden im Vergleich zu Frauen mit einem T/T-Status. Das Ergebnis erreicht sogar statistische Signifikanz bei der Betrachtung von Patientinnen im FIGO-Stadium III ($p=0,025$). Wir konnten ebenfalls zeigen, dass das G-Allel des SNP309 bei Tumoren mit einer sehr starken Östrogenrezeptor-Expression mit einem früheren Diagnosealter verbunden ist, aber nicht für Östrogenrezeptor-negative Ovarialkarzinompatientinnen.

Bei der Einteilung der Tumoren nach deren Genese in low-grade, high-grade und Borderline-Tumoren konnten Veränderungen von p53 (Mutation und/oder Überexpression) größtenteils bei den high-grade Karzinomen detektiert werden. Somit wird die Hypothese des dualistischen Modells der Tumorgenese durch unsere Arbeit weiterhin unterstützt.

Weitere Studien sind erforderlich, um die Einblicke im p53-MDM2-Pathway weiter zu verstehen, und somit das Ansprechen auf eine platinhaltige Chemotherapie und die Prognose der Patientinnen verlässlicher vorher sagen zu können. Denn bisher bleiben in der multivariaten Analyse das FIGO-Stadium und die Resttumorgröße die entscheidenden prognostischen Faktoren für das Gesamtüberleben von Ovarialkarzinompatientinnen.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Kristense GB, Trope C (1997) Epithelial ovarian carcinoma. *Lancet* 349: 113-117
- [2] Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., Robert-Koch-Institut. Krebs in Deutschland. GEKID 2006; 64.
- [3] Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA (1999) Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 49: 8-31,1.
- [4] Schmoll HJ, Höffken K, Possinger K (2006) Kompendium Internistische Onkologie. 4.Aufl. Springer Berlin Heidelberg
- [5] Schildkraut JM, Thompson WD (1988) Familial ovarian cancer: a population-based casecontrol study. *Am J Epidemiol* 128: 456-466
- [6] Pignata S, Vermorken JB (2004) Ovarian cancer in the elderly. *Crit Rev Oncol Hematol* 49: 77-86
- [7] Whittemore AS, Harris R, Itnyre J (1992) Characteristics relating to ovarian cancer risk: collaborative analysis of 12 US case-control studies. IV. The pathogenesis of epithelial ovarian cancer. Collaborative Ovarian Cancer Group. *AM J Epidemiol* 136: 1212-1220
- [8] Fathalla MF (1971) Incessant ovulation: a factor in ovarian neoplasia. *Lancet* 2: 163
- [9] Engel J, Hölscher G, Schubert-Fritschle G (2004) MANUAL Maligne Ovarialtumore/Epidemiologie. Tumorzentrum München, Zuckerschwerdt W Verlag München
- [10] Kottmeier H (1962) Carcinoma of the cervix, endometrium and ovary. Chicago: Year Book; 285-98
- [11] Shi IeM, Kurman RJ (2004) Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *AM J Pathol* 164 (5): 1511-8
- [12] Singer G, Kurman RJ, Chang HW, Cho SK, Shih Iem (2002) Diverse tumorigenic pathways in ovarian serous carcinoma. *Am J Pathol*. 160: 1223-1228
- [13] Yang DH, Smith ER, Cohen C, Wu H, Patriotic C, Godwin AK, Hamilton TC, Xu XX (2002) Molecular events associated with dysplastic morphologic transformation and initiation of ovarian tumorigenicity. *Cancer*. 94: 2380-2392
- [14] Singer G, Stöhr R, Cope L, Dehari R, Hartmann A, Cao DF, Wang TL, Kurman RJ, Shih Iem (2005) Patterns of p53 mutations separate ovarian serous borderline tumors and low- and high-grade carcinomas and provide support for a new model of ovarian carcinogenesis: a mutational analysis with immunohistochemical correlation. *Am J Surg Pathol*. 29: 218-24
- [15] Greimel ER, Bjelic-Raiscic V, Pfisterer J, Hilpert F, Daghofer F, du Bois A (2006) Randomized study of the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Ovarian Cancer Study Group comparing quality of life in patients with ovarian cancer treated with cisplatin/paclitaxel versus carboplatin/paclitaxel. *J Clin Oncol* 24(4): 579-86
- [16] Du Bois A, Pfisterer J (2005) Future options for first-line therapy of advanced ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 15 Suppl 1: 42-50
- [17] Agarwal R, Kaye SB (2003) Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 3(7): 502-16
- [18] Cannistra SA (2004) Cancer of the ovary. *N Engl J Med*. 351(24): 2519-29
- [19] Spriggs D (2003) Optimal sequencing in the treatment of recurrent ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 90 (3 Pt 2): S39-44

- [20] Gordon AN, Fleagle JT, Guthrie D, Parkin DE, Gore ME, Lacave AJ (2001) Recurrent epithelial ovarian carcinoma: a randomized phase III study of pegylated liposomal doxorubicin versus topotecan. *J Clin Oncol.* 19(14): 3312-22
- [21] Runnebaum IB, Stickeler E (2001) Epidemiological and molecular aspects of ovarian cancer risk. *J Cancer Res Clin Oncol.* 127(2): 73-9
- [22] Kinzler KW, Vogelstein B (1994). Clinical implication of basic research: cancer therapy meets p53. *N Engl J Med.* 331: 49-50
- [23] Chen J., Wu X., Lin J. and Levine A.J. (1996) MDM2 inhibits the G1 arrest and apoptosis functions of the p53 tumorsuppressor protein. *Mol. Cell. Biol.* 16(5): 2445-52
- [24] Gottlieb TM, Oren M (1996) p53 in growth control and neoplasia. *Biochim Biophys Acta.* 1287(2-3): 77-102
- [25] Lane DP (1992). P53, guardian of the genome. *Nature.* 358: 15-16
- [26] Sionov RV, Haupt Y (1999) The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene* 18: 6145-57
- [27] Albrechtsen N, Dornreiter I, Grosse F, Kim E, Wiesmuller L, Deppert W (1999) Maintenance of genomic integrity by p53: complementary roles for activated and nonactivated p53. *Oncogene* 18(45): 7706-7717
- [28] Hollstein M, Rice K, Greenblatt MS, Soussi T, Fuchs R, Sørliie T, Hovig E, Smith Sørensen B, Montesano R, Harris CC (1994) Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res.* 22: 3551-3555
- [29] Walker KK, Levine AJ (1996) Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 15335-40
- [30] Oren M (1999) Regulation of the p53 tumor suppressor protein. *J Biol Chem.* 274(51): 36031-4
- [31] El-Deiry WS (1998) Regulation of p53 downstream genes. *Semin Cancer Biol* 8(5): 345-357
- [32] Murphy M, Hinman A, Levine AJ (1996) Wild-type p53 negatively regulates the expression of microtubule-associated protein. *Genes Dev.* 10(23): 2971-80
- [33] Stewart N, Hicks GG, Paraskevas F, Mowat M (1995) Evidence for a second cell cycle block at G2/M by p53. *Oncogene* 10(1): 109-115
- [34] Steller H (1995) Mechanism and genes of cellular suicide. *Science* 267(5203): 1445-9
- [35] Miyashita T, Krajewski S, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B, Reed JC (1994) Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene.* 9(6): 1799-805
- [36] Cahilly-Snyder L, Yang-Feng T, Francke U, George DL (1987) Molecular analysis and chromosomal mapping of amplified genes isolated from a transformed mouse 3T3 cell line. *Som. Cell. Mol. Gen.* 13: 235-244
- [37] Fakharzadeh SS, Trusko SP, George DL (1991) Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumor cell line. *EMBO J.* 10: 1565-1569
- [38] Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ (1992) The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell.* 69:1237-1245
- [39] Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B (1992) Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* 358: 80-83

- [40] Olson DC, Marechal V, Momand J, Chen J, Romocki C, Levine AJ (1993) Identification and characterization of multiple mdm-2 proteins and mdm-2-p53 protein complexes. *Oncogene* 8: 2353-2360
- [41] Sigalas I, Calvert AH, Anderson JJ, Neal DE and Lunec J (1996) Alternatively spliced mdm2 transcripts with loss of p53 binding domain sequences: transforming ability and frequent detection in human cancer. *Nat Med.* 2: 912-917
- [42] Bartel F, Taubert H, Harris LC (2002) Alternative and aberrant splicing of MDM2 mRNA in human cancer. *Cancer cell* 2: 9-15
- [43] Chen J, Marechal V, Levine AJ (1993) Mapping of the p53 and mdm-2 interaction domains. *Mol.Cell.Biol.* 13: 4107-4114
- [44] Roth J, Dobbstein M, Freedman DA, Shenk T, Levine AJ (1998) 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
- [45] Argentini M, Barboule N, Wasylyk B (2001) The contribution of the acidic domain of MDM2 to p53 and MDM2 stability. *Oncogene* 20: 1267-1275
- [46] Zhu Q, Yao J, Wani G, Wani MA, Wani AA (2001) 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
- [47] Piette J, Neel H, Marechal V (1997) Mdm2: keeping p53 under control. *Oncogene* 15: 1001-1010
- [48] Chen J, Lin J, Levine AJ (1995) Regulation of transcription functions of the p53 tumor suppressor by the mdm-2 oncogene. *Mol. Med.* 1: 142-152
- [49] Honda R, Tanaka H, Yasuda H (1997) Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett* 420: 25-27
- [50] Xiao ZX, Chen J, Levine AJ, Modjtahedi N, Xing J, Sellers WR, Livingston DM (1995) Interaction between the retinoblastoma protein and the oncoprotein MDM2. *Nature.* 375: 694-698
- [51] Bond GL, Hu W, Levine AJ (2005) MDM2 is a central node in the p53 pathway: 12 years and counting. *Curr Cancer Drug Targets* 5: 3-8
- [52] Bond G, Hu W, Bond E, Robins H, Lutzker S, Arva N, Bargonetti J, Bartel F, Taubert H, Wuerl P, Onel K, Yip L, Hwang SJ, Strong LC, Lozano G, Levine AJ (2004) A Single Nucleotide Polymorphism in the Mdm2 Promoter Attenuates the p53 Tumor Suppressor Pathway and Accelerates Tumor Formation in Humans. *Cell* 119: 591-602
- [53] Bond GL, Hirshfield KM, Kirchhoff T, Alexe G, Bond EE, Robins H, Bartel F, Taubert H, Wuerl P, Hait W, Toppmeyer D, Offit K, Levine AJ (2006) MDM2 SNP309 accelerates tumor formation in a gender-specific and hormone-dependent manner. *Cancer Res* 66: 5104-5110
- [54] Maltzman W, Czyzyk L (1984) UV Irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Mol. Cell. Biol.* 4: 1689-1694
- [55] Freedman DA, Wu L, Levine AJ (1999) Functions of the MDM2 oncoprotein. *Cell. Mol. Life Sci.* 55: 96-107
- [56] Alarcon-Vargas D and Ronai Z (2002) p53-MDM2 – the affair that never ends. *Carcinogenesis* 23: 541-7.
- [57] Milner BJ, Allan LA, Eccles DM, Kitchener HC, Leonard RC, Kelly KF, Parkin DE, Haites NE (1993) p53 mutation is a common genetic event in ovarian carcinoma. *Cancer Res* 53: 2128-2132

- [58] Feki A, Irminger-Finger I (2004) Mutational spectrum of p53 mutations in primary breast and ovarian tumors. *Crit Rev Oncol Hematol* 52: 103-116
- [59] Havrilesky L, Darcy M, Hamdan H, Priore RL, Leon J, Bell J, Berchuck A (2003) Prognostic significance of p53 mutation and p53 overexpression in advanced epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 21: 3814-3825
- [60] Mazars R, Pujol P, Maudelonde T, Jeanteur P, Theillet C (1991) p53 mutations in ovarian cancer : a late event? *Oncogene* 6: 1685-1690
- [61] Iggo R, Gatter K, Bartek J, Lane D, Harris AL (1990) Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* 335: 675-679
- [62] Wenham RM, Lancaster JM, Berchuck A (2002) Molecular aspects of ovarian cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 16: 483-497
- [63] Saygili U, Guclu S, Uslu T, Erten O, Dogan E (2002) The effect of ascites, mass volume, and peritoneal carcinomatosis on serum CA 125 levels in patients with ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 12: 438-442
- [64] Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC (1994) Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 54: 4855-4878
- [65] Kondo S, Barnett GH, Hara H, Morimura T, Takeuchi J (1995) MDM2 protein confers the resistance of a human glioblastoma cell line to cisplatin-induced apoptosis. *Oncogene* 10: 2001-2006
- [66] Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman E (1993) p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 74: 957-967
- [67] Cordon-Cardo C, Latres E, Drobnjak M, Oliva MR, Pollack D, Woodruff JM, Marechal V, Chen J, Brennan MF, Levine AJ (1994) Molecular abnormalities of mdm-2 and p53 genes in adult soft tissue sarcomas. *Cancer Res*. 54: 794-799
- [68] Silverberg SG (2000) Histopathologic grading of ovarian carcinoma: a review and proposal. *Int J Gynecol Pathol* 19:7-15
- [69] Pfisterer J, du Boiois A (2002) Das Ovarialkarzinom. Therapeutische Standards-klinische Empfehlungen. Thieme Verlag Stuttgart New York
- [70] National Cancer Institute. Ovarian low malignant potential tumors: Treatment. Health professional version (2003);www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/ovarian-low-malignant-potential/
- [71] Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P and Olivier M (2007) Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat*. 28: 622-629
- [72] Olivier M, Eeles R, Hollstein M, Khan MA, Harris CC, Hainaut P (2002) The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum. Mutat*. 19: 607-614
- [73] Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ (2009) Cancer Statistic. *CA Cancer J Clin*. 59 (4): 225-49.
- [74] Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC (1991) p53 mutations in human cancers. *Scienc*. 253: 49-53
- [75] Michael D, Oren M (2003) The p53-MDM2 module and the ubiquitin system. *Semin Cancer Biol* 13: 49-58

- [76] Hartmann LC, Podratz KC, Keeney GL, Kamel NA, Edmonson JH, Grill JP, Su JQ, Katzmann JA, Roche PC (1994) Prognostic significance of p53 immunostaining in epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol.* 12: 64-69
- [77] Klemi PJ, Plkkanen L, Kiilholma P, Kurvinen K, Joensuu H (1995) p53 protein detected by immunohistochemistry as a prognostic factor in patients with epithelial ovarian carcinoma. *Cancer.* 76: 1201-1208
- [78] Fallows S, Price J, Atkinson RJ, Johnston PG, Hickey I, Russell SE (2001) p53 mutation does not affect prognosis in ovarian epithelial malignancies. *J Pathol.* 194: 68-75
- [79] Kohler MF, Marks JR, Wiseman RW, Jacobs IJ, Davidoff AM, Clarke-Pearson DL, Soper JT, Bast RC Jr, Berchuck A (1993) Spectrum of mutation and frequency of allelic deletion of the p53 gene in ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst.* 85: 1513-1519
- [80] Geisler JP, Geisler HE, Wiemann MC, Givens SS, Zhou Z, Miller GA (1997) Quantification of p53 in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 66: 435-438
- [81] Emery JD, Kennedy AW, Tubbs RR, Castellani WJ, Hussein MA (1999) Plasmacytoma of the ovary: a case report and literature review. *Gynecol Oncol* 73: 151-154
- [82] Casey G, Lopez M, Ramos J., Plummer S., Arboleda M., Shaughnessy M., Karlan B, Slamon DJ (1996) DNA sequence analysis of exons 2 through 11 and immunohistochemical staining are required to detect all known p53 alterations in human malignancies. *Oncogene.* 13: 1971-1981
- [83] Wen HW, Reles A, Runnebaum IB, Sullivan-Halley J, Bernstein L, Jones LA, Felix JC, Kreienberg R, el-Naggar A, Press MF (1999) p53 mutations and expression in ovarian cancers: correlation with overall survival. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 18: 29-41
- [84] Reles A, Wen WH, Schmider A, Gee C, Runnebaum IB, Kilian U, Jones LA, El Naggar A, Minguillon C, Schonborn I, Reich O, Kreienberg R, Lichtenegger W, Press MF (2001) Correlations of p53 mutations with resistance to platinum-based chemotherapy and shortened survival in ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 7: 2984-2997
- [85] Ljungman M (2000) Dial 9-1-1 for p53: mechanism of p53 activation by cellular stress. *Neoplasia.* 2: 208-225.
- [86] Tachibana M, Watanabe J, Matsushima Y, Nishida K, Kobayashi Y, Fujimura M, Shiromizu K (2003) Independence of the prognostic value of tumor suppressor protein expression in ovarian adenocarcinomas: a multivariate analysis of expression of p53, retinoblastoma, and related proteins. *Int J Gynecol Cancer* 13: 598-606
- [87] Bauerschlag DO, Schem C, Weigel MT, von Kaisenberg C, Strauss A, Bauknecht T, Maass N, Meinhold-Heerlein I (2010) The role of p53 as a surrogate marker for chemotherapeutic responsiveness in ovarian cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 136: 79-88
- [88] Righetti SC, Della Torre G, Pilotti S, Ménard S, Ottone F, Colnaghi MI, Pierotti MA, Lavarino C, Cornarotti M, Oriana S, Böhm S, Bresciani GL, Spatti G, Zunino F (1996) A comparative study of p53 gene mutations, protein accumulation, and response to cisplatin-based chemotherapy in advanced ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 56: 689-693
- [89] Schuyer M, Henzen-Logmans SC, van der Burg MEL, Fieret EJH, Klijn JGM, Foekens JA, Berns EM (1998) High prevalence of codon 213^{Arg→Stop} mutations of the TP53 gene in human ovarian cancer in the southwestern part of the Netherlands. *Int. J. Cancer.* 76: 299-303
- [90] Skilling J, Sood A, Niemann T, Lager D, Buller R (1996) An abundance of p53 null mutations in ovarian carcinoma. *Oncogene.* 13: 117-123
- [91] Sood AK, Sorosky JI, Dolan M, Anderson B, Buller RE (1999) Distant metastases in ovarian cancer: association with p53 mutations. *Clinical Cancer Research.* 5: 2485-2490

- [92] Rose SL, Robertson AD, Goodheart MJ, Smith BJ, DeYoung BR, Buller RE (2003) The Impact of p53 Protein Core Domain Structural Alteration on Ovarian Cancer Survival. *Clinical Cancer Research* 9: 4139-4144
- [93] Lavarino C, Pilotti S, Oggionni M, Gatti L, Perego P, Bresciani G, Pierotti MA, Scambia G, Ferrandina G, Fagotti A, Mangioni C, Lucchini V, Vecchione F, Bolis G, Scarfone G, Zunino F (2000) p53 gene status and response to platinum/paclitaxel-based chemotherapy in advanced ovarian carcinoma. *J Clin Oncol.* 18 (23): 3936-3945
- [94] Ueno Y, Enomoto T, Otsuki Y, Sugita N, Nakashima R, Yoshino K, Kuragaki C, Ueda Y, Aki T, Ikegami H, Yamazaki M, Ito K, Nagamatsu M, Nishizaki T, Asada M, Kameda T, Wakimoto A, Mizutani T, Yamada T, Murata Y (2006) Prognostic significance of p53 mutation in suboptimally resected advanced ovarian carcinoma treated with the combination chemotherapy of paclitaxel and carboplatin. *Cancer Letters* 241: 289-300
- [95] Nakayama K, Takebayashi Y, Nakayama S, Hata K, Fujiwaki R, Fukumoto M, Miyazaki K (2003) Prognostic value of overexpression of p53 in human ovarian carcinoma patients receiving cisplatin. *Cancer Lett.* 192(2): 227-235
- [96] Gadducci A, Di Cristofano C, Zavaglia M, Giusti L, Menicagli M, Cosio S, Naccarato AG, Genazzani AR, Bevilacqua G, Cavazzana AO (2006) P53 gene status in patients with advanced serous epithelial ovarian cancer in relation to response to paclitaxel-plus platinum-based chemotherapy and long-term clinical outcome. *Anticancer Res.* 26: 687-693
- [97] Menin C, Scaini MC, De Salvo GL, Biscuola M, Quaggio M, Esposito G, Belluco C, Montagna M, Agata S, D'Andrea E, Nitti D, Amadori A, Bertorelle R (2006) Association between MDM2-SNP309 and age at colorectal cancer diagnosis according to p53 mutation status. *J Natl. Cancer Inst.* 98(4): 285-288
- [98] Wilkening S, Hemminki K, Rudnai P, Gurzau E, Koppova K, Försti A, Kumar R (2007) No association between MDM2 SNP309 promoter polymorphism and basal cell carcinoma of the skin. *Br J Dermatol.* 157(2): 375-377
- [99] Stoehr R, Hitzenbichler F, Kneitz B, Hammerschmied CG, Burger M, Tannapfel A, Hartmann A (2008) MDM2-SNP309 polymorphism in prostate cancer: no evidence for association with increased risk or histopathological tumour characteristics. *Br J Cancer* 99(1): 78-82
- [100] Ohmiya N, Taguchi A, Mabuchi N, Itoh A, Hirooka Y, Niwa Y, Goto H (2006) MDM2 promoter polymorphism is associated with both an increased susceptibility to gastric carcinoma and poor prognosis. *J Clin Oncol.* 24(27): 4434-4440
- [101] Boersma BJ, Howe TM, Goodman JE, Yfantis HG, Lee DH, Chanock SJ, Ambros S (2006) Association of breast cancer outcome with status of p53 and MDM2 SNP309. *J Natl Cancer Inst.* 98(13): 911-919
- [102] Campbell IG, Eccles DM, Choong DY (2006) No association of the MDM2 SNP309 polymorphism with risk of breast or ovarian cancer. *Cancer Lett.* 240 (2): 195-7.
- [103] Galic V, Willner J, Wollan M, Garg R, Garcia R, Goff BA, Gray HJ, Swisher EM (2007) Common polymorphisms in TP53 and MDM2 and the relationship to TP53 mutations and clinical outcomes in women with ovarian and peritoneal carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer.* 46(3): 239-247
- [104] Greiser CM, Greiser EM, Dören M (2007) Menopausal hormone therapy and risk of ovarian cancer: systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 13(5): 453-463

- [105] Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, Kong N, Kammlott U, Lukacs C, Klein C, Fotouhi N, Liu EA (2004) In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science*. 303: 844-848
- [106] Shangary S, Qin D, McEachern D, Liu M, Miller RS, Qiu S, Nikolovska-Coleska Z, Ding K, Wang G, Chen J, Bernard D, Zhang J, Lu Y, Gu Q, Shah RB, Pienta KJ, Ling X, Kang S, Guo M, Sun Y, Yang D, Wang S (2008) Temporal activation of p53 by a specific MDM2 inhibitor is selectively toxic to tumors and leads to complete tumor growth inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 3933-3938
- [107] Tovar C, Rosinski J, Filipovic Z, Higgins B, Kolinsky K, Hilton H, Zhao X, Vu BT, Qing W, Packman K, Myklebost O, Heimbrook DC, Vassilev LT (2006) Small-molecule MDM2 antagonists reveal aberrant p53 signaling in cancer: implications for therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103: 1888-93
- [108] Hu B, Gilkes DM, Farooqi B, Sebt SM, Chen J (2006) MDMX overexpression prevents p53 activation by the MDM2 inhibitor Nutlin. *J Biol Chem*. 281: 33030-5
- [109] Wade M, Wong ET, Tang M, Stommel JM, Wahl GM (2006) Hdmx modulates the outcome of p53 activation in human tumor cells. *J Biol Chem* 281: 33036-44
- [110] Lau LM, Nugent JK, Zhao X, Irwin MS (2008) HDM2 antagonist Nutlin-3 disrupts p73-2 binding and enhances p73 function. *Oncogene* 27: 997-1003
- [111] Ambrosini G, Sambol EB, Carvajal D, Vassilev LT, Singer S, Schwartz GK. (2007) Mouse double minute antagonist Nutlin-3 enhances chemotherapy-induced apoptosis in cancer cells with mutant p53 by activating E2F1. *Oncogene* 26: 3473-81

7 Anhang

Tabelle 5: p53-Mutationen im Kollektiv der Ovarial- und Borderline-Tumoren

Fallnr.	Histologie	Exon	Codon	Mutations- typ	Wechsel	Wildtyp	mt	wt-AS	mt-AS
#9	gemischt	4	91	Non	G>A	TGG	TAG	Trp	STOP
#37	ser	4	91	Non	G>A	TGG	TAG	Trp	STOP
#64	ser	4	98	Mis	C>T	CCT	CCT	Pro	Leu
#84	ser	5	138	Del	-GC				
#115	gemischt	5	141	Mis	G>A	TGC	TAC	Cys	Tyr
#116	ser	5	141	Mis	G>A	TGC	TAC	Cys	Tyr
#8	endo	5	149	Ins	+T	TCC	TTC	Ser	Phe
#109	ser	5	150	Mis	C>T	ACA	ATA	Thr	Ile
#99	ser	5	152	Del	C	CCG		STOP	
#68	ser	5	153	Ins	+T				
#34	un	5	175	Mis	G>A	CGC	CAC	Arg	His
#39	ser	5	175	Mis	G>A	CGC	CAC	Arg	His
#98	ser	5	175	Mis	G>A	CGC	CAC	Arg	His
#67	ser	5	178	Mis	C>T	CAC	TAC	His	Tyr
#111	ser	5	179	Mis	A>G	CAT	CGT	His	Arg
#31	un	Int5							
#3	ser	6	195	Mis	T>C	ATC	ACC	Ile	Thr
#24	TCC	6	195	Mis	T>C	ATC	ACC	Ile	Thr
#20	TCC	6	200	Del	T				
#61	ser	6	201	Mis	T>A	TTG	TAG	Leu	STOP
#91	ser	6	206	Del	TT				
#60	un	6	216	Mis	G>A	GTG	ATG	Val	Met
#32	ser	6	220	Mis	A>G	TAT	TGT	Tyr	Cys
#15	ser	7	225	Mis	G>T	GTT	TTT	Val	Phe
#106	endo	7	229	Ins	+T	GAC	TGA	Asp	STOP
#79	ser	7	239	Mis	A>G	AAC	AGC	Asn	Ser
#45	ser	7	245	Mis	G>A	GGC	AGC	Gly	Ser
#47	un	7	245	Mis	G>T	GGC	TGC	Gly	Cys
#59	ser	7	245	Mis	G>A	GGC	GAC	Gly	Asp
#4	ser	7	248	Mis	G>A	CGG	CAG	Arg	Glu
#69	ser	7	248	Mis	G>A	CGG	CAG	Arg	Gln
#40	klar	7	257	Mis	T>A	CTG	CAG	Leu	Gln
#33	klar	7	259	Mis	G>T	GAC	TAC	Asp	Tyr
#118	ser	Int7	Splice						
#81	ser	8	267	Del	-G				
#76	gemischt	8	272	Mis	G>A	GTG	ATG	Val	Met
#42	gemischt	8	273	Mis	G>A	CGT	CAT	Arg	His
#41	ser	8	274	Mis	G>T	GTT	TTT	Val	Phe
#27	ser	8	275	Mis	G>T	TGT	TTT	Cys	Phe
#80	gemischt	8	280	Mis	G>C	AGA	ACA	Arg	Thr
#78	klar	8	285	Del	-32				
#7	gemischt	8	291	Del	-G				
#43	ser	8	294	Non	G>T	GAG	TAG	Glu	STOP
#86	ser	8	306	Del	-C	CGA			
BOT2	sBOT	4	67	Del					
BOT41	sBOT	4	114	still		TTG	TTA	Leu	Leu
BOT63	sBOT	5	149	Ins	+T	TCC			
BOT32	sBOT	6	212	Mis		CAT	CAG	His	Gln
BOT51	sBOT	7	253	Ins	+A				
BOT34	sBOT	7	257	still					

Abkürzungen: endo – endometrioides Karzinom; ser – seröses Karzinom; TCC – Transitionalzellkarzinom; un – undifferenziertes Karzinom; NC – nicht konservierte Region des p53-Gens; Co – hochkonservierte Region des p53-Gens

8 Thesen

1. Neben klinischen Variablen (Stadium der Erkrankung, postoperativer Tumorrest) spielen tumorbiologische Faktoren eine Rolle für den Krankheitsverlauf bei Frauen mit Ovarialkarzinomen.
2. Patientinnen mit p53-Alterationen (Mutation und/oder Überexpression) im Ovarialtumor besitzen eine schlechtere Prognose als diejenigen mit Wildtyp-p53-Gen und fehlender p53-Proteinexpression.
3. Die Betrachtung des Gesamtstatus von p53 ist aussagekräftiger als Gen- oder Expressionsstatus allein.
4. Patientinnen mit Veränderungen im p53-Pathway (Mutation und/oder Überexpression) im Ovarialtumor sind signifikant resistenter gegenüber einer Chemotherapie und weisen ein höheres Rezidivrisiko auf.
5. Das G-Allel des SNP309 korreliert bei Tumoren mit hoher Östrogenrezeptor-Expression mit einem früheren Erkrankungsalter.
6. In high-grade Karzinomen werden Alterationen von p53 (Mutationen und/oder Überexpressionen) häufiger detektiert als in low-grade und Borderline-Tumoren.

Lebenslauf

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Juliane Jung
Geburtsdatum: 17. April 1981
Geburtsort: Neuruppin
Wohnort: Hufelandstraße 31
10407 Berlin

Beruflicher Werdegang

Seit 09/2008 Assistenzärztin der Pädiatrie in den Ruppiner Kliniken
in Neuruppin

Studium

Seit 10/2004 Promotion am Institut für Pathologie der Martin-Luther-
Universität Halle/Wittenberg
10/2001 bis 05/2008 Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-
Universität Halle/Wittenberg
10/2000 bis 09/2001 Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-
Universität zu Kiel

Schulbildung

09/1993 bis 07/2000 Karl-Friedrich-Schinkel-Gymnasium in Neuruppin
(Abschluss Abitur)
09/1987 bis 07/1993 Roman-Ligenza-Grundschule (jetzt Gildenhaller
Grundschule) in Neuruppin

Erklärung

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der aufgeführten Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

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

Juliane Jung

Berlin, den 24.10.2011

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Dr. Bartel und Herrn Prof. Dr. Hauptmann, die mir die Möglichkeit gaben, meine Dissertation in der Abteilung für Pathologie zu erstellen. Insbesondere bedanke ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Dr. Bartel für sein Vertrauen in meine Arbeit, die unermüdliche Geduld und die zahlreichen Hilfestellungen.

Ich danke insbesondere Frau Dr. Böhnke, die mir mit ihrer Betreuung und ihrem Engagement stets zur Seite stand.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Rolle, Frau Wiederhold und Frau Wypior sowie allen Mitarbeitern des Instituts für Pathologie für die Hilfe und das angenehme Arbeitsklima bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Institute für Humangenetik, Immunologie und Rechtsmedizin für das Bereitstellen der DNA von gesunden Blutspendern bedanken, ebenso bei den Mitarbeitern vom Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung für die Durchführung der Sequenzierreaktionen.

Mein größter Dank gilt Mups und Pups sowie Chrissi und Basti – ihr seid großartig.