

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

**Detektion und Charakterisierung von MDMX-Isoformen in humanen
Ovarialtumoren**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)
vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Claudia Löbel

geboren am 18.07.1984 in Karl-Marx-Stadt

Betreuer: PD Dr. rer. nat. Frank Bartel

Gutachter:

1. PD Dr. F. Bartel
2. Prof. Dr. med. C. Denkert (Charité - Universität Berlin)
3. Prof. Dr. med. T. Stiewe (Philipps - Universität Marburg)

Eröffnungsdatum: 17.07.2012

Datum der Verteidigung: 18.12.2012

Referat

Das Ovarialkarzinom ist der dritthäufigste maligne Genitaltumor der Frau in der westlichen Welt. Die weit verbreitete Chemoresistenz dieses Tumors führt zu einer deutlichen Limitation der Behandlungsoptionen und einer hohen Mortalität. In zahlreichen humanen Tumoren führen Mutationen des Tumorsuppressorgens p53 oder eine Überexpression seiner Negativregulatoren, wie beispielsweise MDM2 und MDMX zu einer Inaktivierung des p53-Pathways. In verschiedenen Tumorzelllinien konnten, analog zu MDM2, bereits MDMX-Spleißvarianten identifiziert werden. Bis zum heutigen Zeitpunkt sind jedoch noch keine Studien zu MDMX-Isoformen im Ovarialkarzinom veröffentlicht worden. In dieser Arbeit wurde ein Kollektiv von 34 postoperativ frisch eingefrorenen ovariellen Tumorproben auf MDMX-Transkripte untersucht. In 16 der 34 Tumorproben konnten, zusätzlich zur bereits charakterisierten Variante MDMX-S, zahlreiche MDMX-Isoformen identifiziert werden. MDMX-Transkriptvarianten können in zwei Gruppen klassifiziert werden: einige Isoformen besitzen nur die p53-Bindungsdomäne, wie beispielsweise MDMX-S, wobei der andere Teil einen intakten C-Terminus aufweist, wie MDMX-ALT2. Unsere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Expression der Transkriptvariante mit intaktem RING-Finger (MDMX-211) in MCF-7 Zellen (Wildtyp-p53) zu einer Stabilisierung von p53 und anschließend zu einer verstärkten p21-Expression führt. Die Behandlung der Zellen mit cis-Platin führt zu einem signifikant verminderten p21-Level, das durch die Einleitung der Apoptose zu erklären ist. Im Gegensatz dazu hat die Expression der Spleißvariante MDMX-Var6, mit intakter p53-Bindungsdomäne, keinen Einfluss auf das p21-Level in MCF-7 Zellen. Nach Behandlung dieser Zellen mit cis-Platin konnten wir jedoch auch hier, im Vergleich zu FL-MDMX, eine stärkere Induktion von p53 beobachten. Auffällig war zusätzlich eine verminderte p21-Expression. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass MDMX-Spleißvarianten in ovariellen Tumorgewebe exprimiert werden. Untersuchungen in Tumorzelllinien lassen vermuten, dass MDMX-Isoformen eine Rolle in der Chemoresistenz spielen und Angriffspunkt für eine verbesserte Therapie des Ovarialkarzinoms sein können.

Löbel, Claudia: Detektion und Charakterisierung von MDMX-Isoformen in humanen Ovarialtumoren. Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 79 Seiten, 2012

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Ovarialkarzinom	1
1.2	Therapie und Prognose ovarieller Tumoren	3
1.3	Das Tumorsuppressorgen p53	5
1.4	MDM2 und MDMX: Regulation von p53	6
1.5	MDMX-MDM2-p53 Interaktion	8
1.6	Aberrantes und alternatives Spleißen in Tumoren	10
1.7	MDM2- und MDMX-Spleißvarianten	11
1.8	Mögliche Rolle der MDM2/MDMX-Transkripte im Ovarialkarzinom	14
1.9	Zielstellung	16
2	Materialien	17
2.1	Tumormaterial	17
2.2	Geräte und Verbrauchsmaterialien	18
2.3	Chemikalien	19
2.4	Kits	20
2.5	Vektoren	21
2.6	Antikörper	21
2.7	Puffer und Lösungen	22
2.8	Enzyme	22
2.9	Primer	23
3	Methoden	24
3.1	Isolierung von Nukleinsäuren	24
3.1.1	Präparation von Gesamt-RNA	24
3.1.2	RNA-Konzentrationsbestimmung	24
3.2	Reverse Transkription, Polymerasekettenreaktion und Sequenzierung	25
3.2.1	Reverse Transkription	25
3.2.2	Polymerasekettenreaktion	25
3.2.3	Agarose-Gelelektrophorese	26
3.2.4	Isolation von PCR-Produkten aus Agarose-Gelen	27

3.3	Klonierung von DNA-Fragmenten	27
3.3.1	Ligation von PCR-Produkten in TOPO-TA-Vektoren	27
3.3.2	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	27
3.3.3	Isolierung von Plasmid-DNA	28
3.3.4	Sequenzierung der Plasmid-DNA	28
3.3.5	Fällung der Sequenzierreaktion	28
3.3.6	Sequenzierung	29
3.4	Proteinexpressionsmuster der Tumorproben	29
3.4.1	Isolierung von Proteinen aus Gefrierproben	29
3.4.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	30
3.4.3	Western Blotting	30
3.4.4	Färbung mit spezifischen Antikörpern mittels Immunblotting	31
3.5	Klonieren der Transkriptvarianten in pcDNA3.1(-)-Vektor	31
3.5.1	Markierung der Isoformen mit Hämagglutinin	32
3.5.2	Enzymverdau	33
3.5.3	Ligation	33
3.5.4	Transformation in <i>E. coli</i> -Zellen	34
3.5.5	MIDI-Prep (endotoxinfrei)	35
3.6	Zellkultur	36
3.7	Transfektion der Zelllinie MCF-7	37
3.7.1	Proteinisolierung aus Zellen	37
3.7.2	Behandlung der Zellen mit cis-Platin	37
4	Ergebnisse	38
4.1	Expression der MDMX-mRNA in Gewebeproben	38
4.1.1	Expression der verkürzten MDMX-Transkripte	39
4.1.2	Expression von MDMX-S	40
4.2	Expression der MDM2-Transkripte	42
4.3	p53-Expression und Mutationsstatus	43
4.4	Klonierung und Sequenzierung der MDMX-Transkripte	44
4.4.1	Charakterisierung von Spleißvarianten der MDMX-mRNA	44
4.4.2	Charakterisierung erstmalig detektierter Spleißvarianten	46
4.5	Variantenspezifische Primer	49

4.6	Untersuchung der p53-, MDMX- und MDM2-Proteinexpression in Tumorproben	50
4.6.1	Expression des MDMX-Proteins	50
4.7	Charakterisierung der Transkriptvariante MDMX-Var6	52
4.7.1	Transfektion der MDMX-Varianten in MCF-7-Zellen	54
4.7.2	Expression von MDMX-Var6 in Tumorproben	56
4.7.3	Cis-Platin-Behandlung der transfizierten MCF-7-Zellen	58
5	Diskussion	60
5.1	Die Bedeutung von MDM2, MDMX und ihrer Transkripte	61
5.2	Effekte der Transfektion auf die Zytostatika-Behandlung von MCF-7 Zellen .	66
5.3	Isoform MDMX211	68
6	Zusammenfassung und weiterführende Gedanken	70
7	Literaturangaben	72
8	Anhang	78
9	Thesen	79

Abkürzungsverzeichnis

<i>E. coli</i>	Escherichia coli
bp	Basenpaare
cDNA	complementary DNA
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic acid)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FKS	Fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
LB-Medium	Luria broth-Medium
MDM2	murine double minute 2
mRNA	messenger-RNA
NES	Kernexportsignal
NLS	Kernlokalisationsignal
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic acid)
snRNP	small nuclear ribonucleoprotein
UV	ultraviolett
WST	water soluble tetrazolium
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-Betha-D-galactosid

1 Einleitung

1.1 Das Ovarialkarzinom

Das Ovarialkarzinom ist nach dem Endometriumkarzinom und dem Zervixkarzinom der dritthäufigste maligne Genitaltumor der Frau in der westlichen Welt. Nach Aussagen des Robert Koch Instituts gab es in Deutschland 9960 Neuerkrankungsfälle im Jahr 2010. Auch die Mortalität der malignen Ovarialkarzinome ist hoch, knapp 6.000 Frauen sterben jährlich in Deutschland, entsprechend einer Mortalität von 14 je 100.000 Frauen (Kiechle, 2007). Damit stehen die malignen Ovarialtumoren bei den Todesfällen nach Brustkrebs, Darmkrebs, Bronchialkarzinom und dem Pankreaskarzinom an 5. Stelle. Das mediane Erkrankungsalter liegt zwischen 64 und 65 Jahren. Der wichtigste Risikofaktor für das Entstehen eines Ovarialkarzinoms ist eine positive Familienanamnese für Ovarial- oder Brustkrebs, obwohl eine identifizierte genetische Prädisposition in nur circa 5 % der betroffenen Frauen bekannt ist (Cannistra, 2004). Ein zunehmendes Lebensalter, dauerhaft ovulatorische Zyklen, Infertilität und Nulliparität, sowie medikamentöse Ovulationsauslösung und ein Mammakarzinom in der Anamnese sind weitere bekannte Risikofaktoren. Zu den protektiven Faktoren hingegen zählen das Austragen mehrerer Schwangerschaften, Laktation und die langjährige Einnahme von Ovulationshemmern (Tavani *et al.*, 1993; Whittemore, 1994). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die wiederholte Stimulation des ovariellen Oberflächenepithels, das bei Nullipara durch ununterbrochene Ovulationen der Fall ist, eine maligne Transformation des Epithels begünstigen kann. Etwa 5-10 % aller Ovarialkarzinome sind genetisch bedingt. Bei diesen Patientinnen liegen Keimbahnmutationen in den Genen BRCA1 und/oder BRCA2 vor, deren Genprodukte in Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic acid) (DNA)-Reparaturmechanismen involviert sind (King *et al.*, 2003). In BRCA1-positiven Familien treten Ovarialkarzinome

mit ca. 40 % deutlich häufiger auf als in BRCA2-positiven Familien mit ca. 11 %. Zu den Syndromen mit erhöhtem Ovarialkarzinomrisiko zählen zusätzlich das hereditäre nicht-polypöse Kolonkarzinom (HNPCC)-Syndrom sowie das seltenere Li-Fraumeni-Syndrom (Chung und Rustgi, 2003).

Die Symptome eines Ovarialkarzinoms stellen sich als unspezifisch dar und suggerieren oft ein oberes Abdominalsyndrom. Bisher existieren keine sicheren Methoden zur Früherkennung des Ovarialkarzinoms. Diese beschränkt sich zur Zeit auf regelmäßige gynäkologische Kontrollen und eventuell eine Vaginalsonographie. Gelegentlich fallen Patientinnen in frühen Ovarialkarzinom-Stadien mit Abdominalschmerzen durch Stieldrehung des Ovars auf. Allerdings sind die meisten Patientinnen in diesen frühen Stadium asymptomatisch. Obwohl das Level von CA-125 im Serum bei mehr als 80 % der Patientinnen mit fortgeschrittenen epithelialen Ovarialkarzinom erhöht ist, zeigt sich dieser Tumormarker allein weder sensitiv noch spezifisch genug für die Diagnostik (Cannistra, 2004). Der Biomarker CA-125 steht für Mucin 16, ein membranassoziertes Protein, das für die Lubrikation des Epithels verantwortlich gemacht wird. Erhöhte Serumwerte von CA-125 sind unter anderem auch bei Schwangerschaft, Endometriose, Menstruation und gutartigen Zysten, sowie anderen maligne Erkrankungen von Pankreas, Mamma, Lunge, Magen und Kolon zu finden. Im Gegenzug muss aber bei stark erhöhten CA-125 Werten im Serum postmenopausaler Frauen mit abdominellem Tumor mit einer erhöhter Wahrscheinlichkeit eines Ovarialkarzinoms gerechnet werden. Sehr nützlich ist der Tumormarker zur Verlaufskontrolle und zur Einschätzung, wie die Patientinnen auf postoperative Chemotherapie reagieren (Meyer und Rustin, 2000). Da die Ovarien häufig auch Ort von Metastasen sind, müssen vor allem Primärtumoren von Kolon, Appendix, Gallenblase und Mamma ausgeschlossen werden (Petru *et al.*, 1992).

Das Ovar wird von drei unterschiedlichen Gewebekomponenten gebildet, demnach können drei Hauptgruppen von Tumoren unterschieden werden: Epitheliale, Keimstrang-Stroma-

und Keimzelltumore (Teratome). Die epithelialen Tumoren nehmen bis zu 90 % der Ovarialtumoren ein und können in gutartige Tumoren, Borderline-Tumoren (mit zwar vorhandenem, aber relativ geringem Malignisierungspotential) und maligne Tumoren unterschieden werden. Zu den malignen epithelialen Tumoren zählen die serösen, muzinösen, endometrioiden, klarzelligen und nicht klassifizierbaren Ovarialtumoren. Das seröse Ovariakarzinom ist, gefolgt von dem muzinösen Ovariakarzinom, der häufigste maligne Tumor des Ovars. Die epithelialen Tumoren entstehen meist durch infiltratives Wachstum des Müller-Epithels aus einer Ovarialzyste (Böcker *et al.*, 2004). Die Klassifikation der Ovarialtumoren erfolgt nach den aktuellen Beschlüssen der WHO (Tavassoli und Devilee, 2003).

1.2 Therapie und Prognose ovarieller Tumoren

Jeder klinisch nachgewiesene Tumor des Ovars muss operativ entfernt und histologisch beurteilt werden. Die Stadieneinteilung erfolgt nach den Vorgaben der *Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO)* und des *American Joint Committee on Cancer* (Tabelle 8.1). In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass der maximale Durchmesser des postoperativ verbliebenen Residualtumors der wichtigste prognostische Parameter für das Überleben der Patientin mit malignem Ovarialtumor darstellt (Hoskins *et al.*, 1992; Kuhn *et al.*, 1998; Bristow *et al.*, 2002). Die Standardoperation besteht in einer totalen Hysterektomie und bilateraler Salpingo-Oophorektomie, einhergehend mit einer gründlichen Examination des Peritoneums, einer Omentektomie und gegebenenfalls einer Biopsie paraaortaler Lymphknoten. Der Großteil der Patientinnen profitiert von einer postoperativen Chemotherapie. Ausgenommen sind Patientinnen mit einem Ovariakarzinom im sehr frühen Stadium, die eine 5-Jahres-Überlebensrate von 90-95 % mit alleiniger operativer Therapie haben (Cannistra, 2004). Eine intravenöse Kombinationschemotherapie, basierend auf Paclitaxel und Carboplatin, ist der derzeitige Standard zur postoperati-

ven Behandlung fortgeschrittener Ovarialkarzinome. Nur etwa die Hälfte der Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom erfährt durch die Platin-Taxan-Kombination eine Komplettremission. Bei den meisten Frauen tritt innerhalb der ersten 3 Jahre ein Rezidiv auf. Dabei kann zwischen einem primären Progress, Früh- und Spätrezidiven unterschieden werden. Frührezidive entwickeln sich innerhalb der ersten 6 Monate nach Primäroperation und sind häufig durch eine Platinresistenz gekennzeichnet, die eine weitere Therapie deutlich erschwert. Trotz der Fortschritte in der Behandlung von Ovarialkarzinomen zählen nur etwa 20 % der Patientinnen mit Ovarialkarzinom zu den Langzeitüberlebenden. Chemoresistenz führt zu einer deutlichen Limitation der Behandlungsoptionen. Vermutlich ist das Versagen der Therapie bei Patientinnen mit metastasierten Ovarialkarzinom auf eine Chemoresistenz zurückzuführen, die an sich besteht oder sich im Laufe der Therapie entwickelt. Ziel der Forschung ist es, Resistenzentwicklungen vorherzusagen bzw. Resistenzmechanismen zu umgehen und so die Therapie an den einzelnen Patienten anzupassen. Die Resistenz von Tumorzellen gegenüber Zytostatika tritt auf vielen Ebenen in Erscheinung. Dazu zählen unter anderem eine Inaktivierung von Medikamenten, Veränderungen der Medikamenten Target-Strukturen und eine verringerte Apoptoserate (Longley und Johnston, 2003). Die bei der Behandlung verwendeten Platin-Analoga cis-Platin und Carboplatin führen zu DNA-Schäden durch Querverknüpfungen zwischen den beiden DNA-Strängen. Dadurch entstandene DNA-Schäden werden durch die Zelle entweder repariert, oder wenn der Schaden irreparabel ist, wird die Zelle in den programmierten Zelltod (Apoptose) geführt. Nicht nur eine Verringerung der Apoptoserate, sondern auch Veränderungen bei der Reparatur von DNA-Schäden können zur Chemoresistenz von Tumorzellen führen. Hier spielt das Tumorsuppressorgen p53 eine wichtige Rolle. Die Funktionalität von p53 kann durch Mutationen oder veränderte Expression von regulatorischen Proteinen im p53-Pathway gestört sein.

1.3 Das Tumorsuppressorgen p53

In den ersten zehn Jahren nach seiner Entdeckung 1979 galt das Protein p53 als Onkogen. Bald wurde jedoch klar, dass p53, anstatt Tumore zu verursachen, die Zelle vor bösartigen Veränderungen schützt. Das p53-Protein spielt eine zentrale Rolle bei der zellulären Antwort auf eine Reihe von Stresssignalen, wie z.B. DNA-Schäden, Hypoxie und aberrante proliferative Signale, wie die Aktivierung von Onkogenen. Infolge von zellulärem Stress wird p53 stabilisiert und reguliert die Transkription von Genen, die in DNA-Reparatur, Zellzyklusarrest und Apoptose involviert sind (Levine, 1997; Riley *et al.*, 2008). Charakteristisch ist deshalb die Bezeichnung von p53 als der „Wächter des Genoms“ (Lane, 1992). Ein DNA-Schaden löst in der Zelle eine Stresssituation aus. Die Zelle kann in Abhängigkeit vom Ausmaß des DNA-Schadens mit Zellzyklusarrest, Reparaturmechanismen oder programmiertem Zelltod (Apoptose) reagieren. p53 kann direkt in die DNA-Reparatur eingreifen (Albrechtsen *et al.*, 1999) oder als Inhibitor der Angiogenese fungieren (Vogelstein *et al.*, 2000). Der p53-Pathway ist ausschlaggebend für eine effektive Tumorsuppression beim Menschen. Mutationen im p53 Gen, die die Funktion von p53 beeinflussen, sind in 50 % aller menschlichen Tumoren zu finden (Vousden und Lane, 2002).

Das auf Chromosom 17p13.1 lokalisierte p53-Gen kodiert für ein aus 393 Aminosäuren (53 kDa) bestehendes Phosphoprotein, das strukturell und funktionell in vier Domäne geteilt wird. Die ersten 42 Aminosäuren am N-terminus fungieren als transaktivierende Domäne, die durch Interaktion mit der Transkriptionsmaschinerie, die Genexpression positiv regulieren kann (Levine, 2000). Die transkriptionelle Aktivität von p53 kann durch die N-terminale Bindung des MDM2-Proteins verhindert werden. Für die Bindung von MDM2 sind hier die Aminosäuren 22 und 23 von entscheidender Bedeutung (Lin *et al.*, 1996). Die spezifische DNA-Bindungsdomäne befindet sich zwischen den Aminosäuren 102 und 292 und verleiht p53 die Fähigkeit, als Transkriptionsfaktor zu agieren. In dieser

Region finden sich mehr als 90 % der Mutationen im p53-Gen wieder.

In normalen, ungestressten Zellen ist p53 aufgrund der relativ kurzen Halbwertszeit von 20 min in nur sehr geringer Konzentration vorhanden. Zusätzlich ist p53 in einigen Zellen wahrscheinlich in einer latenten Form, also für die Transkription inaktiv, vorhanden. Unter diesen Umständen benötigt p53 ein Signal, um aktiviert zu werden. Verschiedene Arten von DNA-Schäden, wie DNA-Doppelstrangbrüche durch ultraviolette (UV)-Strahlung oder Thymindimere durch Chemikalien ausgelöst, führen zu einem starken Anstieg von p53 in der Zelle und zu dessen Aktivierung als Transkriptionsfaktor. Zusätzlich zu DNA-Schäden können auch Hypoxie, Hitzeschock, DNA-Transfektion oder die Expression zellulärer oder viraler Onkogene eine Aktivierung von p53 bewirken (Lowe und Ruley, 1993; Zhan *et al.*, 1993; Yeargin und Haas, 1995). Die genauen Mechanismen, die dazu führen, dass p53 aktiviert wird, sind noch nicht vollständig geklärt.

Phosphorylierung ist klassischerweise der erste Schritt in der Stabilisierung von p53. Durch Phosphorylierungen entstandene strukturelle Änderungen von p53 verhindern die Bindung von MDM2, weshalb mehr aktives p53 zur Verfügung steht. *In vitro*- und *in vivo*-Studien haben gezeigt, dass die Regulierung von p53 weniger von post-translationalen Modifikationen abhängt, sondern vielmehr von den Negativ-Regulatoren MDM2 und MDMX kontrolliert wird (Toledo *et al.*, 2006).

1.4 MDM2 und MDMX: Regulation von p53

Das murine double minute 2 (MDM2) Gen wurde als eines von drei Genen (MDM1, 2, 3), die in der spontan transformierten Maus-Zelllinie 3T3-DM in bis zu 50 Kopien vorliegen, identifiziert (Fakharzadeh *et al.*, 1991). Diese MDM-Gene sind auf kleinen extrachromosomalen Kernkörperchen, *double minutes*, lokalisiert. Später konnte dann gezeigt werden, dass allein ein überexprimiertes MDM2-Gen für die spontane Transformation von Zellen verantwortlich ist (Cahilly-Snyder *et al.*, 1987; Fakharzadeh *et al.*, 1991). Der Grund für

dieses Potential wurde nur kurze Zeit später nachgewiesen: die Bindung von MDM2 an das Tumorsuppressorgen p53 inhibiert die p53-abhängige Transaktivierung (Momad *et al.*, 1992). Das humane Homologe (HDM2) ist auf Chromosom 12q14.3-q15 lokalisiert; es wird in der folgenden Arbeit, wenn es sich nicht ausschließlich um das humane HDM2 handelt, die Bezeichnung MDM2 verwendet.

Bei Suche nach weiteren p53-Bindungsproteinen wurde im Jahre 1996 das MDMX-Protein identifiziert (Shvarts *et al.*, 1996). Das humane Homolog von MDMX konnte in fast allen humanen Geweben nachgewiesen werden (Shvarts *et al.*, 1997). MDMX ist auf dem Chromosomenabschnitt 1q32 lokalisiert und weist große Ähnlichkeiten zu MDM2 auf (Abb. 1.1). Die messenger-RNA (mRNA) des MDMX-Gens interagiert mit p53 in Zellen, eine Überexpression von MDMX inhibiert die p53-abhängige Transkription (Shvarts *et al.*, 1996). Wenige Jahre später konnte in einem „Yeast-two-Hybrid“-System für MDM2 assoziierte Gene MDMX-Klone nachgewiesen werden (Sharp *et al.*, 1999; Tanimura *et al.*, 1999). Tatsächlich findet auch eine Interaktion der verwandten Proteine *in vivo* statt. Eine Heterooligomerisierung zwischen MDMX und MDM2 ist wesentlich stabiler als Homooligomerisierung der jeweiligen Proteine (Tanimura *et al.*, 1999). Der Vergleich der Proteinstruktur von MDM2 und MDMX zeigte eine hohe Homologie der beiden Proteine (Abb. 1.1). Die große Ähnlichkeit in der p53-Bindungsdomäne beider Proteine ist Voraussetzung, um an p53 zu binden (Bottger *et al.*, 1999). MDMX und MDM2 interagieren über die C-terminale RING-Finger Domäne; die Funktion des Zink-Finger-Motivs ist noch größtenteils unbekannt. Verantwortlich für den Transport von MDM2 zwischen Zytoplasma und Nukleus sind die Bereiche des Kernlokalisationssignals (NLS) und Kernexportsignals (NES), die im MDMX-Protein fehlen (Gu *et al.*, 2001). Daher ist zu vermuten, dass MDMX an andere Proteine gebunden werden muss, um in den Zellkern zu gelangen. Die saure Domäne im zentralen Bereich kommt in beiden Proteinen vor.

In vivo-Experimente haben die zentrale Rolle von MDM2 und MDMX in der Regulation

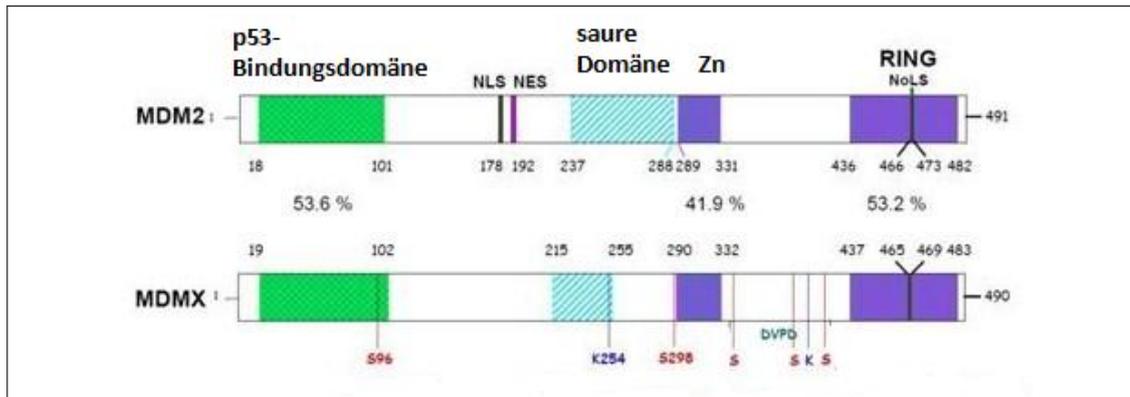


Abbildung 1.1. Homologie des MDMX und MDM2 Proteins:

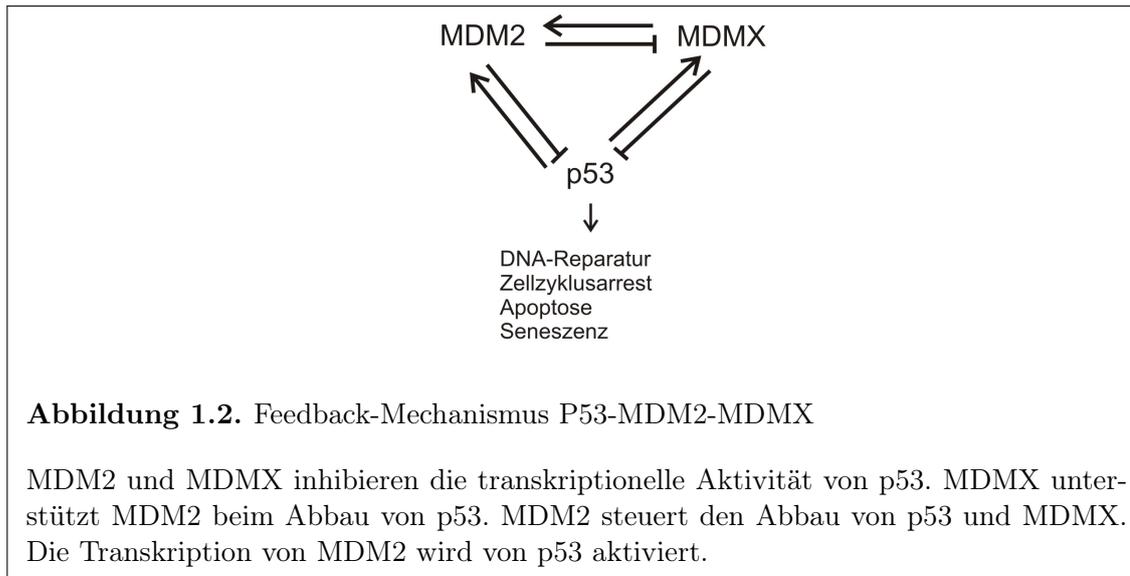
MDM2 besitzt im zentralen Bereich ein Kernlokalisierungssignal (NLS), ein Kernexportsignal (NES) sowie C-terminal ein nukleoläres Lokalisationssignal (NoLS), diese fehlen im MDMX-Protein.

von p53 gezeigt: Ein MDM2-Knock-Out in Mäusen führt zu sehr früher embryonaler Letalität. Diese Mäuse sterben noch vor der Implantation im Uterus. Ein gleichzeitiger Knock-Out des p53-Gens führt zum Überleben dieser Phänotypen (Montes *et al.*, 1995). Mäuse mit hypomorphen Allelen, die nur 30 % des MDM2-Gens exprimieren, zeigten deutliche Gewichtsverluste, ein defektes hämatopoetisches System und waren weitaus radiosensitiver im Vergleich zu gesunden Mäusen (Mendrysa *et al.*, 2003). MDMX-Knock-Out-Mäuse hingegen sterben erst zwischen Tag 7,5-12 aufgrund deutlich verzögertem Wachstums und p53-induzierter Apoptose (Jones *et al.*, 1995; Finch *et al.*, 2002). Dies führt zu der Annahme, dass MDM2 zur Kontrolle des p53 Levels dient, MDMX aber wesentlich dazu beiträgt, die Aktivität von p53 zu regulieren. Beide Proteine können sich gegenseitig nicht ersetzen, halten aber p53 synergistisch unter Kontrolle (Abb. 1.2) (Francoz *et al.*, 2006).

1.5 MDMX-MDM2-p53 Interaktion

MDM2 und MDMX sind in der Lage, p53 zu binden und verhindern somit unabhängig voneinander, dass p53 als Transkriptionsfaktor wirkt (Shvarts *et al.*, 1996). Während

MDM2 als E3-Ubiquitin-Ligase die Aufgabe der Ubiquitierung und somit der Vorbereitung zur Degradierung von p53 übernimmt (Honda *et al.*, 1997; Haupt *et al.*, 1997), ist MDMX dazu nicht in der Lage (Shvarts *et al.*, 1996; Jackson *et al.*, 2000). Charakteristisches Merkmal aller E3-Ligasen ist das RING-Finger Motiv, das auch im MDM2-Protein die Aktivität als E3-Ligase übernimmt (Honda und Yasuda, 2000). MDM2 ist auch in der Lage sich selbst zu ubiquitinylieren und somit den eigenen proteasomalen Abbau zu bewirken (Fang *et al.*, 2000). Dennoch konnten einige Arbeitsgruppen zeigen, dass MDMX dazu in der Lage ist, die E3 Ubiquitin Ligase Aktivität von MDM2 zu potenzieren (Linares *et al.*, 2003; Kostic *et al.*, 2006; Poyurovsky *et al.*, 2007). Von besonderer Bedeutung ist die Heterodimerisierung von MDM2 und MDMX über das RING-Finger Motiv (Tanimura *et al.*, 1999). Dies unterdrückt die Autoubiquitinylierung von MDM2 und trägt damit zu dessen Stabilisierung bei (Sharp *et al.*, 1999; Stad *et al.*, 2000). Die Überexpression von MDMX scheint, aufgrund der Bildung von MDMX-MDM2 Heterodimeren, die Degradierung von p53 durch MDM2 zu inhibieren (Jackson *et al.*, 2000; Stad *et al.*, 2000). Das p53-Protein aktiviert die Transkription vieler Zielgene, unter anderem auch die des MDM2-Gens (Abb. 1.2) (Barak *et al.*, 1993). Dabei bindet p53 an den P2-Promotor des MDM2-Gens und führt so zu einer transkriptionellen Aktivierung. Da anschließend das MDM2-Protein die p53-Aktivität inhibiert, kann von einem negativen Feedback-Mechanismus gesprochen werden. Dies konnte auch durch Studien auf Zellniveau nachgewiesen werden (Lahav, 2008). Erst kürzlich wurde gezeigt, dass auch MDMX einen zweiten Promotor (P2) im Intron 1 enthält, der durch p53 induzierbar ist (Phillips *et al.*, 2010).



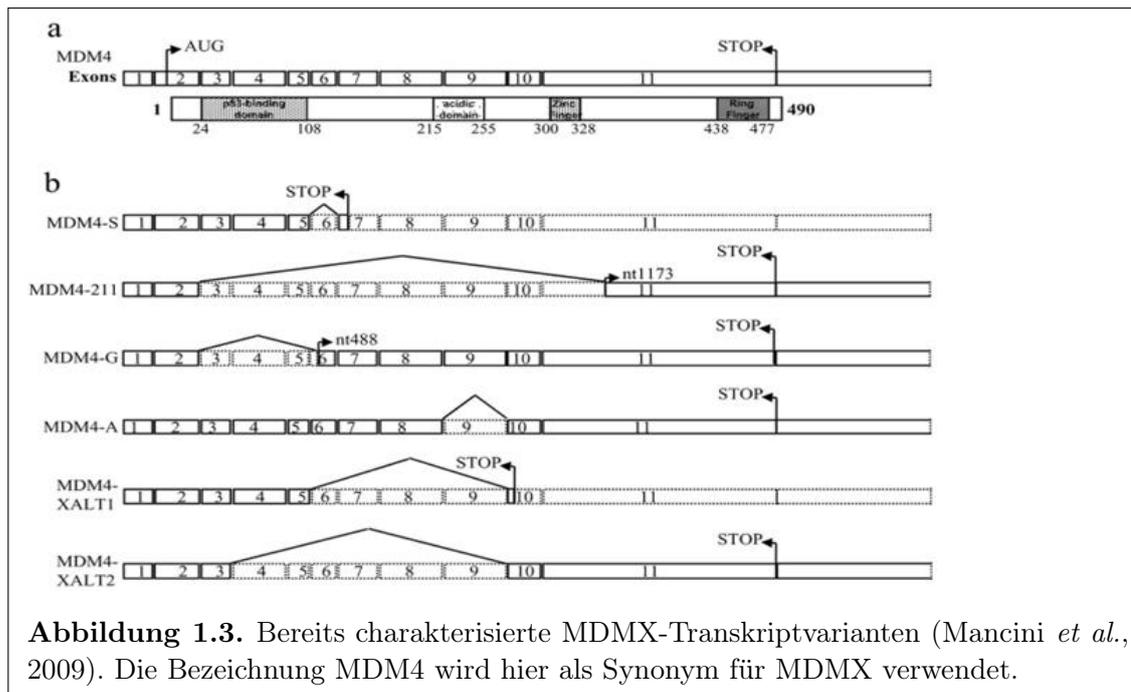
1.6 Aberrantes und alternatives Spleißen in Tumoren

Das Spleißen der prä-mRNA ist ein ubiquitärer und extrem flexibler Vorgang zur Kontrolle der posttranskriptionellen Genexpression. Es gibt Zellen die Möglichkeit, Proteine zu generieren, die verschiedene und sogar gegensätzliche Funktionen besitzen können. Durch die Möglichkeit des Spleißens wird die Proteinvielfalt deutlich erhöht. Um reife mRNA-Moleküle zu generieren, müssen die Introns herausgeschnitten werden. Der Vorgang des Spleißens beginnt, wenn eine Gruppe von Proteinen und small nuclear ribonucleoprotein (snRNP) spezifische Ribonukleinsäure (Ribonucleic acid) (RNA)-Sequenzen an den Enden der Introns binden (Sharp, 1994). Jedes interne Exon ist upstream und downstream von Spleißstellen flankiert. Im Bereich der terminalen Exons ist am 5'Ende die Caping-Stelle und am 3'Ende der Poly-A-Schwanz. Eine Regulation der Spleißaktivität ist durch Enhancer und Silencer gegeben. Dies sind kleine, circa 10 Nukleotide umfassende, in Exons oder Introns liegende Sequenzen, die Spleißstellen stimulieren bzw. inhibieren können (Srebrow und Kornblihtt, 2006). Alternatives Spleißen erlaubt einem individuellen Gen,

verschiedene mRNAs zu exprimieren. Die daraus resultierenden Proteine haben teilweise ganz unterschiedliche, auch antagonistische Funktionen. Beim aberranten Spleißen hingegen können Exonsequenzen ganz oder teilweise verloren gehen, z.B. in Folge von Mutationen, die in 15 % der Fälle zu Spleißdefekten führen (Srebrow *et al.*, 2006). Dass dies eine Quelle kanzerogen wirkender Fehler der Genexpression sein kann, zeigen Mutationen in Introns von Tumorsuppressorgenen. Diese führen oft zum Exon-Skipping, dem Überspringen eines Exons. Der Spleißvorgang endet in einem verkürzten Protein, vergleichbar mit einer Nonsense-Mutation (Venables, 2004). In den letzten 20 Jahren zeigten Studien jedoch auch alternative Spleißvorgänge ohne genomische Mutationen, die typisch für Tumoren sind (Venables, 2004). Diese gespleißten Genprodukte spielen eine aktive Rolle in der Karzinogenese und sind deshalb auch ein potentiell Ziel der Tumorthherapie.

1.7 MDM2- und MDMX-Spleißvarianten

Für MDM2 konnten schon mehr als 40 Transkriptvarianten beschrieben werden. Die Assoziation zwischen MDM2-Spleißvarianten und Malignität wird immer noch kontrovers diskutiert, da auch im Normalgewebe Spleißvarianten identifiziert werden konnten (Bartel *et al.*, 2002). In verschiedenen Tumoren konnte jedoch gezeigt werden, dass alternativ gespleißte MDM2-Proteine mit steigender Malignität korrelieren (Sigalas *et al.*, 1996; Matsumoto *et al.*, 1998). In weiblichen Tumoren bedingt die aberrante Expression von MDM2 eine verkürzten Überlebenszeit beim invasiven Mammakarzinom (Lukas *et al.*, 2001). In Bezug auf MDMX konnten bis zum Beginn dieser Arbeit 6 Isoformen näher charakterisiert werden (Abb. 1.3).



Die erste Transkriptvariante wurde bereits 1999 beschrieben und konnte von zahlreichen Arbeitsgruppen näher charakterisiert werden (Rallapalli *et al.*, 1999). Dieser Spleißvariante, bekannt als MDMX-S, fehlt das komplette Exon 6. Diese Deletion führt zu einer Verschiebung des Leserahmens nach Kodon 114 und resultiert in einem neuen Stopkodon nach 140 Nukleotiden. Das kurze Protein MDMX-S besteht dementsprechend nur noch aus der p53-Bindungsdomäne und zusätzlichen 26 neuen Aminosäuren am C-Terminus. MDMX-S bindet und inaktiviert p53 10-fach effektiver als full-length MDMX (FL-MDMX) oder full-length MDM2 (FL-MDM2) (Rallapalli *et al.*, 1999). Bei Weichteilsarkomen ist die Expression von MDMX-S mit einer signifikanten Verkürzung der Überlebenszeit verbunden und somit ein wichtiger prognostischer Faktor (Bartel *et al.*, 2004).

Darüber hinaus sind auch MDM2- und MDMX-Varianten bekannt, denen die p53-Bindungsdomäne fehlt. Hier sei die häufigste Transkriptvariante des MDM2, genannt MDM2-B, zu erwähnen. MDM2-B ist in einer Vielzahl von Tumoren nachgewiesen worden. Das Protein dieser Transkriptvariante weist eine Deletion der Aminosäuren 28-299 auf. Folglich

fehlt die p53-Domäne bei noch vollständig vorhandenem RING-Finger Motiv. Es konnte gezeigt werden, dass MDM2-B mit FL-MDM2 interagiert und dessen Aktivität inhibiert. Daraus resultiert eine erhöhte Aktivität von p53 (Evans *et al.*, 2001). Eine Stabilisierung von p53 lässt nicht auf Tumorprogression schließen. Es ist aber davon auszugehen, dass auch mutiertes p53 in gleicher Art und Weise stabilisiert werden kann (Bartel *et al.*, 2004).

Eine weitere Transkriptvariante des humanen MDMX, MDMX211, weist ein ähnliches Spleißmuster auf (Giglio *et al.*, 2005). Diese aberrant in Exon 2 und 11 gespleißte Transkriptvariante enthält die ersten 26 Aminosäuren und die letzten 138 Aminosäuren des FL-MDMX. Aufgrund der fehlenden Exons 2 bis 10, sowie Teilen von Exon 11, kann p53 nicht mehr gebunden werden. MDMX211 stabilisiert nachweislich p53, indem es durch Bindung an MDM2 den Abbau von p53 verhindert. Durch diese Heterodimerisierung wird auch MDM2 stabilisiert. Da das p53-Protein transkriptionell inaktiv ist, geht man davon aus, dass MDMX211 einen inaktiven MDM2-p53 Komplex stabilisiert. In humanen Schilddrüsenkrebs-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Koinzidenz von MDMX211 und erhöhtem MDM2 mit verminderter Chemosensitivität verbunden ist (Giglio *et al.*, 2005). In humanen Tumoren konnte diese Transkriptvariante in 2 von 16 nichtkleinzelligen Lungentumoren und zusätzlich in 18 % von 83 papillären Schilddrüsenkarzinomen (PTC) beschrieben werden (Giglio *et al.*, 2005; Prodosmo *et al.*, 2008). Für eine Korrelation mit Tumoreigenschaften gibt es bislang noch keine Beweise.

Die beiden Transkriptvarianten MDMX-A und MDMX-G wurden erstmals in humanen epitheloiden Cervix-Karzinomzellen (C33A) identifiziert (de Graf *et al.*, 2003). MDMX-A ist eine alternativ gespleißte Variante der FL-MDMX-mRNA, d.h. das Spleißen erfolgte

an Exon/Intron-Grenzen. In dieser Variante wird Exon 9 herausgespleißt, was dazu führt, dass der kodierende Bereich für die saure Domäne fehlt. Der MDMX-G-mRNA fehlen Exon 3-5 und Teile von Exon 6. Die Deletion der Aminosäuren 27-124 entspricht der p53-Domäne der MDMX-mRNA. Beide Protein weisen keine Verschiebung des Leserahmens auf.

1.8 Mögliche Rolle der MDM2/MDMX-Transkripte im Ovarialkarzinom

Das Ziel einer Tumorbehandlung ist eine spezifische und für den Gesamtorganismus möglichst schonende Eradikation. In einigen Tumorentitäten, wie beispielsweise dem kolorektalen Karzinom, ist bereits die Therapie auf eine genetische Variationen im KRAS-Gen angepasst (van Krieken *et al.*, 2008). Auch im Ovarialkarzinom ergeben sich aus dieser Analyse möglicherweise neue, innovative Therapieansätze, die gezielt auf die genetischen Alterationen in malignen Zellen ausgerichtet sind. Das Ziel ist eine zunehmend individualisierte Therapie, um ein verbessertes Ansprechen auf Chemotherapeutika zu erreichen. Bei der Suche nach kausalen Mechanismen als mögliche Angriffspunkte einer Therapie nimmt das Tumorsuppressorgen p53 eine zentrale Stellung ein. Da die Onkoproteine MDM2 und MDMX einen wesentlichen Einfluss auf den Abbau von p53 haben, ist auch hier eine mögliche Therapieoption zu vermuten. Eine Inhibierung der MDM2-Expression würde bei dem bekannten negativen Feedback-Mechanismus zu einem Anstieg von funktionellen p53 führen (Lahav, 2008). Dies könnte durch den Anstieg der Apoptose eine verbesserte Ansprechrate auf Strahlen- und Chemotherapie bedeuten. Da auch bei MDMX bekannt ist, dass es synergistisch mit MDM2 das p53-Level unter Kontrolle hält, deutet sich auch

hier eine potentielle Behandlungsmöglichkeiten an (Francoz *et al.*, 2006). Die durch das Spleißen entstandene Diversität des MDMX-Gens zieht Veränderungen im beschriebenen p53-Regelkreis nach sich. Die dementsprechend verstärkte/verminderte p53-Expression kann enorme Auswirkungen auf die p53-assoziierten Gene haben. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass genotoxischer Stress alternatives Spleißen von MDM2 und MDMX aktiviert (Chandler *et al.*, 2006). Vermutlich kommt es dabei zu einer schrittweisen malignen Konversion in der alternativ gespleißte MDM2- bzw. MDMX-Varianten einen selektiven Druck auf Zellen aus, um zusätzliche Veränderungen im p53-Pathway hervorzurufen.

Die Charakterisierung der MDMX-Spleißvarianten ermöglicht es zunächst, das komplexe Netzwerk zu ergänzen und zu verstehen. Im Anschluss kann dies dazu beitragen, eine zielgerichtete Therapie zu entwickeln bzw. auch mögliche Resistenzen bereits vor Therapiebeginn zu erkennen.

1.9 Zielstellung

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die Detektion und Charakterisierung von alternativ und aberrant gespleißten Transkripten der MDMX-mRNA in Gewebeproben des Ovariakarzinoms. Ergänzend zu Vorarbeiten mit Tumorzelllinien des Ovars sollten neue, aber auch bereits bekannte Spleißvarianten des MDMX-Gens analysiert werden. Zusätzlich wurde die Expression von MDM2 und p53 in den Tumorproben untersucht.

Im nächsten Schritt sollte gezeigt werden, wie besonders häufig detektierte MDMX-Spleißvarianten auf eine Behandlung mit cis-Platin reagieren. Hierfür war das Ziel, ein adäquates Transfektionssystem zu entwickeln, welches die Auswirkungen auf den p53-Pathway in geeigneten Zellen erkennen lässt. Für zukünftige Untersuchungen interessierte die Entwicklung spezifischer Primer zur Detektion der MDMX-Spleißvarianten in Zelllinien und Tumormaterial.

Die vorliegende Arbeit sollte einen Beitrag dazu leisten, die derzeit konventionellen Therapieformen (Operation, Zytostatika) zukünftig mit einer individuell angepassten Behandlung ergänzen zu können.

2 Materialien

2.1 Tumormaterial

Tabelle 2.1. Auflistung der untersuchten Tumorproben

Nr.	Jahr	WHO-Einteilung	Grading	Ort
1	2008	seröses Ovarialkarzinom rechts	unbekannt	Halle
2	2008	seröses Ovarialkarzinom Rezidiv	G3	Halle
3	2008	seröses Ovarialkarzinom rechts	G3	Halle
4	2008	seröses Ovarialkarzinom rechts	G3	Halle
5	2007	siegelringzelliges Ovarialkarzinom	G3	Halle
6	2006	Borderline Tumor Rezidiv	Borderline	Halle
7	2005	seröses Ovarialkarzinom beidseits	G3	Halle
8	2007	maligner Müllerscher Misch tumor	G2	Halle
9	2006	endometrioides Ovarialkarzinom beidseits	G1	Halle
10	2007	serös-papilläres Ovarialkarzinom beidseits	G3	Halle
11	2007	seröse Ovarialkarzinom rechts	G3	Halle
12	2006	seröse Ovarialkarzinom links	G2	Halle
13	2006	seröse Ovarialkarzinom	unbekannt	Halle
14	2006	serös-papilläres Ovarialkarzinom links	G2	Halle
15	2004	endometrioides Ovarialkarzinom links	G1	Halle
16	2004	seröses Ovarialkarzinom	G3	Halle
17	2004	seröses Ovarialkarzinom	G3	Halle
18	2004	serös-papilläres Ovarialkarzinom	G2	Halle
19	2004	seröses Ovarialkarzinom	G2	Halle
20	2004	serös-papilläres Ovarialkarzinom	G2	Halle
21	2004	serös-papilläres Ovarialkarzinom	G2	Halle
22	2004	mischdifferenziertes Ovarialkarzinom	G1	Halle
23	2004	serös-papilläres Ovarialkarzinom	G3	Halle
24	2005	Rezidiv serös-papilläres Ovarialkarzinom	G3	Halle
25	2004	Metastase serös-papilläres Ovarialkarzinom	G2	Halle
26	2004	serös-papilläres Ovarialkarzinom	G2	Berlin
27	2004	endometrioides Ovarialkarzinom	G3	Berlin
28	2004	gemischtes Ovarialkarzinom	G3	Berlin
29	2004	undifferenziertes Ovarialkarzinom	G3	Berlin
30	2003	seröses Ovarialkarzinom	G3	Berlin
31	2003	seröses Ovarialkarzinom	G2	Berlin

In dieser Arbeit wurden 31 postoperativ frisch eingefrorene Proben von Ovarialtumoren untersucht. Das Tumormaterial stammt von Patientinnen aus der Klinik für Gynäko-

logie des Universitätsklinikum Halle (Saale) sowie aus der Klinik für Gynäkologie der Charité Berlin. Die operativen Eingriffe sind zwischen 2003 und 2008 durchgeführt worden. Alle Tumorproben wurden durch einen Pathologen des Institutes für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle (Saale) auf ausreichende Qualität hin untersucht. Der Tumoranteil in den jeweiligen Proben beträgt jeweils mindestens 50 %.

2.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

- 10 mL / 50 mL Röhren, Greiner, Nürtingen
- 96-Lochplatten Greiner, Nürtingen
- 5 mL /10 mL sterile Einmalpipetten, Greiner, Nürtingen
- BiodocAnalyse, Biometra, Göttingen
- ClearBlue X-Ray Film (5x7 inches), Thermo Scientific
- Extra Thick Blot Papier Mini blot size, pre-cut, BioRad München
- Hyper Processor, Biometra Göttingen
- Miniblotter, Biometra Göttingen
- PTC-200 Thermal Cycler, MJ Research (über Biozym, Hess. Oldendorf)
- PVDF-Membran (0,45 μm), Roth, Karlsruhe
- Rotor-Gene RG-3000, Corbett Research
- Sequi-Gen Gelkammersystem, BioRad München
- Tetrad2 Peltier Thermo Cycler, BioRad München
- Trio Thermoblock mit Deckelheizung, Biometra Göttingen
- Zellkulturflaschen (25 cm²) Greiner, Nürtingen
- Zellzähler Beckmann, Coulter, Krefeld

2.3 Chemikalien

- Agar, Invitrogen, Karlsruhe
- Agarose Serva, Heidelberg
- Ampicillin, Serva, Heidelberg
- cis-Platin, Universitätsapotheke Halle-Wittenberg
- Dimethylsulfoxid Merck, Darmstadt
- DNA-Standard (100 bp-Leiter), Invitrogen, Eggenstein
- dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), Promega, Heidelberg
- Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM), Life Technologies, Eggenstein
- Ethanol (99 %), Merck, Darmstadt
- Ethylendiamintetraacetat (EDTA), Roth, Karlsruhe
- Ethidiumbromid, Serva, Karlsruhe
- Essigsäure (p.a.), Merck, Darmstadt
- Fetales Kälberserum (FKS), BioWhittaker
- Formaldehyd (p.a.), Merck, Darmstadt
- Fugene, Roche, Mannheim
- Isopropanol, Roth, Karlsruhe
- Luria broth-Medium (LB-Medium), Invitrogen, Karlsruhe
- Magermilchpulver, Glücksklee Nestle, Schweiz
- Methanol 100 % (p.a.), VWR, Darmstadt
- Natrium-Acetat, Serva, Heidelberg
- Natriumchlorid, Serva, Heidelberg
- Natriumpyruvat, Serva, Heidelberg
- beta-Mercaptoethanol (14,3 M), VWR Darmstadt

- Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung, PAA Laboratories, Cölbe
- Random Primer, Invitrogen, Karlsruhe
- Tris, Roth, Karlsruhe
- TRIzol, Invitrogen Karlsruhe
- Trypsin, Serva, Heidelberg
- Tween 20, Serva, Heidelberg
- 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-Betha-D-galactosid(X-Gal), Sigma, Deisenhofen

2.4 Kits

- Big Dye Terminator v1.1 Cyclor Sequenzier Kit, Applied Biosystem USA
- Cloned AMV First-Strand complementary DNA (cDNA) Synthesis Kit, Invitrogen Eggenstein
- DNase, RNase-free, Qiagen Hilden
- iProof MasterMix, Biorad München
- QIAshredder-Säulen, Qiagen Hilden
- QIAquick Gel Extraktion Kit, Qiagen Hilden
- Qanti Tect SYBR Green PCR Kit, Qiagen Hilden
- Plasmid Miniprep Kit, Qiagen Hilden
- Plasmid Maxiprep Kit, Qiagen Hilden
- Protein Assay, BioRad München
- RNAeasy Mini Kit, Qiagen Hilden
- water soluble tetrazolium (WST)-1 Reagenz, Roche Penzberg

2.5 Vektoren

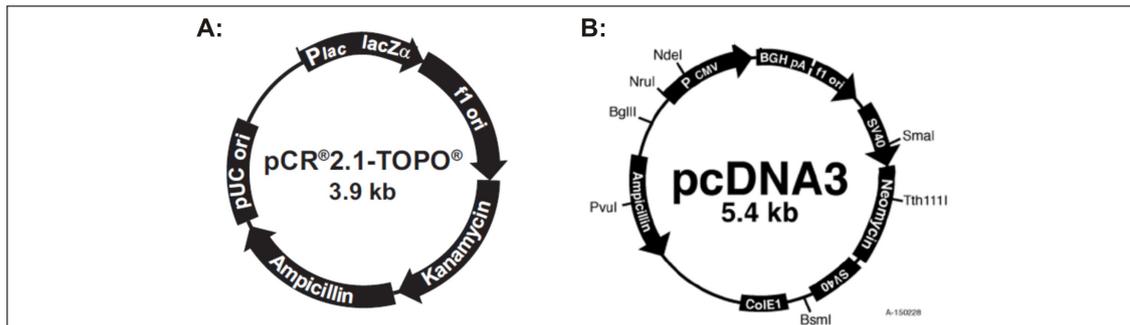


Abbildung 2.1. pCR 2.1-TOPO Plasmid Vektor und pcDNA3.1 Vektor

A: Der pCR 2.1-TOPO Vektor mit Ampicillin und Kanamycin Resistenz, lacZ Gen und T7 Promoter. **B:** Der pcDNA3-Vektor ist ein Expressionsvektor für eukaryontische Zellen unter der Kontrolle des CMV-Promoters.

2.6 Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind in Tabelle 2.2 aufgeführt.

Tabelle 2.2. In dieser Arbeit verwendete Antikörper

Antigen	Klon	Verdünnung	Ursprungstier	Firma
MDMX	BL-1258	1:1000	Kaninchen	Bethyl Laboratories
MDMX	MDMX-82	1:2000	Maus	Sigma, Steinheim
MDM2	N-20	1:500	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnologies
p53	DO-7	1:1000	Maus	Dako, Hamburg
Vinculin	11-5	1:1000	Maus	Sigma, Steinheim
p21	C-19	1:500	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnologies
Anti-Hämagglutinin	HA-7	1:2000	Maus	Sigma, Steinheim
PUMA	ab-2	1:1000	Kaninchen	Sigma, Steinheim
Anti-Maus		1:10000	Kaninchen	Dako, Hamburg
Anti-Kaninchen		1:10000	Ziege	Dako, Hamburg

2.7 Puffer und Lösungen

Eine Zusammenstellung der verwendeten Puffer und Lösungen findet sich in Tab. 2.3.

Tabelle 2.3. Puffer und Lösungen

Produkt	Zusammensetzung
DNA-Auftragspuffer	Ficoll 400 1,8 g Bromphenolblau 25 mg Xylenxyanol 25 mg mit Aqua bidest auf 10 ml auffüllen
LB-Medium	20 g in 1 l Aqua bidest lösen und autoklavieren
Nähragar für Bakterienkulturen	32 g Agar in 1 l Aqua bidest lösen und autoklavieren Zusatz von Ampicillin 50 µg/ml Zusatz von X-Gal 40 µg/ml
PBS-Lösung	NaCl 8 g KCl 0,2 g Na ₂ HPO ₄ H ₂ O 0,15 g KH ₂ PO ₄ 0,2 g mit Aqua bidest auf 1 l auffüllen
5xTBE-Puffer	Tris-HCl 54,0 g Borsäure 27,5 g EDTA 20 ml 0,5 M pH 8,0 mit Aqua bidest auf 1 l auffüllen
Lyse-Puffer (Protein)	50 mM Tris-HCl, (pH 7,0) 1 % (w/v) SDS Protease Inhibitor Cocktail P8340 (Sigma)
Zellkulturmedium	DMEM 450 ml FKS 50 ml

2.8 Enzyme

- Hot Fire Pol (5 U/µl) Solis Biodyne, Estland
- SuperScript RNase H Reverse Transkriptase, Invitrogen
- T4 Ligase (4 U/µl), Invitrogen, Karlsruhe
- Cloned AMV Reverse Transkriptase, Invitrogen, Karlsruhe

2.9 Primer

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

Tabelle 2.4. In dieser Arbeit verwendete Primer

Name	Orientierung	Sequenz 5'- 3'	Referenz
M13(pcR2.1)	antisense	AAC AGC TAT GAC CAT G	Qiagen
MDMX3	sense	GCA GTT TCT TCA CTA CCA	
MDMX4	sense	TCG TAC TAC CAT TAT GCT	
MDMX8	antisense	AGC CTA GAT GTT TCA TCT TG	
MDMX12	antisense	TGC CTA AGA ACA TTC TCT GAC A	
MDMX13	antisense	ATG ACA TCA TTT TCC ACC TC	
MDMX11	sense	ACC AAC AGA CTG CAG TTT	
MDMX14	antisense	ATG TTC GTA CTA CCA TTA TGC TAT AAA	
Xquant	sense	CAG CAG GTG CGC AAG GTG AA	
MDMX499	antisense	CAC AGT GAA AAC AAG TGA CAA GAT TCT TT	diese Arbeit
MDMX-S	antisense	GCA CTT TGC TGT AGT AGC AGT G	
MDM2-5	sense	CTG GGG AGT CTT GAG GGA CC	
MDM2-6	antisense	CAG GTT GTC TAA ATT CCT AG	
MDM2-8a	antisense	GAA TTG GTT GTC TAC ATA CTG G	
2Ex1	sense	CCG GAT TAG TGC GTA CGA	
MDM2-Ex2	sense	CGC ACG CCA CTT TTT CTC TG	
MDM2-Ex3	antisense	GTG TCT TTT TGT GCA CC	
HPRT309	sense	TTG CTG ACC TGC TGG ATT AC	
HPRT507	antisense	CTT GCG ACC TTG ACC ATC TT	
GADPH-3	sense	AGG AGC GAG ATC CCT CCA AA	Bartel <i>et al.</i> , 2004
GADPH-4	antisense	GGG CAG AGA TGA TGA CCC TT	Bartel <i>et al.</i> , 2004
Var6 HAXbaI	sense	TCA TCA TCT AGA ATG TAC CCA TAC GAC GTA CCA GAC TAC GCA TTC ACT GTT AAA GAG GTC	diese Arbeit
Var6 HANotI	antisense	TGA TGA GCG GCC GCT GTG CTG GAA TTC GCC CTT A	diese Arbeit
p53-1	sense	ACG GTG ACA CGC TTC CCT GGA T	Böhnke, 2005
p53-2	antisense	GGG TGC TTC TGA CGC ACA CCT A	Böhnke, 2005
p53-3a	sense	AGA CTG CCT TCC GGG TCA CT	Böhnke, 2005
p53-4a	antisense	GGA GGA TGT CAG TGG GGA AC	Böhnke, 2005
pcDNA3.1(-)	sense	CTT GGC AGT ACA TCT ACG	Invitrogen
pcDNA3.1(-)	antisense	CAT GCC TGC TAT TGT CTT CC	Invitrogen

3 Methoden

3.1 Isolierung von Nukleinsäuren

3.1.1 Präparation von Gesamt-RNA

Die Gesamt-RNA wurde mit Hilfe der Trizol-Methode entsprechend der Herstellerangaben isoliert. Bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerte Gewebeproben wurden jeweils $20 \times 10\text{ }\mu\text{m}$ dicke Gefrierschnitte angefertigt und in $600\text{ }\mu\text{l}$ Lysepuffer aufgenommen. Es wurde jeweils 1 ml TRIzol-Reagent sowie $200\text{ }\mu\text{l}$ Chloroform dazu pipettiert. Nach Inkubation bei Raumtemperatur und Zentrifugation waren drei Phasen sichtbar. Die obere wässrige Phase enthielt die RNA, die mittlere Phase bestand aus DNA und die untere organische Phase aus Proteinen. Die wässrige Phase wurde vorsichtig, ohne Aufsaugen der unteren Schichten, in ein neues $1,5\text{ ml}$ Tube pipettiert. Die Lagerung der RNA erfolgte kurzfristig bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, langfristig bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, wobei häufiges Auftauen und Einfrieren vermieden wurde.

3.1.2 RNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Konzentrationsbestimmung wurden die Proben 1:100 verdünnt und im Spektralphotometer vermessen. Es ist jeweils bei 260 nm und 280 nm die Extinktion gemessen worden. Die Konzentration errechnet sich aus folgender Beziehung: $1\text{ OD}_{260\text{ nm}}$ entspricht $40\text{ }\mu\text{g}$ RNA/ml. Die Reinheit der Präparation ergibt sich aus dem Quotienten der $\text{OD}_{260\text{ nm}}/\text{OD}_{280\text{ nm}}$ und liegt bei hoher Reinheit zwischen 1,8 und 2.

3.2 Reverse Transkription, Polymerasekettenreaktion und Sequenzierung

3.2.1 Reverse Transkription

Um die Expression der gesuchten mRNA in den Tumorproben nachzuweisen, erfolgte zunächst die Umschreibung der mRNA in cDNA mittels Zufallsprimern (Random Hexamer Primers, Invitrogen) in einem Trio Thermoblock (Thermocycler) der Fa. Biometra. Die Synthese der cDNA wurde mit Hilfe des Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis Kit durchgeführt. Zunächst wurden je Ansatz 2 μg RNA, 23 μl Aqua bidest. und 300 ng Randomprimer gemischt und 10 min bei 70 °C denaturiert. Anschließend wurden auf Eis 20,5 μl eines RT-Mastermix (5x cDNA Synthesis Buffer; 0.1 M DTT; RNaseOUT; Cloned AMV RT (15 U/ μl)) hinzugegeben. Zur Primeranlagerung wurde der Ansatz für 10 min bei 20 °C inkubiert. Die cDNA-Synthese erfolgte bei 52 °C für 60 min und die Denaturierung für 5 min bei 85 °C. Die gewonnene cDNA wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C aufbewahrt.

3.2.2 Polymerasekettenreaktion

Zur Detektion spezifischer MDMX- und MDM2-Spleißvarianten erfolgte zunächst die Amplifizierung der cDNA mit Primern, die nahezu den gesamten Leserahmen umspannen. Unter Verwendung von 1 μl des aus Kapitel 3.2.1 erhaltenen cDNA-Ansatzes erfolgte die erste PCR mit den Primern MDMX-11 und MDMX-12 bzw. MDM2-5 und MDM2-6. Anschließend wurden innere Primerpaare (MDMX-13 und MDMX-14 bzw. MDM2-1 und MDM2-1a) für die sogenannte „nested“ PCR verwendet. Hierfür wurden pro Ansatz 2 μl des vorangegangenen PCR-Ansatzes verwendet.

Tabelle 3.1. Reagenzien für PCR-Reaktion

Reagenz	50 μl Ansatz
Reaktionspuffer (10x)	5 μl
MgCl ₂ (1,5 mM)	5 μl
Nukleotide (10 mM)	4 μl
HotStarTaq (2 units)	0,5 μl
Primer sense (20 pmol/ μl)	1 μl
Primer antisense (20 pmol/ μl)	1 μl
Aqua bidest.	33,5 μl
cDNA	1 μl

Tabelle 3.2. PCR-Programm mit 40 Zyklen

Zyklus	Temperatur	Zeit	Wiederholung
1.	95 °C	15 min	
2.	95 °C	30 sec	
3.	58 °C	30 sec	
4.	72 °C	2 min	40x 1.-4.
5.	72 °C	10 min	

3.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Der Nachweis des amplifizierten PCR-Produktes erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Je nach zu erwartender Fragmentlänge wurden 1-2 % ige Agarosegele (jeweils in 100 mL 0,5x TBE-Puffer versetzt mit 5 μl Ethidiumbromid [10 mg/mL]) angefertigt. Die Elektrophorese erfolgte in Gelkammern der Firma Bioplex mit 0,5x TBE-Laufpuffer. Abhängig von der Größe der Gelkammern wurden jeweils 5 – 20 μl PCR-Produkt mit 1,5 μl DNA-Auftragspuffer gemischt und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 90-120 V. Nach dem Gellauf wurden die Banden mittels UV-Licht sichtbar gemacht und mit dem Geldokumentationssystem BioDocAnalyse (Biometra) ausgewertet. Zur Größenbestimmung der PCR-Produkte dienten 100-Basenpaare (bp)-Leiter als Standard.

3.2.4 Isolation von PCR-Produkten aus Agarose-Gelen

Für die Isolation von DNA erfolgte zunächst die Auftrennung des PCR-Produkts im Agarose-Gel (s.o.). Auf dem UV-Tisch wurden die Banden mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Gefäß transferiert. Um keine DNA-Veränderungen zu induzieren, wurde die Zeit unter UV-Licht möglichst gering gehalten. Im Anschluss erfolgte die Reinigung unter Verwendung des QiaQuick-Gelextraktionskits (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers, mit der Ausnahme, dass zum Lösen der Agarose QX1-Puffer (statt QG-Puffer) aus dem QiaEX-Gelextraktionskit verwendet wurde.

3.3 Klonierung von DNA-Fragmenten

3.3.1 Ligation von PCR-Produkten in TOPO-TA-Vektoren

Je 4 μl der PCR-Produkte wurden mit 1 μl Salt Solution, 1 μl 2.1 TOPO-Vektor (beides aus dem TOPO-TA-Cloning-Kit) versetzt und bei Raumtemperatur 5 min inkubiert.

3.3.2 Transformation von *E. coli*-Zellen

Escherichia coli (*E. coli*)-Zellen (TOP 10) wurden mit 2 μl des Ligationsansatzes transformiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Nach 30 sec Hitzeschock bei 42 °C erfolgte die sofortige Lagerung auf Eis. Anschließend wurden 250 μl S.O.C.-Medium des TOPO-TA-Cloning-Kits hinzugegeben und die Lösung bei 37 °C für eine Stunde unter leichtem Schütteln (200 U/min) inkubiert. Je 40 μl X-Gal für Blau-Weiss-Selektion und 100 μl der Bakteriensuspension wurden auf Agar ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Die verwendeten Agar-Platten enthielten Ampicillin (250 ng/ml). Positive Transformanten (weiße Kolonien) wurden mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und mittels

Kolonie-PCR analysiert. Die PCR-Produkte wurden auf ein Agarosegel aufgetragen, elektrophoretisch getrennt und analysiert.

3.3.3 Isolierung von Plasmid-DNA

Die bereits gepickten Bakterien-Einzelkolonien der Agarplatte wurden in 10 ml LB-Medium mit Ampicillinzusatz (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren der Kultur wurde die Isolierung der Plasmide nach Herstellerangaben der Fa. Qiagen isoliert.

3.3.4 Sequenzierung der Plasmid-DNA

Die gewonnene Plasmid-DNA konnte nun mit Hilfe eines Kits der Firma Qiagen sequenziert werden. Es wurden spezifische Primer (M13) gewählt, die im Vektor binden und somit konnte die vollständige Transkript-Variante sequenziert werden. Der Ansatz für eine Sequenzier-Reaktion setzte sich wie folgt zusammen:

Tabelle 3.3. Reagenzien für Sequenzierreaktion

Reagenz	20 μl Ansatz
Sequenzierpuffer	11 μl
Sequenziermix	2 μl
Primer M13 rev oder fw (0,8 pmol)	4 μl
PCR-Produkt	3 μl

3.3.5 Fällung der Sequenzierreaktion

Zu dieser 20 μl Sequenzierreaktion wurden in möglichst dunkler Umgebung 2 μl EDTA, 2 μl Na-Acetat und 50 μl 99 % Ethanol hinzu pipettiert. Nach kurzem Vortexen und 15-minütiger Inkubation erfolgte das Zentrifugieren für 20 min bei 4 °C und 6000 rpm.

Tabelle 3.4. Sequenzierprogramm mit 25 Zyklen

Zyklus	Temperatur	Zeit	Wiederholung
1.	96 °C	60 sec	
2.	96 °C	10 sec	
3.	50 °C	5 sec	25x 1.-3.
4.	60 °C	4 min	

Nach dem Abpipettieren des Überstandes und Hinzugabe von 70 μ l Ethanol (70 %) wurden die Proben erneut für 10 min bei 4 °C und 6000 rpm zentrifugiert. Nach erneutem Abpipettieren des Überstandes konnte das Pellet bei 80 °C für 10 min trocknen.

3.3.6 Sequenzierung

Die Sequenzierung der Proben erfolgte im Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung der Universität Halle-Wittenberg durch Dr. Vesselin Christov/ Dr. Dorothea Darmer unter Nutzung eines ABI Prism DNA-Sequencers. Daran schloss sich die eigenständige Auswertung der Sequenzen mit Hilfe der Programme Sequence Scanner der Firma ABI und Clone Manager der Fa. SciEd Central an.

3.4 Proteinexpressionsmuster der Tumorproben

3.4.1 Isolierung von Proteinen aus Gefrierproben

Die Isolierung von Proteinen aus Gefrierproben erfolgte nach der Gefrier-Tau-Methode. Dazu wurden 10 jeweils 20 μ m dicke Gefrierschnitte in 300 μ l Bradford-Lysepuffer aufgelöst. Durch viermaliges Gefrieren in Trockeneis und wieder Auftauen der Proben konnten die Zellen lysiert werden. Nach Zentrifugation (15 min, 13000 rpm) bei 4 °C wurde die Konzentration der gewonnenen Proteine nach der Bradford-Methode bestimmt. Dazu wur-

den in Einmalküvetten jeweils 800 μl Wasser mit 200 μl Bradford Assay gemischt und 5 μl der Proteinlösung hinzu gegeben. Nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur schloss sich die Messung der Absorption bei 595 nm im Photometer an. Die Proteinkonzentration der einzelnen Proben konnte anhand einer zuvor angefertigten Eichkurve ermittelt werden. Die Proben wurden bis zur Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte mit einem fertig gelieferten Gradienten-Gel der Firma Nuagen. Als Laufpuffer wurde MES-Puffer verwendet, hergestellt aus 20x Stammlösung (Invitrogen). Die Proteine wurden mit 7 μl Sample Buffer und 3 μl DTT versetzt und für 5 min bei $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ denaturiert. Anschließend wurden diese auf das Gel aufgetragen und bei 200 V für ca. 60 min aufgetrennt. Zur Größenbestimmung diente ein mitgeführter Protein-Molekulargewichtsstandard (SeeBlue Plus2, Invitrogen).

3.4.3 Western Blotting

Nach Auftrennung der Proteine im Gradienten-Gel erfolgte die Übertragung auf eine PVDF-Membran mit Hilfe der Tank-Blot-Methode im Miniblotter (Biometra, Göttingen). Zunächst wurden die Geltaschen vorsichtig abgetrennt und das Gel anschließend in Transferpuffer (hergestellt aus 20xTransferpuffer und 10 % Methanol, Invitrogen) wenige Minuten präinkubiert. Die Membran musste vor dem Blotting für 1 min in 98 % Methanol aktiviert werden.

Auf die schwarze Seite der Tank-Blot-Kassette wurde ein in Transferpuffer getränktes Stück Schwamm, ein Stück Filterpapier, das Bis-Tris-Gel, die PVDF-Membran, gefolgt von Filterpapier und Schwamm luftblasenfrei geschichtet. Die Proteine transferierten dann bei 300 mA für ca. drei Stunden auf die PVDF-Membran.

3.4.4 Färbung mit spezifischen Antikörpern mittels Immunblotting

Die Membran wurde zur Blockierung unspezifischer Bindungen für 1 h in 10 ml 10 % Milchpulver in PBS-Tween unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe des jeweiligen Primärantikörpers in 10 ml 10 % Milchpulver mit PBS-T über Nacht, wiederum unter leichtem Schütteln im Kühlschrank. Nach viermaligem Waschen für 5 min mit PBS-T wurde der sekundäre, mit Peroxidase konjugierte Antikörper in 10 ml 10 % Milchpulver mit PBS-T dazugegeben und bei Raumtemperatur unter Schütteln für 1 h inkubiert. Die Membran wurde nun nochmals viermal für 5 min mit PBS-T und einmal mit PBS gewaschen. Zum Nachweis der Antikörperbindung wurde das ECL Western Blotting Detecting System (Firma GE Healthcare) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die beiden Lösungen wurden zu gleichen Anteilen (jeweils 5 ml) gemischt und die Membran damit 1 min lang benetzt. Bei der Verwendung des MDMX-Antikörpers wurde ECLplus verwendet. Hierfür erfolgte die Benetzung der Membran nach Mischung der Solution A mit Solution B im Verhältnis 40:1 für 5 min. Der Blot wurde dann auf beiden Seiten mit Overhead-Folie belegt und in der Dunkelkammer für 20 sec bis 2 min auf einen Kodak Biomax MR Röntgenfilm gelegt. Die Entwicklung erfolgte in einem Hyperprocessor Röntgenfilmentwickler (Amersham). Die Auswertung der Intensität der Banden erfolgte densitometrisch. Es wurde die Software des BioDocAnalyze Imagemasters (Bio-metra) genutzt.

3.5 Klonieren der Transkriptvarianten in pcDNA3.1(-)-Vektor

Für folgende Versuche wurden die zuvor isolierten Plasmide (siehe Abschnitt 2.3) verwendet. Nach Analyse der detektierten MDMX-Isoformen wurden zwei interessante Varianten zur Charakterisierung ausgewählt. Das Full-length MDMX-Transkript wurde als Positiv-Vergleich stets mitgeführt.

3.5.1 Markierung der Isoformen mit Hämagglutinin

Hierzu wurden die zuvor in den Vektor pCR2.1 ligierten Spleißvarianten mit spezifischen Primern vervielfältigt (Tab. 3.5 und 3.6). Der Forward-Primer enthielt am N-terminalen Ende die Sequenz für einen Haemagglutinin (HA)-Tag, womit die spätere Detektion des Proteins erfolgte. Ein vorgeschaltetes Startcodon integrierte den HA-Tag in den Leserahmen. Vor dem Startcodon lag die spezifische Sequenz für das Enzym *XbaI*. Der Reverse-Primer wurde so gewählt, dass dieser außerhalb des Leserahmens bindet. Dieser Primer ist ubiquitär einsetzbar, da die ausgewählten Transkript-Varianten C-terminal keine Leserahmenverschiebung aufweisen. Zusätzlich enthält er die Enzymschnittstelle *NotI* mit entsprechender Puffersequenz. Die Enzymschnittstellen *XbaI* und *NotI* sind Äquivalent im Vektor pcDNA3.1 enthalten, damit ist die gerichtete Klonierung des Fragmentes in den Vektor möglich.

Tabelle 3.5. Primer: Var6 HAXbaI (sense)

5' Puffer -	<i>XbaI</i> -	HA-Tag -	Primer 130 sense 3'
TCATCA	TCTAGA	ATGTACCCATACGACG TACCAGACTACGCA	TTCACTGTTAAAG AGGTCATGC

Tabelle 3.6. Primer: Var6 HANotI (antisense)

5' Puffer-	<i>NotI</i> -	Primer 445 antisense 3'
TGA TGA	GCG GCC GC	T GTG CTG GAA TTC GCC CTT A

Tabelle 3.7. Reagenzien PCR mit HA-Tag

Reagenz	25 µl Ansatz
iProof Master Mix (Biorad)	12,5 µl
Primer forward	0,25 µl
Primer reverse	0,25 µl
Plasmid	0,75 µl
Aqua bidest	11,25 µl

Tabelle 3.8. PCR-Programm (HA-Tag) mit 30 Zyklen

Zyklus	Programm	Temperatur	Zeit	Wiederholung
1.	Initial Denaturation	98 °C	30 sec	
2.	Denaturation	98 °C	10 sec	
3.	Annealing	71 °C	30 sec	
4.	Extension	72 °C	30 sec	30x 2.-4.
5.	Final Extension	72 °C	10 min	

Die Produkte wurden in 1 % Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und unter Nutzung der Software des BioDocAnalyze Imagemasters (Biometra) analysiert. Die Extraktion der DNA aus dem Agarosegel wurde laut Anleitung (Fa. Qiagen) durchgeführt. Die gewonnene DNA wurde in 50 μ l EB-Puffer aufgenommen.

3.5.2 Enzymverdau

Für die Ligation des Vektors mit dem PCR-Produkt musste der primär zirkulär vorliegende Vektors pcDNA3.1- linearisiert werden. Dafür wurde sowohl der Vektor als auch das PCR-Produkte (Tab. 3.9) jeweils mit den Enzymen *Xba*I und *Not*I bei 37 °C für ca. 3 h inkubiert. Zum Beenden der Reaktion wurden die Enzyme bei 80 °C für 20 min hitzeinaktiviert. Anschließend wurde das Vektorprodukt auf 1 % Agarosegel aufgetragen, die darauffolgende Gelextraktion wurde laut Anleitung der Firma Qiagen durchgeführt. Das gefällte Vektor-Produkt wurde in 50 μ l EB-Puffer aufgenommen. Die Extraktion der DNA aus dem Agarosegel wurde laut Anleitung der Firma Qiagen durchgeführt. Die gewonnene DNA wurde in 50 μ l EB-Puffer aufgenommen.

3.5.3 Ligation

Die Ligation (New England Biolabs) des Produktes erfolgte mit Hilfe des Sticky-End-Prinzips. Die gewählten Enzymschnittstellen sind sowohl im PCR-Produkt als auch im

Tabelle 3.9. Enzymverdau von pcDNA3.1(-) und Transkriptvariante

Reagenz	Vektor pcDNA3.1(-)	PCR-Produkt gereinigt
Produkt	3 μ l	15 μ l
Enzym <i>NotI</i>	3 μ l	3 μ l
Enzym <i>XbaI</i>	3 μ l	3 μ l
2xTANGO 10xPuffer	6 μ l	6 μ l
Aqua bidest	15 μ l	3 μ l
Gesamtvolumen	30 μ l	30 μ l

Vektor pcDNA3.1(-) enthalten. Der Ansatz für 20 μ l wurde nach folgendem Ansatz pipettiert und über Nacht bei 16 °C inkubiert.

Tabelle 3.10. Ligationsansatz: pcDNA3.1(-) und Transkriptvariante

Reagenz	20 μ l Ansatz
10xT4-Ligase Puffer	2 μ l
pcDNA3.1(-)linearisiert	4 μ l
verdautes PCR-Produkt	12 μ l
T4-Ligase	1 μ l
Aqua bidest	1 μ l

3.5.4 Transformation in *E. coli*-Zellen

Im Anschluss an die Ligation der Sticky Ends wurde das Produkt in *E. coli* TOP 10 kompetente Zellen transformiert. Dazu wurde 2 μ l Ligationsansatz vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 30 °C wurde der Ansatz mit 250 μ l SOC-Medium (Raumtemperatur) versetzt und 1 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Diesem Schritt folgend wurden 50 μ l Ansatz auf LB-Platten (100 mg/ml Ampicillin) ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

3.5.5 MIDI-Prep (endotoxinfrei)

Die Isolierung der Plasmide erfolgte mit dem MIDI-Prep Kit der Firma Qiagen. Dazu wurde jeweils ein Klon gepickt und in 5 ml LB-Medium (0,05 % Ampicillin) als Startkultur für 8 Stunden bei 37 °C 200 rpm inkubiert. Zur Kontrolle der Plasmid-Produkte wurde eine Kolonie-PCR mit folgenden Primern durchgeführt:

Tabelle 3.11. pcDNA3.1(-) Sequenzierungsprimer

Primer	Orientierung	Sequenz
pcDNA3.1(-)	sense	CTT GGC AGT ACA TCT ACG
pcDNA3.1(-)	antisense	CAT GCC TGC TAT TGT CTT CC

Danach erfolgte die Über-Nacht-Kultur in 200 ml Flasketten mit 50 ml LB-Medium (0,05 % Ampicillin), versetzt mit 1 ml Startkultur, bei 37 °C und 300 rpm. 24 h später wurden die Zellen geerntet mittels Zentrifugieren bei 4 °C und 6000 rpm. Nachfolgend konnte die Plasmid-DNA mit dem MIDI-Prep Kit (Qiagen) wie folgt isoliert werden:

- Pellet in 4 ml P1-Puffer (mit RNase, gekühlt) resuspendieren
- 4 ml P2-Puffer dazugeben, 6x invertieren
- 4 ml P3-Puffer (vorgekühlt) hinzu, nicht auf Eis inkubieren
- Lysat auf Qiagen-Filter geben, Spitze unten zu, 10 min bei RT inkubieren
- Lysat mittels Stopfen in 15 ml Falcon-Röhrchen drücken
- bei ca 10 ml Lysat 1 ml ER-Puffer hinzu, 10x invertieren und 30 min auf Eis inkubieren
- Säule (Qiagen-Tip100) mit 4 ml QBT-Puffer equilibrieren, freier Durchfluss
- Filterlysat auf die Säule geben, freier Durchfluss
- waschen der Säule mit 2x10 ml QC-Puffer
- eluieren der Plasmid-DNA mit 5 ml QN-Puffer
- fällen der DNA: 3,5 ml Isopropanol (RT) mixen und bei über 15000 rpm, 4 °C 30 min zentrifugieren; Überstand verwerfen

- waschen der DNA: 2 ml 70 % Ethanol (aus Kit) endotoxinfrei hinzu, bei über 15000 rpm, 4 °C 10 min zentrifugieren

Die DNA wurde zum Schluss in 500 μ l endotoxinfreiem TE-Puffer aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

3.6 Zellkultur

Die verwendete Mammakarzinomzelllinie MCF-7 wurde mit DMEM Medium bei 5 % CO₂ und maximaler Luftfeuchte bei 37 °C als adhärenente Monolayer-Kulturen herangezogen. Die Passagierung konfluenter Zellen erfolgte im Verhältnis 1:2. Dafür wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 3 ml PBS gewaschen. Es folgte die Inkubation der Zellen mit 1 ml Trypsin-Lösung für 5 min bei 37 °C. Die abgelösten Zellen wurden in 6 ml Zellkulturmedium aufgenommen und je 3 ml in eine neue Zellkulturflasche überführt. Zum Einstreuen der Zellen wurden diese nach dem Ablösen mittels Trypsin-Lösung in 3 ml Zellkulturmedium gegeben und 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Zellkulturmedium aufgenommen. Die Zelldichte ist am Coulter Zellzählgerät ermittelt worden. Zur Kryokonservierung wurde das nach dem Zentrifugieren erhaltene Zellpellet in 1,8 ml Gefriermedium (DMEM mit 20% DMSO) aufgenommen und in ein 2 ml Gefrierrohrchen überführt. Die Lagerung erfolgte für 24 h bei -20 °C, 24 h bei -80 °C und anschließend in flüssigem Stickstoff zur Langzeitlagerung. Zum Auftauen der Zellen wurde das Gefrierrohrchen kurz in 37 °C warmes Wasser gegeben, dann der Inhalt rasch in 4 ml des Zellkulturmediums überführt und die Zellen zentrifugiert. Das Zellpellet wurde erneut in 4 ml Zellkulturmedium aufgenommen und zentrifugiert, um das für Zellen toxische DMSO herauszuverdünnen. Anschließend wurde das Zellpellet in 3 ml Zellkulturmedium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche überführt.

3.7 Transfektion der Zelllinie MCF-7

Die Transfektionsexperimente erfolgten in 6 cm durchmessenden Zellkulturplatten. In diese wurden jeweils 300.000 Zellen pro Platte eingestreut und 24 h bei 37 °C/5 % CO₂ inkubiert. Nach einem Mediumwechsel erfolgte die Transfektion mit FuGene-Transfektionsreagenz (Firma Roche). Dafür wurde pro Zellkulturplatte 100 µl Optimem-Medium mit 7,5 µl Fugene, 1 µg Plasmidkonstrukt sowie 2,5 µg pcDNA3.1(-) vorsichtig gemischt und bei Raumtemperatur 20 min inkubiert. Die Zugabe des Leervektors pcDNA3.1- führt zu einer besseren Transfektionseffizienz. Danach wurde das Reagenz auf die Zellen getropft und die Zellkulturplatten 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

3.7.1 Proteinisolierung aus Zellen

Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Zellkulturplatten auf Eis gelagert. Nach zweimaligem Waschen mit 5 ml eiskaltem PBS wurde 1 ml Giordano-Lysepuffer, versetzt mit Proteaseinhibitor im Verhältnis 1:100, hinzugegeben und bei 4 °C für 10 min inkubiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei ebenfalls 4 °C und 6000 rpm konnte der Überstand abpipettiert werden. Mit Hilfe der Bradfordmethode wurde die Absorption bei 495 nm gemessen werden und die Proteinkonzentration anhand einer Standardkurve berechnet.

3.7.2 Behandlung der Zellen mit cis-Platin

Für die Behandlung der Zellen mit dem Zytostatikum cis-Platin (10 µM) wurden die Zellen, wie zuvor beschrieben, 24 h vor der Transfektion in 6 cm Zellkulturplatten eingestreut und weitere 24 h danach mit 10 µM cis-Platin behandelt. Die Proteinisolierung erfolgte mit Giordano-Lysepuffer wie bereits in 3.7.1 beschrieben.

4 Ergebnisse

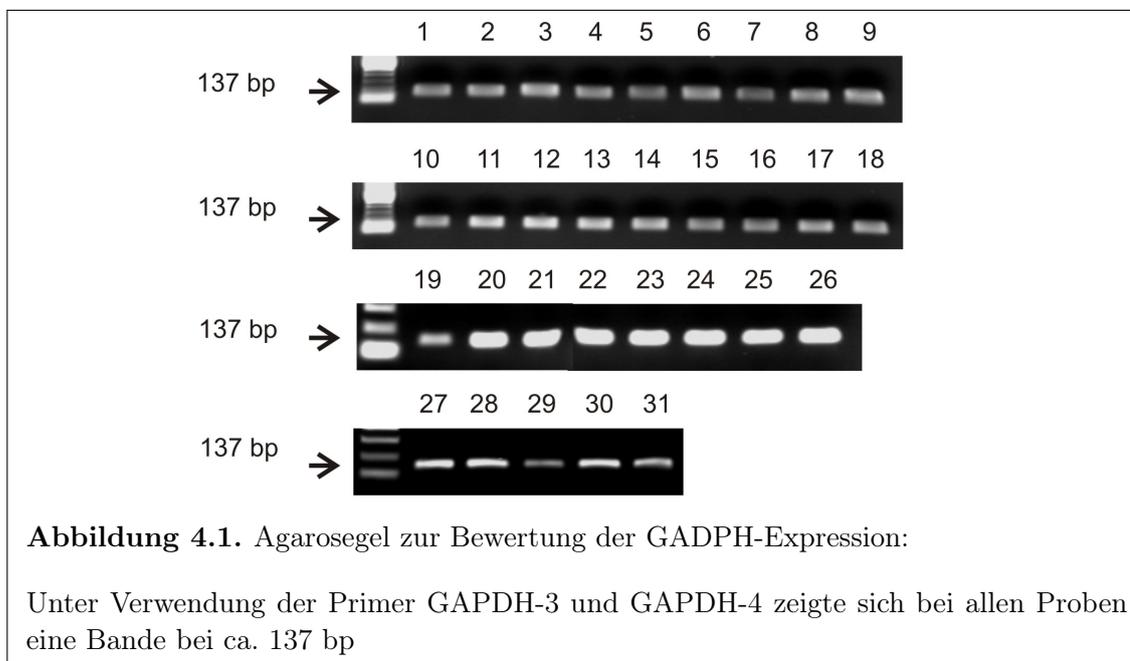
Nach Publikation der MDMX-S-Variante konnte Jochemsens Arbeitsgruppe 2001 (Ramos *et al.*, 2001) weitere Transkriptvarianten des MDMX-Gens in Tumor-Zelllinien nachweisen. Durch Vorarbeiten in unserem Labor gelang es zusätzlich neue Varianten in Ovariakarzinomzelllinien zu detektieren (unpublizierte Daten). Es sollte daher die Frage geklärt werden, ob auch in ovariellen Tumorgeweben Spleißvarianten der MDMX-mRNA nachweisbar sind. Für die Analyse stand Tumorgewebe von 31 Patientinnen zur Verfügung. Aus diesem wurde die Gesamt-RNA isoliert und mittels PCR untersucht.

4.1 Expression der MDMX-mRNA in Gewebeproben

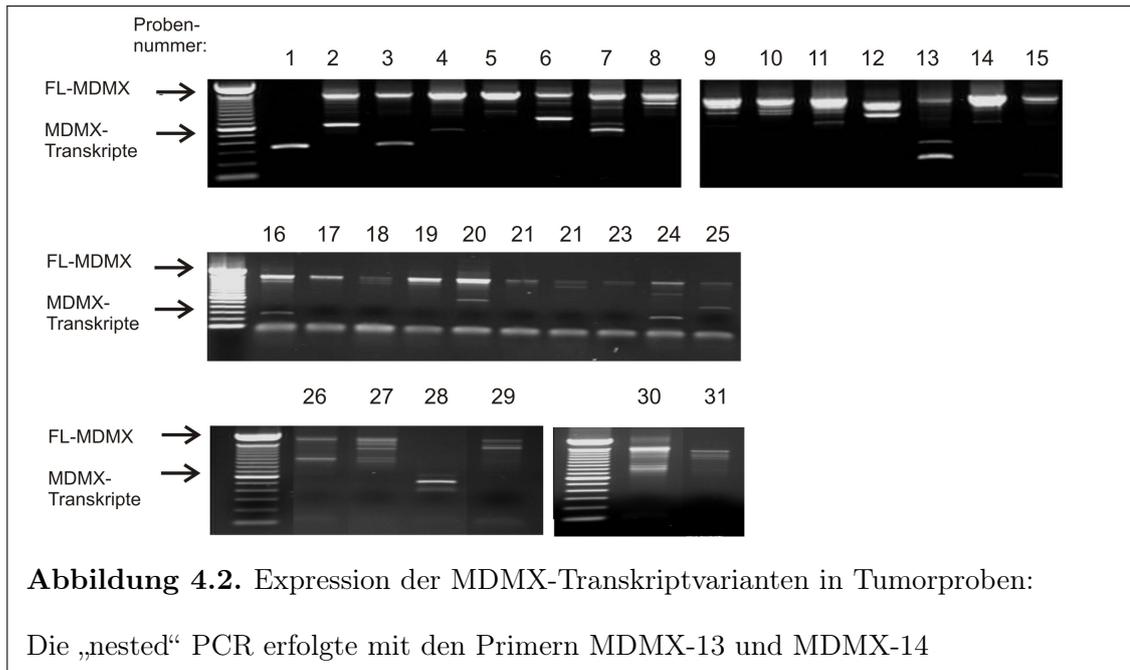
Die extrahierte RNA wurde zunächst in cDNA umgeschrieben und dann mittels spezifischer Primer für MDMX amplifiziert. Zur Vermeidung von Artefakten bei der reversen Transkription wurde ein AMV First-Strand cDNA Synthesis Kit, (Fa. Invitrogen) verwendet. Damit konnte bei höheren Temperaturen transkribiert werden. Für den Nachweis der MDMX-Transkripte in den Tumorgeweben wurden zunächst die Primer MDMX-11 und MDMX-12 ausgewählt, die den gesamten Teil des kodierenden Bereichs der mRNA überspannen. Anschließend wurde eine „nested“ PCR durchgeführt. Die dafür verwendeten Primer MDMX-13 und MDMX-14 binden innerhalb der von den Primern MDMX-11 und MDMX-12 amplifizierten Sequenz. Dadurch gelang es auch, Transkripte nachzuweisen, die in sehr geringer Kopienzahl vorkommen. Die PCR-Produkte wurden anschließend in einem Agarosegel aufgetrennt.

4.1.1 Expression der verkürzten MDMX-Transkripte

Mittels der beschriebenen „nested“ PCR zum Nachweis der MDMX-mRNA Expression konnten die 31 Proben von Ovarialkarzinom-Patientinnen untersucht werden. Bei 30 von 31 Proben war eine Bande, die dem FL-Transkript entsprach, mit einer Größe von 1200 bp nachweisbar. Die Integrität der Gesamt-RNA wurde durch den Nachweis der Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase-mRNA (GADPH-mRNA) (Abb. 4.1) überprüft. In allen Fällen war ein PCR-Produkt in der erwarteten Länge detektierbar.

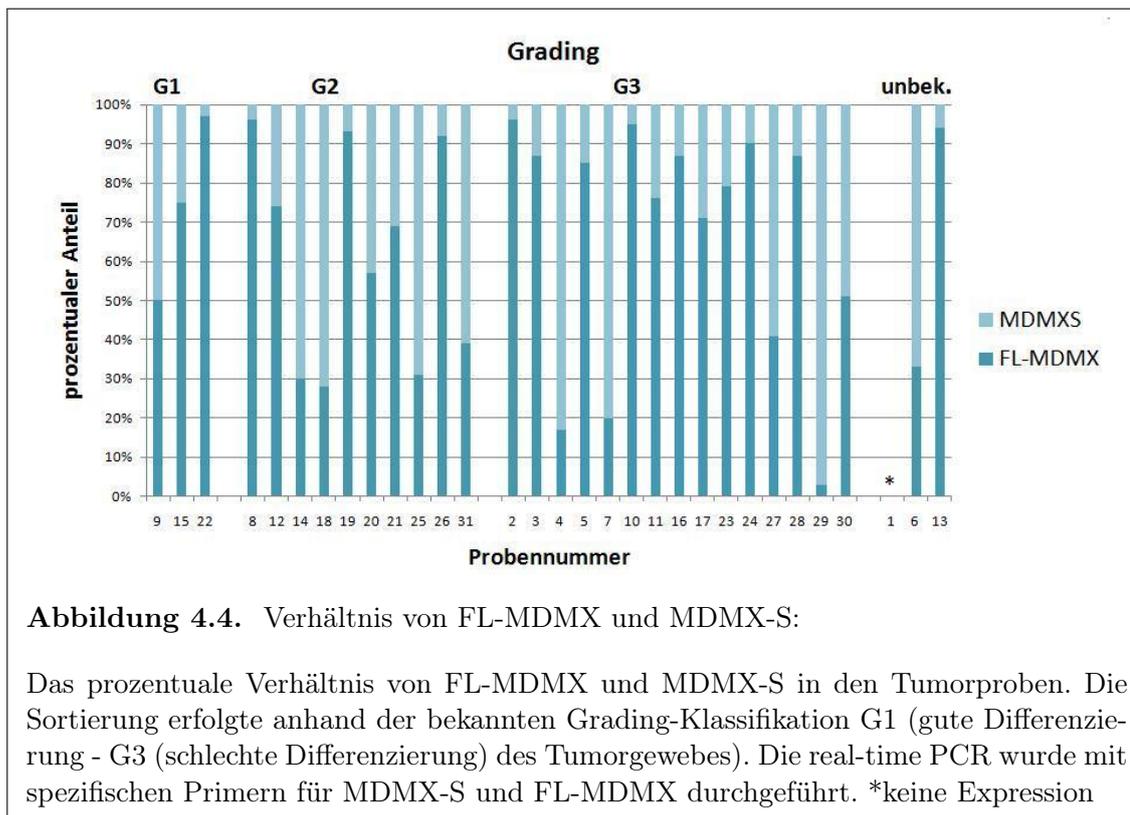
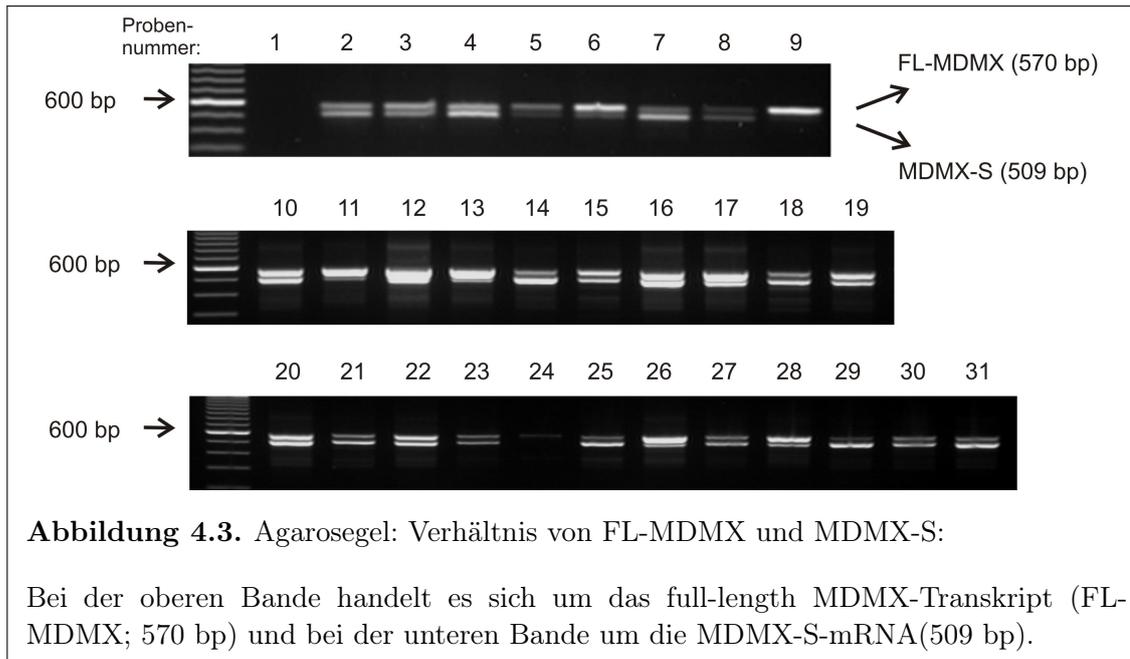


Neben der Bande, die das FL-Transkript darstellt, wurden in 26 von 31 Tumorproben zusätzliche Banden detektiert. Im überwiegenden Teil der Proben wies die FL-Bande die stärkste Intensität auf. In 5 Tumorproben war eine der kürzeren Bande stärker in ihrer Intensität (Proben 1; 6; 12; 13 und 30)(Abb. 4.2). Die durchgeführten PCR-Analysen erlauben allerdings keine Aussagen bezüglich der Mengenverhältnisse der Spleißformen zur FL-mRNA. Es ist denkbar, dass die kürzeren Transkripte, bei gleicher Synthesezeit, effektiver amplifiziert werden als das FL-MDMX Fragment. Zur gezielten Darstellung der Relation einzelner Transkriptvarianten sind quantitative Analysen notwendig.



4.1.2 Expression von MDMX-S

Die 1999 von Rallapalli *et al.* erstmals publizierte Variante MDMX-S wurde in den letzten Jahren umfassend charakterisiert. Mit Hilfe spezifischer MDMX-Primer kann das FL-MDMX/MDMX-S Verhältnis sehr gut dargestellt werden. In Probe 1 konnte auch nach „nested“ PCR kein MDMX bzw. MDMX-S nachgewiesen werden. Bei vorhandenem FL-MDMX konnte in den Proben 9 und 24 kein MDMX-S detektiert werden. Alle anderen Proben exprimieren FL-MDMX und MDMX-S zu unterschiedlichen Anteilen. In 10 von diesen 30 Proben war die Intensität der MDMX-S Bande stärker im Vergleich zum FL-Transkript (4; 7; 14; 18; 21; 25; 27; 29; 30 und 31).



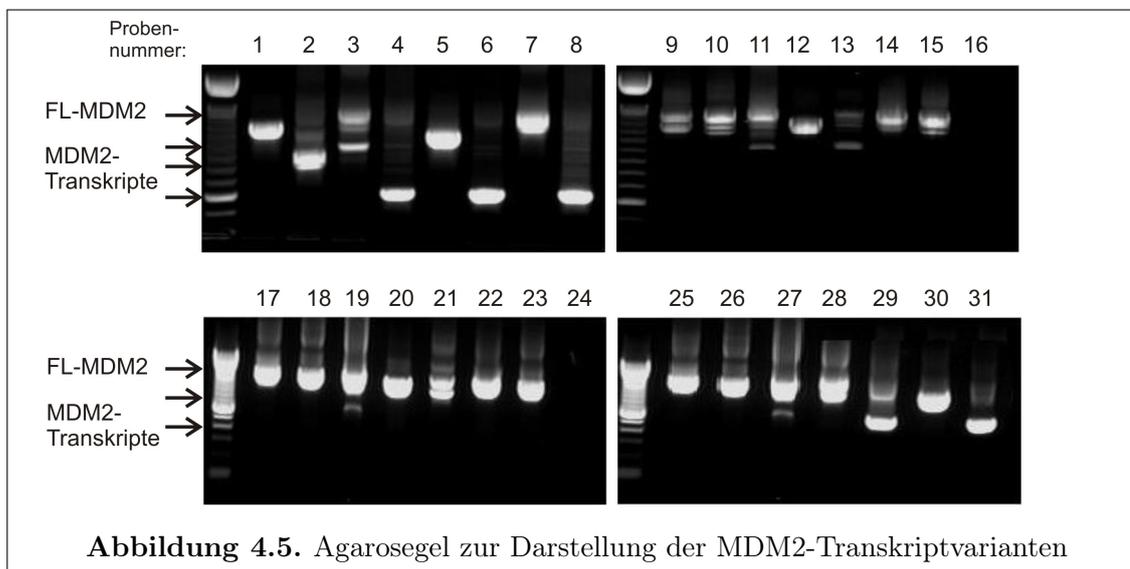
Da die Auftrennung im Agarose-Gel nur einer semiquantitativen Darstellung entspricht, wurde eine Quantifizierung mittels real-time PCR durchgeführt (Abb. 4.4).

Eine Übereinstimmung der visualisierten Bandenstärken mit den RT-PCR-Daten fand

sich in 14 der 31 Proben (1; 5; 6; 7; 11; 13; 14; 18; 20; 25; 26; 28; 29 und 31) (Vgl. 4.3). In Bezug auf die Differenzierung der Tumorproben konnte, soweit diese bekannt waren, keine Korrelation gesehen werden (Vgl. Abb. 4.4).

4.2 Expression der MDM2-Transkripte

Die aus dem Tumorgewebe gewonnene RNA wurde analog zu Kap. 4.1 in cDNA umgeschrieben und mit Hilfe der MDM2-spezifischen Primer MDM2-5 und MDM2-6 in einer PCR amplifiziert. Nach einer „nested“ PCR mit den Primern MDM2-1 und MDM2-8a wurden die PCR-Produkte in einem Agarosegel aufgetrennt. Auffällig war, dass eine Vielzahl von Tumorproben bedeutend weniger FL-MDM2 als kürzere MDM2-Transkripte exprimieren. In Probe 1, die nachweislich kein FL-MDMX exprimiert (Abb. 4.2 und 4.4), ist jedoch eine kräftige FL-MDM2 Bande zu erkennen. In den Proben 16 und 24 konnte selbst nach einer „nested“ PCR keine MDM2-mRNA detektiert werden.



4.3 p53-Expression und Mutationsstatus

Im gleichen Verfahren, wie bereits in Kapitel 4.1 erläutert, wurde die RNA des Tumormaterials der Proben 1-25 in cDNA umgeschrieben. Nach Amplifikation mit den p53-spezifischen Primern p53-1 und p53-2, sowie einer „nested“ PCR mit dem Primerpaar p53-3a und p53-4a erfolgte anschließend die Sequenzierung.

Tabelle 4.1. p53-Mutationsstatus in den Ovarialkarzinomproben

Fall	Exon	Codon	Typ	Austausch	wt	mt	wt-AS	mt-AS
1	6	213	Missense	G>T	CGA	CTA	Arg	Leu
2	5	172	Missense	G>T	GTT	TTT	Arg	Leu
4	8	273	Missense	G>A	CGT	CAT	Arg	His
5	8	264	Missense	T>C	CTA	CCA	Leu	Pro
7	5	153	Deletion	-C				
8	8	266	Missense	T>C	GGA	AGA	Gly	Arg
10	7	244	Missense	G>T	GGC	TGC	Gly	Cys
11	7	241	Missense	C>A	TCC	TAC	Ser	Tyr
12	6	220	Missense	A>G	TAT	TGT	Tyr	Cys
13	4	36	SNP	G>A	CCG	CCA	Pro	Pro
	8	275	Missense	G>A	TGT	TAT	Cys	Tyr
16	7	257	Deletion	-C	CTG		Leu	Stop
18	5	134	Missense	T>C	TTT	TTC	Phe	Leu
20	5	134	Missense	T>C	TTT	CTT	Phe	Leu
21	5	134	Missense	T>C	TTT	CTT	Phe	Leu
22	7	241	Missense	C>T	TCC	TTC	Ser	Phe
23	7	241	Missense	C>T	TCC	TTC	Ser	Phe
	7	241	Missense	C>T	TCC	TTC	Ser	Phe
25	5	127	Missense	C>T	TCC	TTC	Ser	Phe
	7	241	Missense	C>T	TCC	TTC	Ser	Phe

wt-Wildtyp; mt-Mutation; AS-Aminosäure; G-Guanin; T-Thymin; C-Cytosin; A-Adenin; Arg-Arginin; Leu-Leucin; His-Histidin; Val-Valin; Phe-Phenylalanin; Pro-Prolin; Gly-Glycin; Cys-Cystein; Tyr-Tyrosin

Bei den Tumorproben 26-31 wurde die genomische DNA amplifiziert. Die Sequenzanalyse fokussierte sich auf die Exons 4-8, da hier der Großteil funktioneller Mutationen zu finden ist (Okamoto *et al.*, 1991).

Es ist schon lange bekannt, dass in ca. 50 % der Tumoren p53-Mutationen zu finden sind (Hollstein *et al.*, 1991; Hainaut *et al.*, 2000). In diesem Tumorkollektiv konnte in ca. 2/3 der Tumorproben (20/31) eine p53-Mutation detektiert werden (Tab. 4.1). Interessant

ist die Frage, ob es einen Zusammenhang zwischen dem p53-Mutationsstatus und dem Spleißen von MDMX gibt. 7 von 9 Tumorproben, in denen der Anteil von MDMX-S prozentual höher war als der von FL-MDMX (Proben 4; 6; 7; 14; 18; 25; 27; 29; 31), wiesen zusätzlich eine Mutation von p53 auf (Abb. 4.4, Tab. 4.1). Diese Beobachtung kann in dieser Arbeit nicht als signifikant beurteilt werden, da auch ein Großteil der Proben mit einem niedrigem Verhältnis MDMX-S/FL-MDMX ein mutiertes p53 aufweist.

4.4 Klonierung und Sequenzierung der MDMX-Transkripte

84 % der untersuchten Tumorproben zeigen nach einer PCR mit MDMX-spezifischen Primern, zusätzlich zur full-length-Form der MDMX-mRNA, verkürzte Banden auf (Abb. 4.2). Bei jeder Tumorprobe wurden möglichst alle einzelnen Banden, die vermutlich verkürzte Transkripte der MDMX-mRNA repräsentieren, unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten, gereinigt und in einen Vektor (pcDNA2.1) kloniert. Die aus Übernachtskulturen isolierten Plasmide wurden anschließend sequenziert. Aus den 31 untersuchten Ovarialkarzinom-Proben konnten insgesamt 14 verschiedene Transkripte der MDMX-mRNA, einschließlich FL-MDMX und MDMX-S nachgewiesen werden. Davon sind 4 Formen (MDMX-A, MDMX-G, MDMX-ALT2 und MDMX211) bereits beschrieben worden (Graaf *et al.*, 2003; Giglio *et al.*, 2005). Die anderen 8 Formen wurden im Rahmen dieser Studie erstmalig detektiert, bezeichnet und charakterisiert.

4.4.1 Charakterisierung von Spleißvarianten der MDMX-mRNA

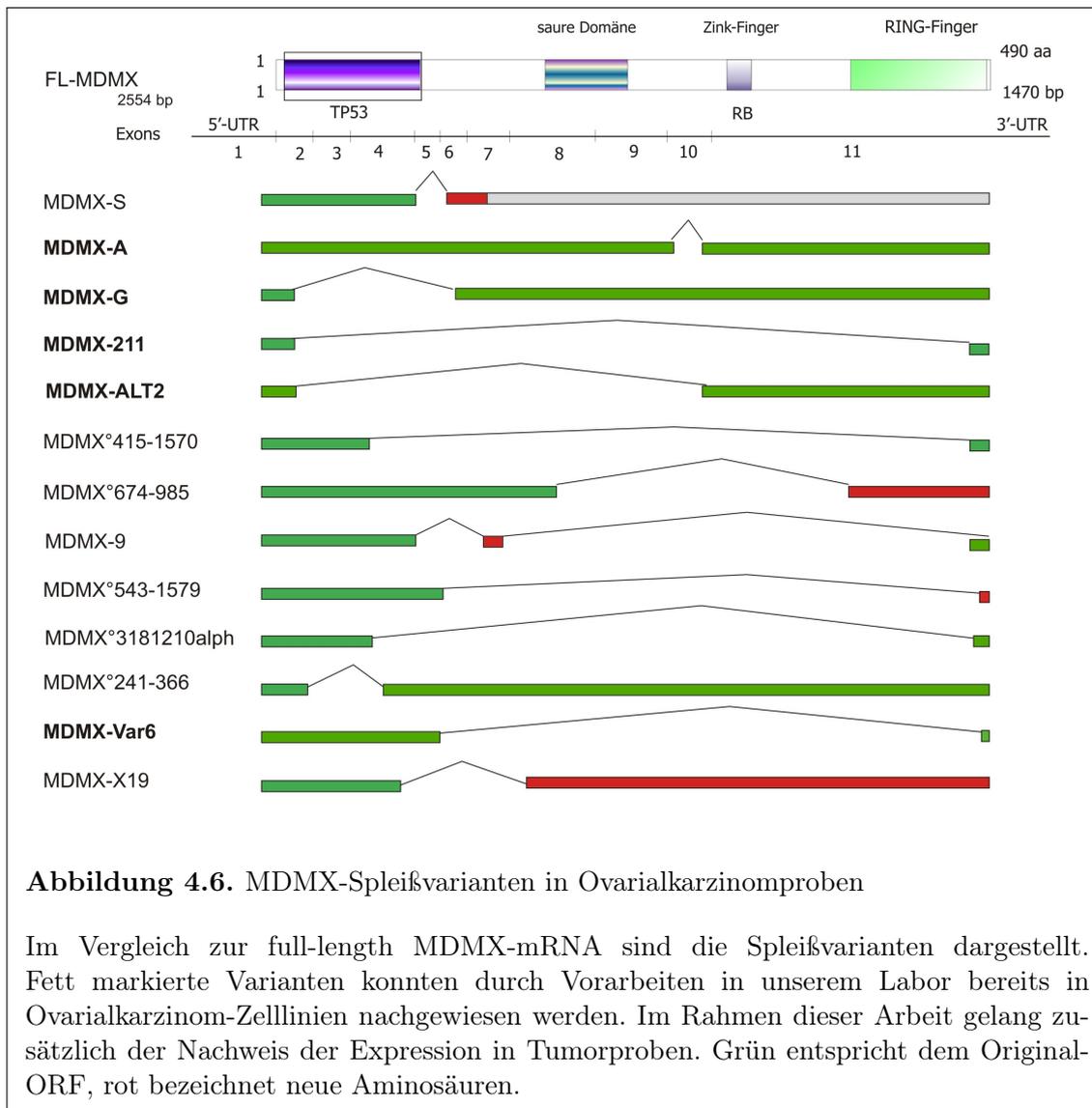
Die isolierten Plasmide, die die potentiellen kurzen Transkriptvarianten enthielten, wurden sequenziert und mit der Sequenz der FL-MDMX cDNA (GeneBank NM-002393) verglichen. Mit Hilfe der Software des Clone Managers und NCBI Blast Search (Altschul *et*

al., 1990) konnte ermittelt werden, welche Domänen in den Spleißformen noch vorhanden sind.

Wie bereits beschrieben, handelt es sich bei MDMX-A und MDMX-G um Transkriptvarianten, die erstmals in humanen epitheloiden Cervix-Karzinomzellen (C33A) identifiziert wurden sind (Vgl. Abb. 1.3), (de Graaf *et al.*, 2003). In Ovarialkarzinom-Zelllinien (OAW-42) gelang bisher der Nachweis von MDMX-G (Böhnke 2005, unveröffentlichte Daten). In dieser Arbeit konnten MDMX-A und MDMX-G in ovariellen Tumorproben nachgewiesen werden. Die Untersuchung der Patientenproben zeigte, dass jeweils MDMX-G und MDMX-A unabhängig voneinander in jeweils einer der 31 Tumorproben exprimiert werden.

Die Transkriptvariante MDMX211 wurde bereits in nichtkleinzelligen Lungentumoren und papillären Schilddrüsenkarzinomen detektiert (Giglio *et al.*, 2005; Prodosmo *et al.*, 2008). Auch in dieser Arbeit konnte MDMX211 in 3 von 31 Gewebeproben des Ovarialkarzinoms identifiziert werden.

Die Transkriptvariante MDMX-ALT2 entsteht durch Spleißen zwischen Exon 3 und Exon 10 der FL-MDMX-mRNA; dementsprechend fehlt dem resultierendem Protein MDMX-ALT2 die komplette p53-Bindungsstelle, das RING-Finger Motiv bleibt intakt (Abb. 1.3). Diese MDMX-Spleißvariante wurde bis jetzt in den Tumorzelllinien MCF-7, H1299 und U2OS beschrieben (Chandler *et al.*, 2006). In dieser Arbeit konnte erstmals MDMX-ALT2 in Tumormaterial detektiert werden (Abb. 4.6).



4.4.2 Charakterisierung erstmalig detektierter Spleißvarianten

Das Herausspleißen der Basenpaare 241-366 führt zum Verlust des Exons 3, die dementsprechend benannte Variante MDMX°241-366 wurde bislang noch nicht in der Literatur beschrieben. Der Leserahmen bleibt dabei erhalten (Abb. 4.6). In 2 der 31 Tumorproben konnte diese Variante detektiert werden.

Eine weitere Variante MDMX°543-1579 beruht auf einer Deletion der Basenpaare 543-1579 und einem daraus resultierten Verlust von Teilen des Exon 7 bis Exon 10 und dem

größten Teil von Exon 11. Das potentielle Protein enthält somit nur die p53-Bindungsdomäne. Der Leserahmens bleibt intakt; das reguläre Stopcodon der FL-MDMX-mRNA wird demnach verwendet.

Bei der Variante MDMX[°]674-984 kommt es durch die fehlenden Basenpaare 674-984 zum Verlust von Exon 7 bis Exon 10. Das gebildete Transkript kodiert für ein Protein mit vollständig erhaltener p53-Bindungsdomäne. Durch Leserahmenverschiebung entsteht ein neues Stopcodon im Exon 10. Das verkürzte Protein ohne RING-Finger hat somit auch nicht die Fähigkeit, mit MDM2 zu dimerisieren.

Der Variante MDMX-9 fehlt das komplette Exon 6; die ersten 25 Basenpaare von Exon 7 sind noch erhalten (Abb. 4.6). Auch bei dieser Variante kommt es zu einer Leserahmenverschiebung; die erste fehlende Sequenz des FL-MDMX-Transkripts entspricht der von MDMX-S. Die anschließende Deletion der Basenpaare 599-1452 hat eine erneute Leserahmenverschiebung zur Folge und das reguläre Stopcodon im Exon 11 wird verwendet.

Die Transkriptvariante MDMX[°]318-1210alpha weist ein außergewöhnliches Spleißmuster auf. Die Deletion der Basenpaare 318-1210 würde bei Translation zum vollständigen Verlust der p53-Bindungsdomäne führen. Interessanterweise befindet sich zusätzlich die Intronsequenz 12400-12659 bp des MDMX-Gens im gespleißten Bereich. Diese eingefügte Sequenz (alpha-Exon genannt) enthält nun das neue Startcodon. Bemerkenswert ist, dass es deshalb nicht zu einer Leserahmenverschiebung kommt. Die biologische Funktion dieses Proteins ist bislang noch unbekannt.

Tabelle 4.2. Charakterisierung der beschriebenen Transkriptvarianten

Spleiss-Variante	Sequenz 5'-3'	fehlende Sequenz (bp) des FL-Transkripts	Verschiebung Leserahmen	Tumorproben
MDMX-S	tacag-caaag	°506-573	ja	2-8;10-23;25-31
MDMX-A	ggatg-aagtg	°839-991	nein	20
MDMX-G	atcag-agcca	°241-488	ja	27
MDMX211	tcagg-aaaat	°242-1219	nein	6,7,21
MDMX-XALT2	gaggt-gattg	°318-986	nein	6
MDMX°415-1570	aacta-ctggg	°415-1570	nein	1
MDMX°674-984	agaag-gtgat	°674-984	ja	8,24
MDMX-9	tacag-caaag/ acttc-cagaa	°506-573/°599-1452	ja	3,4,8
MDMX°543-1579	cacag-catgc	°543-1579	ja	11,12
MDMX°318- 1210alpha	gaggt-tttat acaga-ctgaa	°318-1210/(+12400- 12659 MDMX-Gen)	nein	13
MDMX°241-366	atcag-cagga	°241-366	nein	6,7,21
MDMX-Var6	cactt-gtttt	°488-1540	nein	3,6,13
MDMX-x19	ccaag-gcaga	°450-579	ja	31

Erwähnenswert ist zusätzlich noch die Spleißvariante MDMX°415-1570, die in der Probe 1 der Ovarialkarzinome detektiert werden konnte (Abb. 4.2). In Abwesenheit von FL-MDMX und MDMX-S konnte nur dieses verkürzte Transkript gefunden werden. Die Variante MDMX°415-1570 hat, ähnlich dem MDMX-S-Protein, nur eine vollständige p53-Bindungsdomäne. Der Leserahmen bleibt jedoch intakt.

Die häufig detektierte Isoform MDMX-Var6, die Ähnlichkeiten zur Struktur von MDMX-S hat, wird in Kapitel 4.7 näher beschrieben. Diese noch nicht publizierte Spleißvariante konnte in 3 der 31 Ovarialtumoren nachgewiesen werden. Bei MDMX-Var6 handelt es sich um ein aberrant gespleißtes Transkript der MDMX-mRNA, d.h. das Spleißen erfolgt nicht an den Exon/Intron-Grenzen, sondern innerhalb von Exons (Abb. 4.6).

4.5 Variantenspezifische Primer

Nach Sequenzanalyse der PCR-Produkte und Identifizierung bereits bekannter bzw. neuer Spleißvarianten sollte eine schnelle und kostengünstige Methode gefunden werden, Transkriptvarianten in Tumorproben zu detektieren. Auf Grund der geringen Größenunterschiede der einzelnen Fragmente (Abb. 4.2), war es nicht möglich, die Banden im Agarosegel bereits bekannten Spleißvarianten zuzuordnen. Eine alternative Möglichkeit ist die Entwicklung spezifischer Primer. Variantenpepezifische Primer binden an den Spleißstellen und sind somit nicht in der Lage, an FL-MDMX bzw. an anderen Transkriptvarianten zu binden. Für die beschriebenen MDMX-Spleißvarianten (Abb. 4.2) wurden potentielle Primer entwickelt und getestet. Es wurde noch keine ausreichende Spezifität dieser Primer erreicht, um die Spleißvarianten aus Tumorproben identifizieren zu können. Zur Detektion der MDMX-Var6 gibt es jedoch aussichtsreiche Ergebnisse. Hierfür wurde der Primer MDMX499rev konzipiert. Die ausgewählten Oligonukleotide binden im neu entstandenen Übergang von Exon 5 zu Exon 11 in antisense Richtung. Neben der Mg^{2+} -Konzentration ist die Temperatur, bei der sich die Primer an den cDNA-Strang anlagern maßgeblich. Je höher die Temperatur ist, desto spezifischer lagert sich der Primer an (Abb. 4.7). Das Plasmid der nachgewiesenen Spleißvariante MDMX-Var6 zeigt bis in hohe Temperaturbereiche ein amplifiziertes Produkt. Das FL-MDMX Transkript ist als Negativkontrolle zu betrachten. Bei niedrigen Temperaturen ist durch das unspezifische Anlagern der Primer an das 3'-Ende von FL-MDMX noch ein Produkt zu sehen. Bei höheren Annealing-Temperaturen hingegen kann, der für diese Variante spezifische Primer, nicht mehr binden (Abb. 4.7-B). Die Spezifität des Primers MDMX499rev zur Detektion von MDMX-Var6 konnte somit bewiesen werden.

Anschließend sollte diese Transkriptvariante in Tumormaterial und Zelllinien mit Hilfe des Primers MDMX499rev identifiziert werden. Um eine höhere Kopienzahl der Transkripte

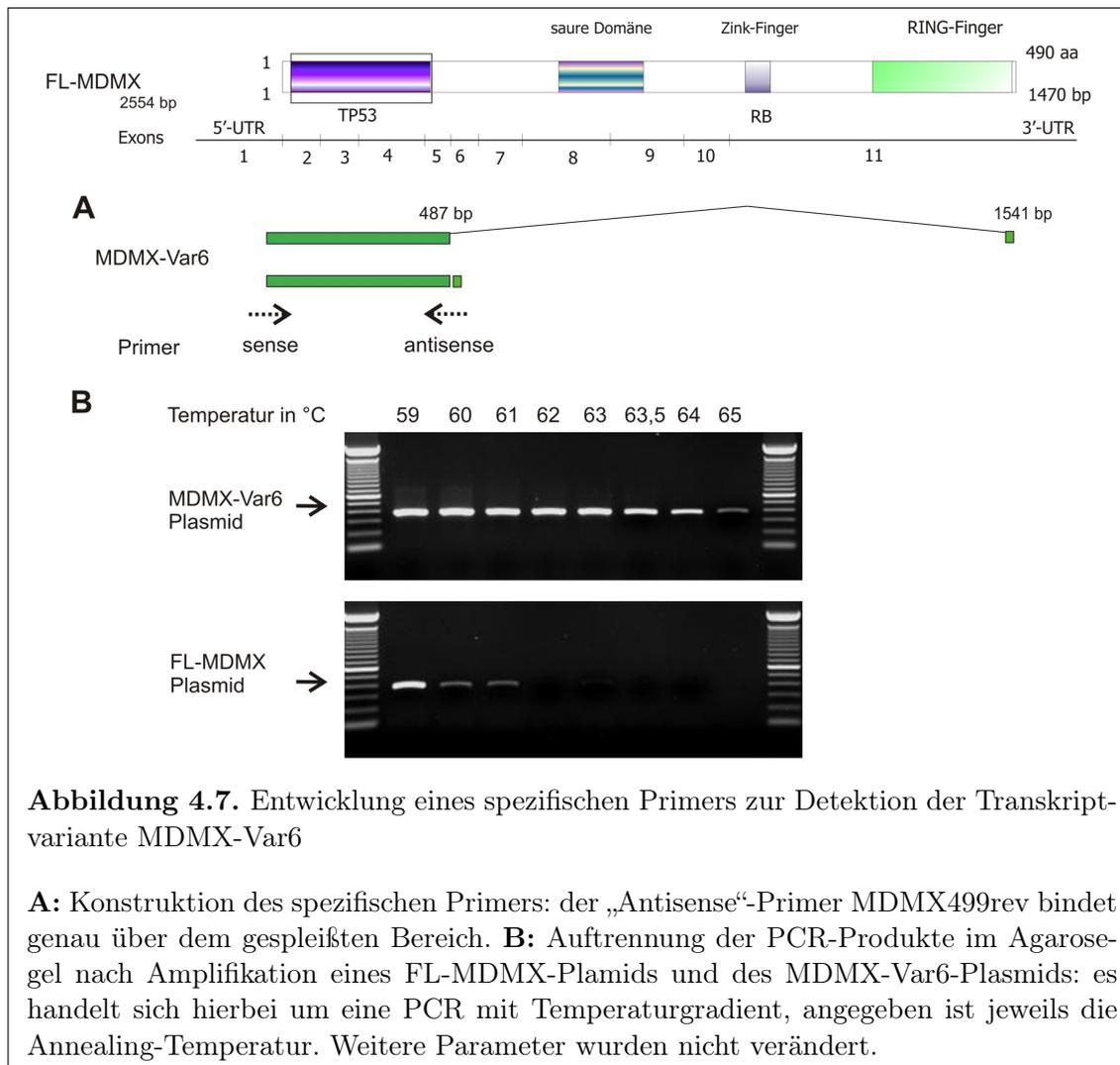
zu erreichen wurde die cDNA der 31 Tumorproben zunächst mit Primern amplifiziert, die den gesamten Leserahmen umfassen. Dem schloss sich die PCR mit einem „Sense“-Primer (MDMX-11 oder MDMX-13) und dem „Antisense“-Primer MDMX499rev an. In 1 der 31 Tumorproben (Probennummer 3) zeigte die Auftrennung im Agarosegel ein Produkt (Abbildung nicht gezeigt). Die Sequenzierung der ausgeschnittenen Banden (Abb. 4.6) ergab jedoch in 3 der 31 Proben (Probennummer 3,6 und 13) das Vorhandensein der Spleißvariante an. In zwei Fällen konnte dies demnach nicht verifiziert werden. Die gleiche Methode wurde bei Ovarialkarzinom-Zelllinien (OAW, SKOV3) angewendet. Allerdings konnte die Spleißvariante MDMX-Var6 in keiner der genannten Zelllinien durch den spezifischen Primer detektiert werden. Wahrscheinlich liegt die Ursache in den sehr niedrigen Kopienzahlen. Sequenzierungsanalysen aus Vorarbeiten zeigten bereits die MDMX-Var6 in Klonen der Zelllinie OAW (Abb. 4.6).

4.6 Untersuchung der p53-, MDMX- und MDM2-Proteinexpression in Tumorproben

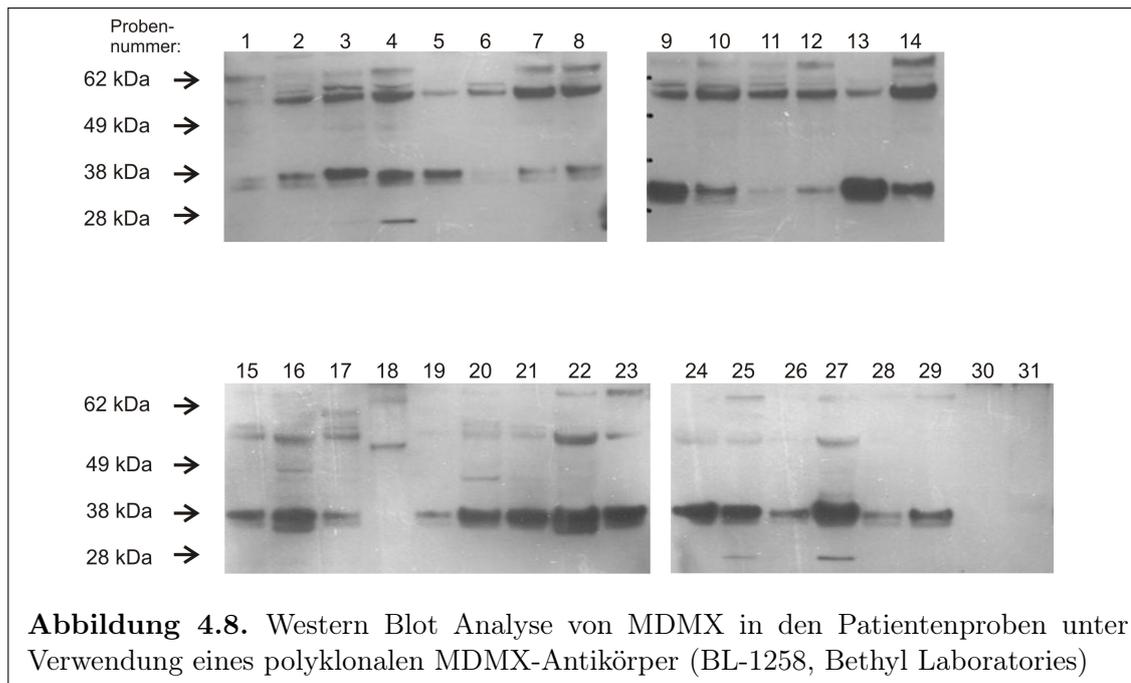
Durch Western-Blot Analysen konnte die Expression verschiedener Proteine in den Tumorproben untersucht werden. Als Ladekontrolle wurde immer die Expression von Vinculin analysiert.

4.6.1 Expression des MDMX-Proteins

Das Protein von FL-MDMX hat ein Molekulargewicht von 62 kDa und kann mit kommerziell erhältlichen Antikörpern detektiert werden. In den Tumorproben ist die dem FL-Protein entsprechende Bande bei 62 kDa häufig nur schwach sichtbar. Auffällig ist hingegen, dass sehr oft Banden zu erkennen sind, die auf größere und kleinere Proteine



schließen lassen. Der ausgewählte polyklonale MDMX-Antikörper (Klon BL-1258, Bethyl Laboratories) erkennt ein Epitop zwischen den Aminosäuren 125-175, im mittleren Bereich von MDMX. MDMX-Proteine, denen dieser Bereich durch Spleißen fehlt, haben somit keine Bindungsstelle und werden nicht detektiert.

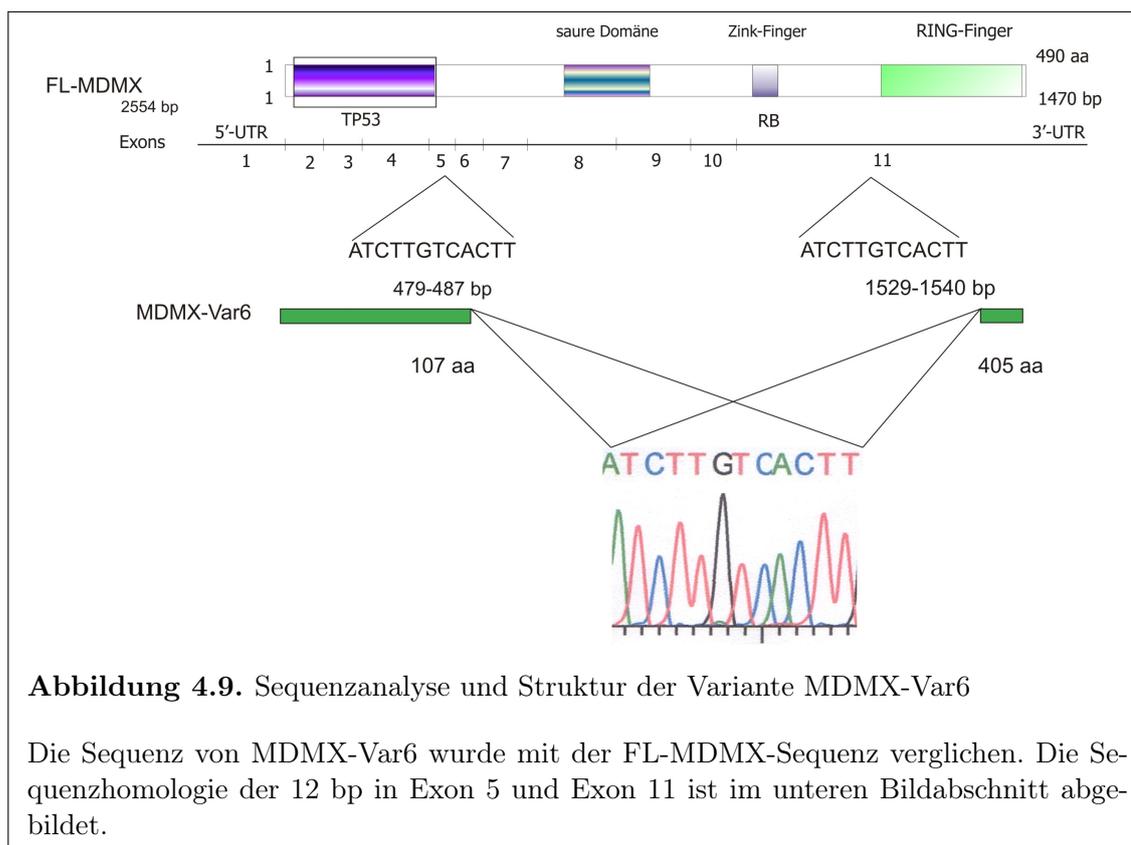


Die bekannte Transkriptvariante MDMX-S, sowie eine Reihe weiterer in dieser Arbeit beschriebener Isoformen, können mit diesem Antikörper nicht detektiert werden. Es ist unbekannt, ob die häufig sichtbaren Banden bei 38 kDa und ca. 49 kDa MDMX-Transkriptvarianten zuzuordnen sind. Es ist nicht möglich festzustellen, ob eine Bande in der PCR mit einer bestimmten Bande im Western Blot übereinstimmt. Die Daten können jedoch einen wichtigen Hinweis darstellen, dass MDMX-Isoformen in den ovariellen Tumorproben exprimiert und auch translatiert werden.

4.7 Charakterisierung der Transkriptvariante MDMX-Var6

Nach Analyse der neu identifizierten Transkriptvarianten von MDMX konzentrierte sich diese Arbeit auf eine Spleißvariante, die besonders häufig detektiert werden konnte. Wie bereits beschrieben, konnte die Variante MDMX-Var6 in insgesamt 3 der 31 Ovarialtumoren nachgewiesen werden (Tab. 4.2). Dieses aberrant gespleißte MDMX-Transkript weist einen sehr interessanten Spleißmechanismus auf. Die Spleiß-Donor- und Akzeptor-

stellen in Exon 5 und Exon 11 haben exakt die gleiche Sequenz. Hierbei handelt es sich um eine Sequenz, die eine Länge von 12 bp hat und zweimal in der MDMX-cDNA vorkommt (Abb. 4.9). Im MDM2-Gen treten solche Sequenzhomologien bis zu viermal auf (Bartel *et al.*, 2004). Die erwähnten Sequenzhomologien könnten demnach eine wichtige Rolle im Spleißvorgang der MDMX-mRNA spielen. Die Variante MDMX-Var6 setzt sich aus 107 Aminosäuren des 5'-Endes der kodierenden Region der FL-MDMX-mRNA und 35 Aminosäuren des 3'-Endes (Exon 11) zusammen. Der Leserahmen bleibt auch nach dieser Spleißsequenz intakt. Der Isoform MDMX-Var6 bleibt die vollständige C-terminale p53-Bindungsdomäne erhalten, wobei die N-terminale RING-Finger Domäne weitestgehend fehlt. Die zentrale Region mit dem Zink-Finger Motiv sowie die saure Domäne ist in diesem Protein nicht vorhanden.



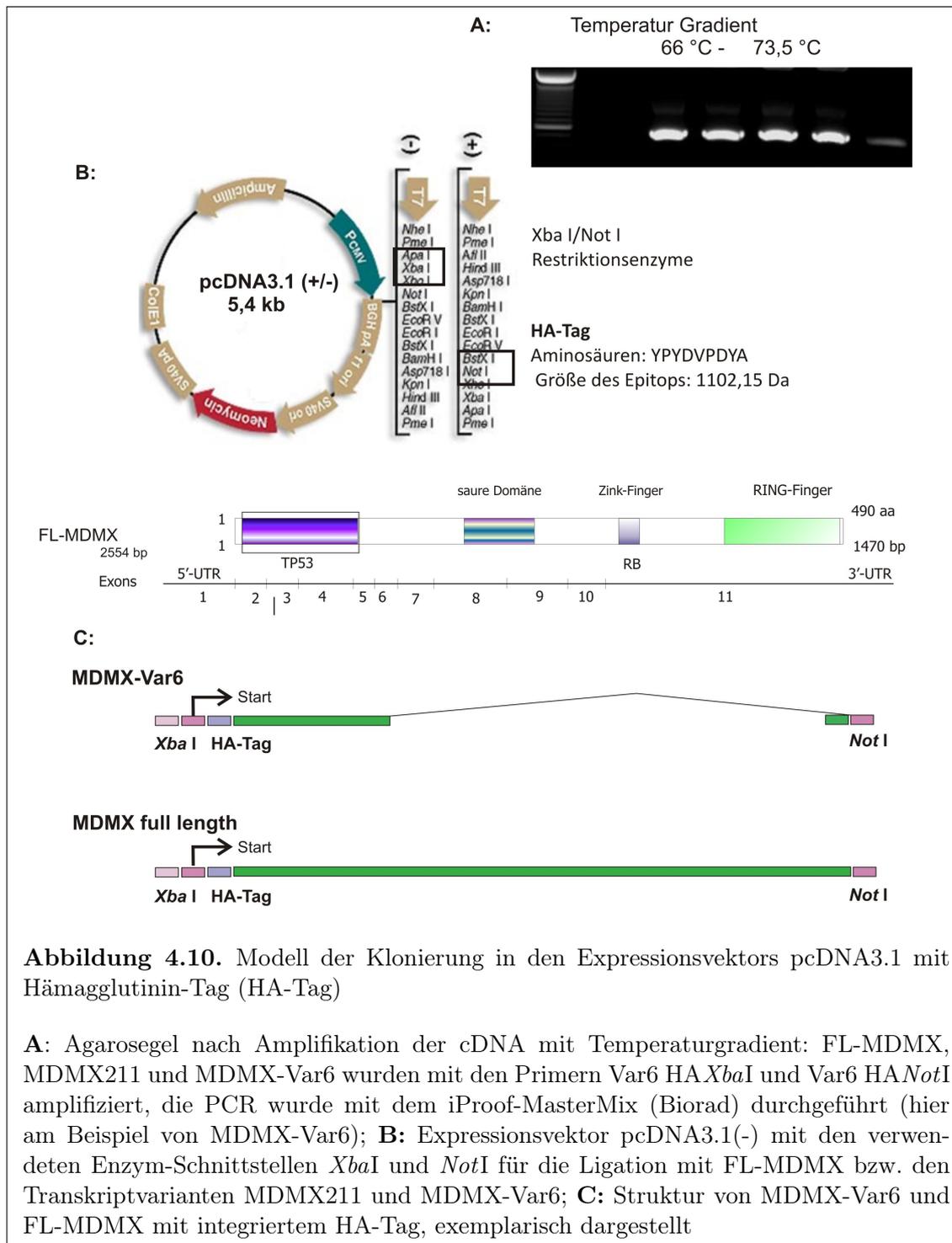
Der anschließende Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Frage, wie sich diese Transkriptvarianten in Tumorzellen verhalten und auf zytotoxische Behandlung reagieren. Be-

sonders in Anbetracht der Chemoresistenz des Ovarialkarzinoms spielen MDMX-Transkriptvarianten möglicherweise eine wichtige Rolle. Die folgenden Untersuchungen in MCF-7 Zellen sollen das differentielle Verhalten der Transkriptvarianten im Vergleich zum FL-MDMX zeigen. Hierfür wurden FL-MDMX sowie die Transkriptvarianten MDMX-Var6 und MDMX211 mit einem Hämagglutinin-Tag (HA-Tag) versehen (Abb. 4.10). Es handelt sich hierbei um ein kleines Segment des viralen Hämagglutinin Hüll-Protein, das anschließend als Epitop-Tag in einen Genexpressionsvektor eingebracht wird.

Dieses Epitop wird von Hämagglutinin-Antikörpern erkannt, und das exprimierte Protein kann charakterisiert werden. Diese Methode eignet sich sehr gut für funktionelle Proteinanalysen. Die entsprechende Oligonukleotidsequenz für den HA-Tag wurde in spezifische Primer integriert (Tab. 3.6; Abb. 4.10). Diese Primer wurden so konstruiert, dass sich das Startkodon vor dem HA-Tag befindet und die Enzymschnittstellen *Xba*I und *Not*I sich jeweils am 5'-Ende bzw. am 3'-Ende des amplifizierten PCR-Produktes befinden. Anhand eines Temperaturgradienten wurde die höchste und somit optimale Annealing-Temperatur ausgewählt, bei der noch ein Produkt amplifiziert wird. Anschließend folgte jeweils der enzymatische Verdau des pcDNA3.1(-) Vektors sowie der einzelnen PCR-Produkte mit den Enzymen *Xba*I und *Not*I. Nach erfolgreicher Ligation konnte ein Sequenzvergleich den intakten Leserahmen der einzelnen Plasmide bestätigen.

4.7.1 Transfektion der MDMX-Varianten in MCF-7-Zellen

Für die Charakterisierung der Transkriptvarianten in Zellen wurden Mammakarzinomzellen (MCF-7 Zellen) ausgewählt. Diese Zellen haben nachweislich keine Mutationen im p53-Gen und weisen eine hohe Proliferationsrate auf. Die Transfektion von Ovarialkarzinom-Zelllinien erwies sich nach vielfältigen Versuchen als sehr schwierig. Da vermutet wurde, dass die Ursache im Transfektionsreagenz liegt, wurden weitere Transfektionsreagenzi-



en (JetPrime, Polyplus; Effectene, Qiagen; TurboFect, Fermentas) getestet. Mit keinem der Transfektionsreagenzien konnte ein zufriedenstellendes Ergebnis erzielt werden (Daten nicht gezeigt). Unter Verwendung des Reagenz FuGene 6 (Roche) wurden die MCF-7 Zellen 24 h nach dem Einstreuen transfiziert. Im Anschluss an die Isolierung der Proteine konnte mit einem monoklonalen Hämagglutinin-Antikörper die Expression des Fusions-

proteins nachgewiesen werden. Zum Vergleich wurde immer das FL-MDMX mit ebenfalls integriertem HA-Epitop mitgeführt. Als Kontrolle diente ein Zellklon (Leervektor genannt), der nur mit dem Expressionsvektor pcDNA3.1 transfiziert worden war.

Da der Klon 3 von MDMX-Var6 ein optimales Ergebnis im Western Blot zeigte (Abb. 4.11), wurde dieser für die anschließenden Experimente zur Zytostatika-Behandlung der MCF-7 Zellen verwendet (Kap. 4.7.3).

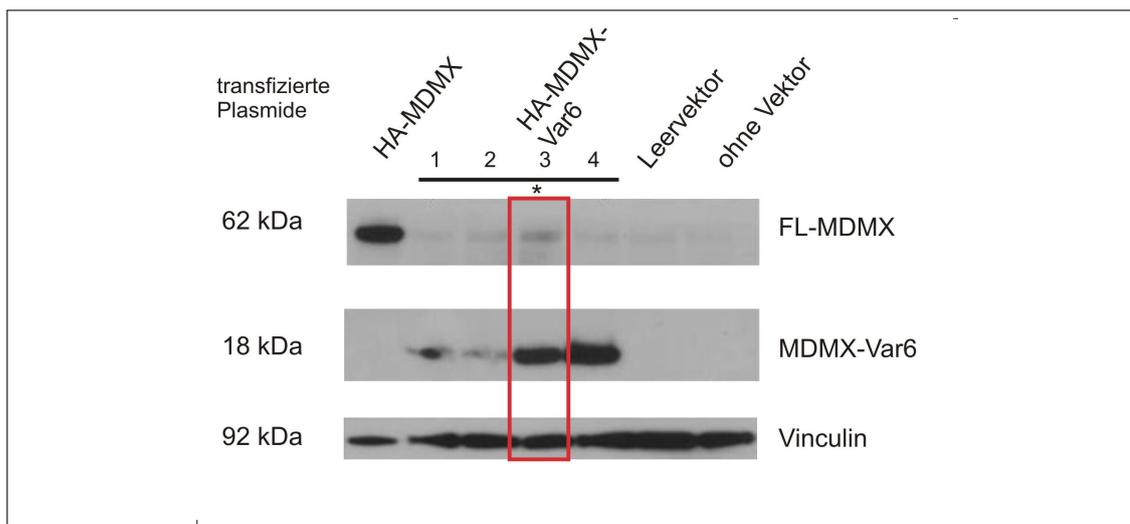


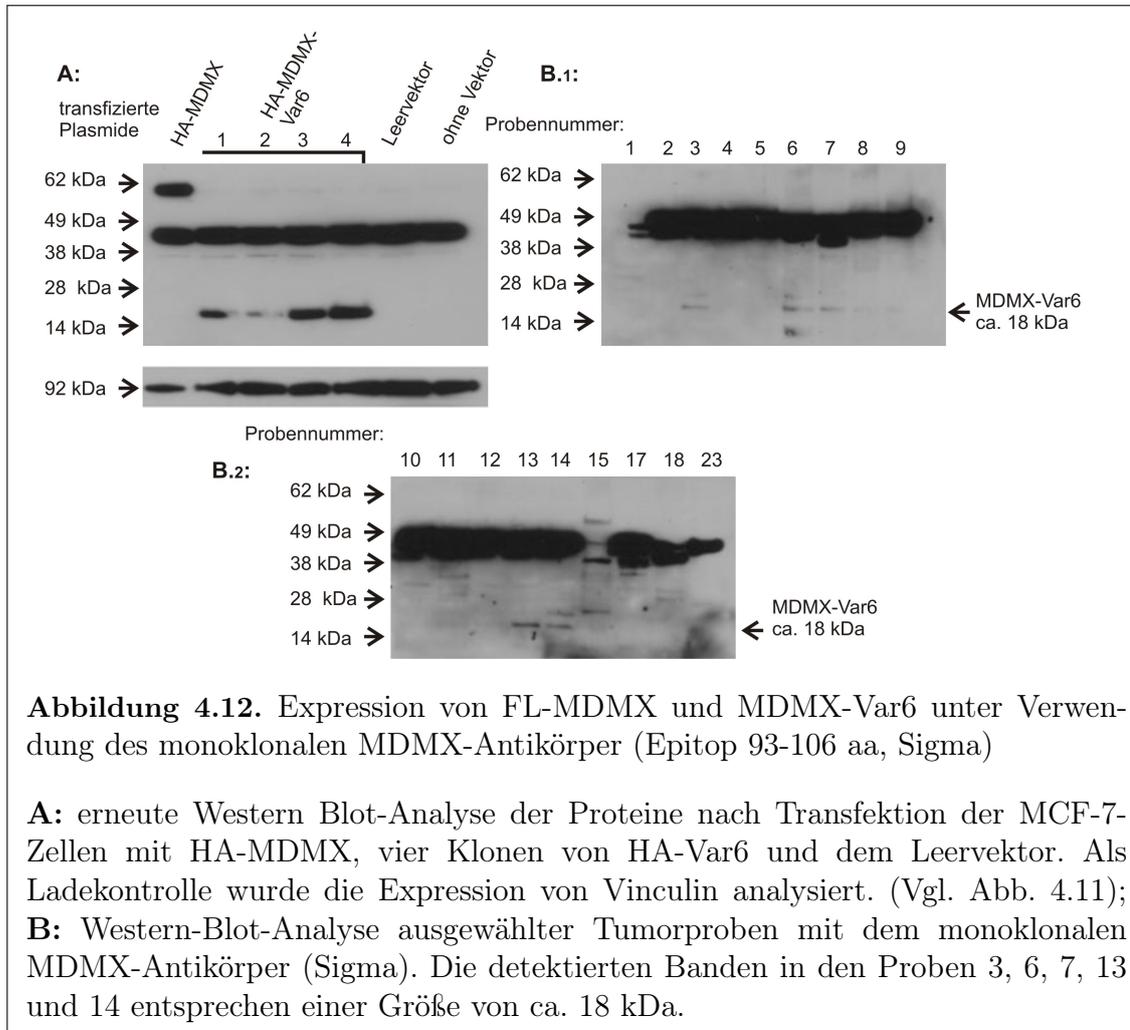
Abbildung 4.11. Expression von FL-MDMX und MDMX-Var6 in transfizierten MCF-7 Zellen

Nach Transfektion von MCF-7 Zellen mit vier Klonen der Transkriptvariante MDMX-Var 6, FL-MDMX und dem Leervektor pcDNA3.1 erfolgte der Nachweis mit dem monoklonalen Antikörper gegen Hämagglutinin (Klon HA-7). Als Ladekontrolle wurde die Expression von Vinculin analysiert. * Klon 3 wurde für die Experimente mit cis-Platin ausgewählt (Abb. 4.13).

4.7.2 Expression von MDMX-Var6 in Tumorproben

Es konnte gezeigt werden, dass das zu erwartende Protein der Transkriptvariante MDMX-Var6 ein Gewicht von ca. 18 kDa hat (Abb. 4.11). Für die biologische Bedeutung dieser Variante ist von großem Interesse, ob das Protein auch endogen vorhanden ist. Wie bereits erwähnt, bindet der zuvor gezeigte polyklonale MDMX-Antikörper (Bethyl Laboratories) im Bereich der Aminosäuren 125-175 von MDMX und kann somit viele Spleißvarianten

nicht detektieren (Abb. 4.8). Es wurde daraufhin ein monoklonaler MDMX-Antikörper (Sigma) verwendet, der das Epitop im Bereich der Aminosäuren 93-106 des MDMX-Proteins erkennt. Dieser monoklonale MDMX-Antikörper ist in der Lage, die Transkriptvariante MDMX-Var6 und FL-MDMX zu identifizieren (Abb 4.12).



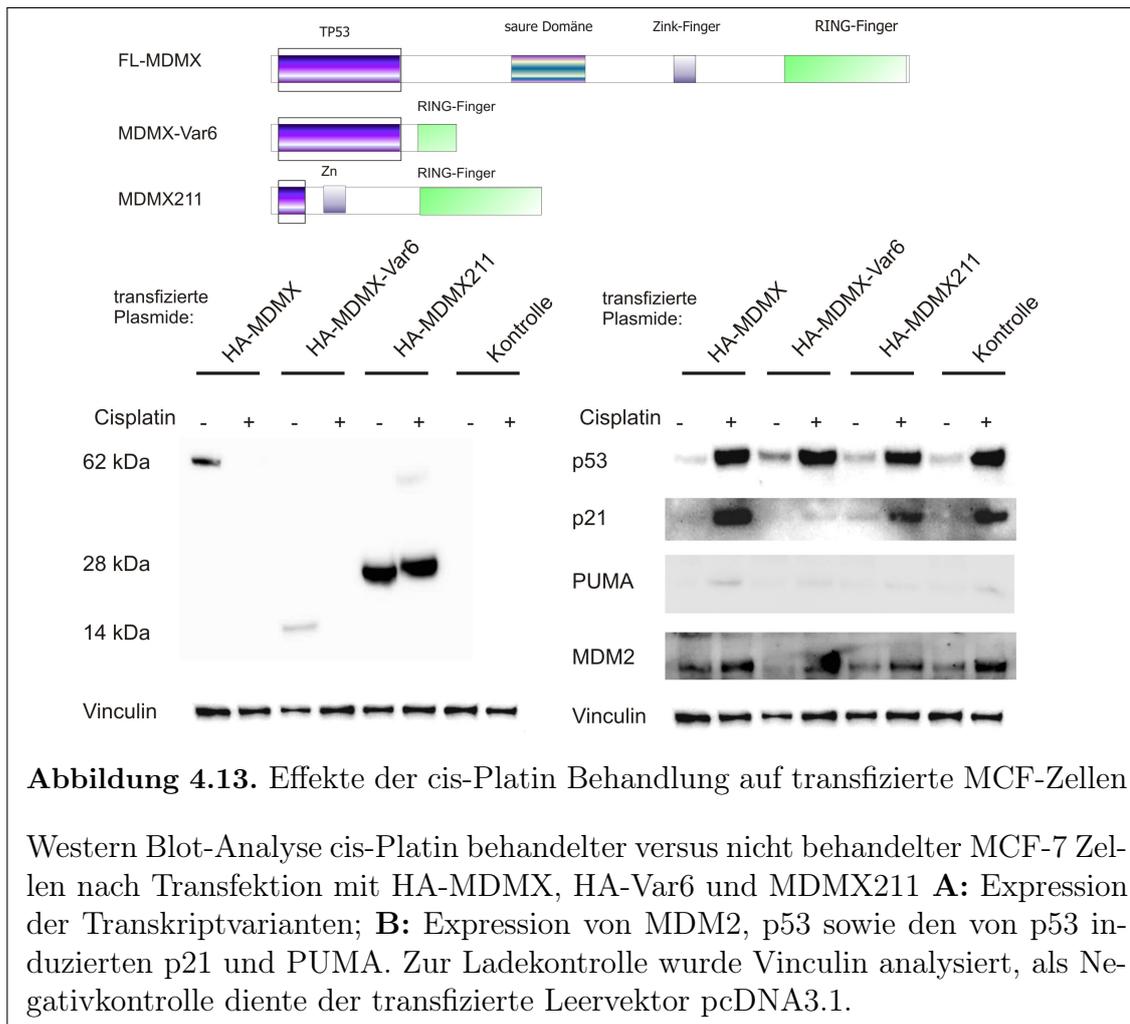
In den Proben 3, 6, 7, 13 und 14 ist ein 18 kDa schweres Protein zu erkennen (Abb. 4.12-B). Die Masse dieser Banden entspricht der Masse des HA-MDMX-Var6 Proteins (Abb. 4.12-A). Aus diesem Ergebnis ist kein direkter Beweis zu ziehen. Es lässt jedoch den Schluss zu, dass eine MDMX-Variante in der gleichen Größe translatiert wird. Die ausgeprägte Bande bei ca. 40 kDa ist wahrscheinlich unspezifisch. Kritisch betrachtet werden muss bei diesem monoklonalen Antikörper die sehr schwach ausgeprägte bzw. zumeist auch fehlende FL-MDMX-Bande bei 62 kDa (Abb. 4.12). Obwohl mit dem polyklonalen MDMX-Antikörper

(Bethyl Laboratories), der ein Epitop im mittleren Bereich von MDMX erkennt, deutlich stärkere Banden von FL-MDMX zu sehen waren (Abb. 4.8).

4.7.3 Cis-Platin-Behandlung der transfizierten MCF-7-Zellen

Ein wesentliches Interesse in der Behandlung des Ovarialkarzinoms besteht in der Überwindung der weitverbreiteten Chemoresistenz dieser Tumoren. Wie bereits am Beispiel von MDMX-S gezeigt wurde (Kapitel 1.7), könnten Transkriptvarianten des MDMX-Gens dabei eine wichtige Rolle bei der Beeinflussung des p53-Pathways spielen. Die Untersuchung von MCF-7 Zellen soll erste Anhaltspunkte über deren Verhalten auf das Standard-Chemotherapeutikum cis-Platin zeigen. Hierfür wurden die MCF-7 Zellen jeweils mit 1 μg FL-MDMX, MDMX-Var6, MDMX211 oder dem Leervektor pcDNA3.1 transfiziert. Im Anschluss erfolgte die Behandlung mit 10 μM cis-Platin für 24 h. FL-MDMX diente stets als Referenz, die mit dem Leervektor transfizierten Zellen als Kontrolle. Interessant ist zunächst die Reaktion der MDMX-Proteine auf die cis-Platin Behandlung. FL-MDMX und auch MDMX-Var6 werden nach cis-Platin Behandlung nicht mehr exprimiert. Für FL-MDMX ist bereits bekannt, dass es nach cis-Platin Behandlung abgebaut wird (Toledo und Wahl, 2007). Die Transkriptvariante MDMX211 ist im Vergleich zu FL-MDMX und MDMX-Var6 deutlich stärker exprimiert. Die Behandlung mit cis-Platin hat zwar keinen Einfluss auf deren Expression, es ist jedoch, aufgrund posttranslationaler Modifikationen, eine Zunahme des Molekulargewichts zu erkennen (Abb. 4.13-A). Nach der Transfektion von MDMX-Var6 ist im Vergleich zu FL-MDMX eine stärkere Expression von p53 zu erkennen. Obwohl es nach cis-Platin Behandlung zu einem Anstieg von p53 kommt, wird es in seiner Aktivität inhibiert. Interessant war zusätzlich die Expression der für den Zellzyklus bzw. für die Apoptose wichtigen Proteine p21 und PUMA. Als Proliferationsinhibitor spielt p21 eine wichtige Rolle, um Tumorprogression zu verhindern. Das pro-apoptotische Protein PUMA (**p**53 **u**pregulated **m**odulator of **a**poptosis) ist ein

wichtiger Teil der p53-abhängigen und -unabhängigen Apoptose.



In den MDMX-Var6 transfizierten Zellen werden das von p53 induzierte p21 und PUMA fast vollständig unterdrückt (Abb. 4.13-B). MDMX211 hingegen verändert die Funktion von p53, im Vergleich zu FL-MDMX, nur geringfügig. Die Expression von MDM2 wird allein durch die Transfektion von MDMX-Var6 oder MDMX211 unterdrückt. Nach Behandlung mit cis-Platin konnte dann eine erhöhte Expression von MDM2 sowohl bei MDMX-Var 6 als auch bei MDMX211 gezeigt werden.

5 Diskussion

MDMX ist das bisher einzige identifizierte Homologe des Onkogens MDM2. Durch die Entdeckung von MDMX im Jahre 1996 wurde die Regulation von p53 durch MDM2 noch komplexer (Shvarts *et al.*, 1996). Aufgrund der verschiedenen molekularen Aktivitäten der beiden MDM-Proteine in Bezug auf p53 ist es sehr schwierig alle experimentellen Daten zu vereinen. Bis zum heutigen Zeitpunkt existieren noch keine Modelle zur Klärung der *in vivo* Funktion von MDMX. Die Entdeckung verschiedener Transkripte von MDMX wie auch von MDM2 trug überdies zur Komplexität bei und erfordert zusätzliche Beachtung in Bezug auf kanzerogene Prozesse. Andererseits sind im Hinblick auf eine spezifische Tumorthherapie, wie z.B. die Steigerung der p53-Aktivität durch MDM-Hemmung, MDMX/MDM2-Transkripte eine interessante Herausforderung.

Durch verschiedene Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Spleißvarianten von MDMX, wie auch von MDM2 einen wichtigen prognostischen Faktor darstellen. In Weichteilsarkomen beispielsweise ist die verstärkte Expression von MDMX-S-mRNA mit einer signifikanten Verkürzung der Überlebenszeit verbunden (Bartel *et al.*, 2004). MDMX könnte ein neues und vielversprechendes Target für Krebstherapien sein. Auf der Grundlage der bisherigen Ergebnisse sollte in dieser Arbeit die Bedeutung der MDMX-Spleißvarianten in Ovarialkarzinomgewebe untersucht werden. Im Mittelpunkt des Interesses stand die Identifizierung bislang unbekannter Transkriptvarianten der MDMX-mRNA in Tumoren des Ovars. Dafür wurde die Expression von MDMX-mRNA in 31 Gewebeproben des Ovarialkarzinoms analysiert. Nach Detektion der MDMX-Spleißvarianten fokussierte sich die Arbeit auf eine häufig vorkommende, jedoch noch unbekannt Variante der MDMX-mRNA. Die Charakterisierung dieser Transkriptvariante in Tumorzelllinien sollte zeigen, welchen Einfluss diese auf die Therapie haben könnte. Zum Vergleich wurde die bereits beschriebene Spleißvariante MDMX211 hinzugezogen (Giglio *et al.*, 2005). Für dieses MDMX-

Transkript gibt es bislang noch keine Beweise für eine Korrelation mit Tumoreigenschaften, ein Einfluss auf die Chemosensitivität wird jedoch vermutet (Giglio *et al.*, 2005). Für die vorliegende Arbeit wurde zunächst eine Zelllinie mit Wildtyp(wt)-p53 Status ausgewählt. Aufgrund der vergeblichen Transfektionsversuche von Ovarialkarzinom-Zelllinien, sollte die Bedeutung der Transkriptvariante an Brustkrebszellen (MCF-7 Zellen) gezeigt werden. Diese Zelllinie besitzt ebenfalls wt-p53 Status und wird aufgrund ihrer guten Transfektionseffizienz häufig verwendet. Im folgenden wird die Bedeutung von MDMX-Transkriptvarianten für Therapie und Prognose des Ovarialkarzinoms diskutiert werden.

5.1 Die Bedeutung von MDM2, MDMX und ihrer Transkripte

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass MDMX-Varianten im Ovarialkarzinom sehr häufig vorkommen. Speziell die Varianten, die fähig sind, p53 zu inhibieren, lassen erkennen, dass der p53-Tumorsuppressor-Pathway in humanen Tumoren auf verschiedenen Wegen inaktiviert werden kann. MDMX-S, die erste beschriebene Isoform, kann bedeutend besser an p53 binden und dessen transkriptionelle Aktivität inhibieren (Rallapalli *et al.*, 1999). Bislang existieren immer noch wenige Daten zur Bedeutung von MDMX-S in der Tumorentstehung. Untersuchungen in Osteosarkom-Zelllinien liefern vielversprechende Hinweise darauf, dass ein höheres MDMX-S/FL-MDMX Verhältnis signifikant häufiger mit Mutationen von p53 einhergeht (Lenos *et al.*, 2005). Für Tumorproben konnten diese Beobachtungen bislang noch nicht bestätigt werden (Bartel *et al.*, 2005). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in 28 von 31 Tumorproben FL-MDMX und MDMX-S zu unterschiedlichen Anteilen exprimiert wird. In 7 von 9 Proben, in denen der Anteil von MDMX-S prozentual höher war als der von FL-MDMX, wiesen zusätzlich eine Mutation von p53 auf (Abb. 4.4, Tab. 4.1). Dieser Aspekt kann nicht als signifikant beurteilt werden. Es kann aber vermutet werden, dass das MDMX-S/FL-MDMX Verhältnis wertvolle Hinweise auf die Prognose liefern und dementsprechend Patientinnen mit schlechter Prognose besser

identifizieren kann. Überlegungen gehen bereits soweit, dass MDMX-Spleißprodukte einen viel effektiveren Biomarker für Veränderungen des p53-Pathways darstellen könnten als p53-Mutationen selbst (Lenos *et al.*, 2005). Es wäre zu erwarten, dass MDMX-S in Tumoren mit p53-wt einen größeren Effekt hat als bei mutiertem p53. MDMX-S kann effektiver an p53-wt binden und es auch stärker inhibieren. Dadurch kann p53 nicht mehr als Transkriptionsfaktor agieren, und p53-abhängige Gene werden supprimiert. Auf der anderen Seite ist p53, durch die Bindung an MDMX-S, vor einem Abbau durch MDM2 geschützt (Rallapalli *et al.*, 1999). Zusätzlich ist MDMX-S stabiler als MDMX, da es aufgrund der fehlenden RING-Finger Domäne nicht mit MDM2 interagieren kann und somit vor dem MDM2-vermittelten Abbau geschützt ist (Rallapalli *et al.* 2003). Zunächst ist es notwendig, mit einem spezifischen MDMX-Antikörper, der MDMX-S detektieren kann, zu verifizieren, dass endogenes MDMX-S-Protein vorhanden ist. Aber selbst wenn der Nachweis des Proteins nicht gelingen sollte, spricht die Expression von MDMX-S bzw. der Spleißvarianten allgemein für eine Fehlregulation des Spleißens in Tumoren. Dementsprechend schließt sich die Frage an, ob der Spleißvorgang Ursache oder Konsequenz dieser Fehlregulation ist. Um das komplexe Netzwerk zwischen MDM2, MDMX, p53 und MDMX-S zu verstehen, bedarf es anschliessend noch weiterer Untersuchungen.

Wie zuvor erwähnt, wurden vor einigen Jahren zwei weitere Varianten, MDMX-A und MDMX-G, in der Zervixkarzinom-Zelllinie C33A beschrieben (de Graaf *et al.*, 2003). Diese beiden Varianten konnten in dieser Arbeit erstmalig in ovariellen Tumorgewebe nachgewiesen werden. Der MDMX-G-mRNA fehlen Exon 3-5 sowie die Hälfte von Exon 6. Das translatierte Protein hat somit einen Großteil der p53-Bindedomäne nicht und kann demnach nicht an p53 binden. Im Gegensatz dazu wird der MDMX-A-mRNA durch alternatives Spleißen Exon 9 entfernt. Daraus resultiert ein Protein, dem die saure Domäne fehlt. Beide Proteine enthalten jedoch die RING-Finger Domäne, die für die Interaktion und Stabilisierung von MDM2 benötigt wird. MDMX-A, mit fehlender saurer Domäne, ist sehr

anfällig für den Abbau durch MDM2 (Mancini *et al.*, 2009). Dies gibt einen Hinweis auf die entscheidende Rolle der sauren Domäne für die Stabilität von FL-MDMX. Vermutlich maskiert die saure Domäne von MDMX die saure Domäne von MDM2 und inhibiert somit die Fähigkeit von MDM2, p53 zu degradieren (de Graaf *et al.*, 2003). Im Komplex mit MDM2 besitzt MDMX-A wahrscheinlich dennoch onkogenes Potential, da somit MDM2 stabilisiert wird (Mancini *et al.*, 2009). Die Transkriptvariante MDMX-G ist teilweise in der Lage, die p53-induzierte Transaktivierung zu inhibieren, wenn auch in geringerem Maße als FL-MDMX (de Graaf *et al.*, 2003). Dies ist sehr ungewöhnlich, da MDMX-G ein Großteil der p53-Bindedomäne fehlt. Es konnte jedoch bereits einige Jahre zuvor gezeigt werden, dass allein das RING-Finger Motiv von MDMX die p53-vermittelte Transaktivierung inhibieren kann. Dies resultiert vermutlich aus der Stabilisierung des MDM2-Levels (Stad *et al.*, 2000). In dieser Arbeit wurden indes weitere, bislang unbekannte, Transkriptvarianten identifiziert (Abb. 4.6). Diese weisen ganz unterschiedliche Spleißmuster auf. Bei Betrachtung der Variante MDMX[°]241-366 (Abb. 4.6) fällt die Ähnlichkeit zur bekannten Variante MDMX-G auf. Beiden fehlt ein Teil der p53-Bindungsdomäne, die Variante MDMX[°]241-366 besitzt C-terminal jedoch noch einen größeren Anteil vom p53-Bindungsbereich. Hier stellt sich die Frage, welchen Einfluss dies auf die Inhibierung der p53-induzierten Transaktivierung hat. Eine tiefgründigere Aussage zum Stellenwert der p53-Bindungsdomäne könnten dementsprechend Zelleexperimente mit diesen beiden Varianten liefern. Die Variante MDMX[°]543-1579 ist wiederum dem MDMX-S sehr ähnlich; beide Proteine enthalten nur die p53-Bindungsdomäne. Es konnte gezeigt werden, dass die stärkere Bindung von MDMX-S an p53 vermutlich auf die 26 zusätzlichen Aminosäuren zurückzuführen ist (Rallapalli *et al.*, 2003). Vermutlich ist die Variante MDMX[°]543-1579 demnach nicht in der Lage, p53 stärker zu binden. Aufgrund der fehlenden RING-Finger Domäne ist diese Variante jedoch möglicherweise ebenfalls stabiler als FL-MDMX, da es vor dem Abbau durch MDM2 geschützt ist (Rallapalli *et al.*, 2003). Eine abweichende Charakteristik weist die Spleißvariante MDMX[°]318-1210alpha auf. Die Insertion eines

kryptischen Exons des MDMX-Gens resultiert in einem neuen Startcodon im Intron, der Leserahmen wird danach nicht verschoben. Die Spleißstelle bei dem Basenpaar 318 ist genau die gleiche wie bei der Variante MDMX-XALT2. In diesem Fall stellt sich die Frage, ob dieser Bereich eine wichtige Rolle im Spleißvorgang spielt und wenn ja, in welcher Form.

Die Deletion von Exon 6 ist charakteristisch für MDMX-S. Dieses Exon scheint auch eine wichtige Rolle im Spleißvorgang zu spielen. Die Analyse der Transkriptvariante MDMX-9 (Abb. 4.6) zeigt zunächst das gleiche Spleißmuster mit Leserahmenverschiebung. Interessant ist, dass durch einen weiteren Spleißvorgang in Exon 7 der Leserahmen wieder so generiert wird, dass das reguläre Stopcodon verwendet wird. Die Bedeutung dieser neuen Variante ist noch unklar, sie zeigt jedoch interessante Mechanismen auf. Einige Transkriptvarianten wiesen zusätzlich zum individuellen Spleißmuster eine Deletion von Exon 6 auf, die wie bei MDMX-S zu einem frühen Stop führt (Daten nicht gezeigt). Auf Proteinebene spielen die verschiedenen Muster demnach keine Rolle mehr. Es stellt sich allerdings die Frage, warum bei vielen Spleißmustern das Exon 6 herausgespleißt wird und somit immer die Isoform MDMX-S translatiert wird. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Behandlung ovarieller Tumorzelllinien (OAW-42) mit cis-Platin häufig zu einem Herausspleißen von Exon 6 der MDMX-mRNA führt (Wolf *et al.*, persönliche Mitteilung). Lohnenswert wäre hier die Entwicklung eines Spleißmodells. Mit Hilfe eines ‚Minigens‘ könnten die Vorgänge besser verstanden werden. Besonders interessant ist, ob der Variante eine physiologische Bedeutung zukommt oder ob es, nach DNA-Schädigung, Ausdruck einer generellen Fehlregulation des Spleißens in Tumoren ist. Bei jeder dieser neuen Varianten ist natürlich zunächst noch unklar, inwieweit diese überhaupt translatiert wird. Diese Daten zeigen jedoch sehr deutlich die Komplexität der MDMX-Varianten, die zusätzlich von den Aktivitätsänderungen anderer onkogener Proteine abhängig sind.

Neben den MDMX-Varianten spielen vermutlich auch MDM2-Varianten eine wichtige

Rolle in der Tumorentwicklung. Bislang wurden mehr als 40 verschiedene MDM2-Spleißvarianten in Tumoren detektiert, beschrieben in den Ovarien und Harnblase (Sigalas *et al.*, 1996), Gehirn (Matsumoto *et al.*, 1998), in Sarkomen (Bartel *et al.*, 2001) und Brustdrüsen (Lukas *et al.*, 2001), sowie in Normalgewebe (Bartel *et al.*, 2004). Die Expression von MDM2-Transkriptvarianten korreliert oft mit fortgeschrittenen Tumorstadien (Sigalas *et al.*, 1996; Matsumoto *et al.*, 1998). In einer Brustkrebs-Studie war die Expression von MDM2-Varianten mit einem geringeren Überleben der Patientinnen assoziiert (Lukas *et al.*, 2001). Einige Studien implizieren, dass neben ultravioletter Strahlung (Chandler *et al.*, 2006; Dias *et al.*, 2006) auch verschiedene Chemotherapeutika (Dias *et al.*, 2006) spezifische MDM2-Spleißprodukte generieren. Es fehlen bisher noch funktionelle Analysen dieser Varianten. Die Rolle dieser Spleißvarianten in Tumoren, besonders in denen mit mutiertem p53 ist immer noch unklar. Generell bezieht sich das Interesse auf die Frage, welchen Sinn die Veränderungen des Spleißens haben. Einerseits kann es nur Zufall sein, weil DNA-Schäden eine Veränderung der Spleißfaktoren zur Folge haben. Andererseits stehen tiefgründigere Ursachen zur Diskussion. Diese beziehen sich auf die Hypothese, dass ein niedriges Level an FL-MDM2/FL-MDMX eine Aktivitätssteigerung von p53 nach sich zieht (Chandler *et al.*, 2006).

In drei MDM2 Varianten (MDM2-PM2, MDM2-EU2 und MDM2-KB3) konnten Regionen identifiziert werden, welche hohe Sequenzhomologien aufweisen (Bartel *et al.*, 2002). Hierbei handelt es sich um Sequenzen mit einer Länge von 7-10 bp, die bis zu 4 mal in der MDM2-cDNA vorhanden sind. Diesen wird eine unterstützende Rolle im Spleißvorgang zugesprochen. Es wurde bereits diskutiert, dass die homologen Sequenzen Artefakte bei der cDNA-Synthese darstellen würden (Jeyaraj *et al.*, 2009). Die Umschreibung der RNA in cDNA bei hohen Temperaturen mit Hilfe des Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis Kit diente dazu, jene Artefakte auszuschließen. Interessanterweise konnte in dieser Arbeit bei der neu identifizierten MDMX-Var6 ein ebensolche Sequenzhomologie nachge-

wiesen werden (Abb. 4.9). Es sind weitere Untersuchungen notwendig, um die supportive Rolle dieser Sequenzhomologien zu verifizieren. Zu Artefakten in der cDNA-Synthese können auch die verwendeten Primer führen. Die hier ausgewählten Random Primer weisen zwar eine höhere Ausbeute und Qualität im Gegensatz zu Oligo (dt) Primern auf; sie neigen aber auch dazu, nicht alle Regionen der mRNA gleichermaßen zu präsentieren.

5.2 Effekte der Transfektion auf die Zytostatika-Behandlung von MCF-7 Zellen

Für die Transfektionsversuche in dieser Arbeit wurde die Zelllinie MCF-7 ausgewählt. Die Untersuchungen sollten zunächst zeigen, wie die Zellen auf die Transfektion der zwei unterschiedlichen MDMX-Varianten reagieren. Anschließend wurde vordergründig das Verhalten der transfizierten Zellen auf cis-Platin analysiert. Von besonderem Interesse war die erstmals detektierte MDMX-Isoform MDMX-Var6. Dieser MDMX-Variante bleibt die p53-Bindungsdomäne vollständig erhalten, das RING-Finger Motiv fehlt hingegen komplett. Nach Transfektion der MCF-7 Zellender mit MDMX-Var6 wird, im Vergleich zu FL-MDMX, MDM2 deutlich schwächer exprimiert (Abb. 4.13). Der Grund dafür ist wahrscheinlich in der fehlenden RING-Finger Domäne zu finden. Es kann keine Heterodimerisierung stattfinden, und MDM2 wird folglich nicht vor dem proteasomalen Abbau geschützt (Stad *et al.*, 2001). Deshalb kann vermutet werden, dass MDM2 schneller abgebaut wird, obwohl die MDM2-Expression primär gleich gewesen sein kann. Zur Klärung dieser Frage kann die Zugabe eines Proteasom-Inhibitor (MG 132) Hinweise geben. Dieser verhindert den Abbau des ungeschützten MDM2. Zusätzlich ist das Heterodimer MDMX/MDM2 in MCF-7 Zellen bevorzugt als E3-Ligase aktiv bzw. die Bildung von MDM2-Homodimeren ein nicht optimaler Komplex zur p53-Degradation (Kawai *et al.*, 2007). Daher führen Mutationen im Bereich der RING-Finger Domäne zum Verlust der

E3-Ligase Aktivität (Wade *et al.*, 2009). Die gesteigerte Expression von p53 nach Transfektion von MDMX-Var6 im Vergleich zu FL-MDMX (Abb. 4.13) deutet die Funktionalität des Heterokomplexes an. Auch Kawai *et al.* konnten zeigen, dass eine Inhibierung des MDMX/MDM2 Heterodimer endogenes p53 aktiviert (Kawai *et al.*, 2007). Es stellt sich nun die Frage, warum p21 nicht verstärkt exprimiert wird. Inwiefern wird die Transkriptionsaktivität von p53 eventuell unterdrückt? Eine mögliche Erklärung ist, dass freies MDM2 die Abnahme von hnRNPK stimuliert. HnRNPK (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K) ist ein Cofaktor für p53, um p21 zu aktivieren. Die Folge ist, dass das p21-Proteinlevel sinkt (Enge *et al.*, 2009). Des Weiteren interagiert p53 mit der p300 Histon Acetyltransferase. Diese Interaktion ist essentiell für die p53-abhängige Aktivierung des Promotors für das p53-Zielgen p21 (Liu *et al.*, 2003). P53 wird selbst von p300 an verschiedenen Lysinen acetyliert, wodurch die transkriptionelle Aktivität erhöht wird (Prives und Manley, 2001). Durch die Bindung von p53 an MDMX sinkt die Aktivität der p300 Acetyltransferase. MDMX inhibiert demnach die p300 initiierte Acetylierung von p53 um das an MDMX gebundene p53 im transkriptionell inaktiven Stadium zu halten (Sabbatini und McCormick, 2002). Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Inhibierung der p53-Acetylierung die Transaktivierung p53-abhängiger Zielgene herabsetzt (Luo *et al.*, 2000). Die Transkriptionsaktivität von p53 sinkt dementsprechend unabhängig von MDM2. Es wäre ein spannenderer Aspekt, ob dies auch bei der Variante MDMX-Var6 der Fall ist. Interessanterweise würde dann MDMX-Var6 diese Fähigkeit auch unter cis-Platin Behandlung behalten. Vermutlich kann MDMX-Var6 nach genotoxischem Stress durch MDM2 nicht herunterreguliert werden. In Folge von DNA-Schäden sinkt das MDMX-Level rasch ab. Der Grund dafür ist, dass unter normalen Bedingungen MDMX von MDM2 gebunden und ubiquitiniert wird, um dessen proteasomalen Abbau zu stimulieren (de Graaf *et al.*, 2003). Weiterhin führt das Fehlen des C-Terminus, insbesondere des RING-Fingers, zu verstärktem Auftreten von MDMX im Nukleus und folglich Abnahme im Cytoplasma (Migliorini *et al.*, 2002). In den Mitochondrien bindet MDMX nicht an MDM2 (Mancini,

2009), jedoch an bcl2 und p53. Daraus folgt die Induktion der intrinsischen Apoptose über Cytochrom C, was den fehlenden Anstieg von p21 erklären könnte. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass ein Auftreten der MDMX-Transkriptvariante MDMX-Var6 zu einer Veränderung der Expression von p53 und dessen Zielgenen führt. Eine Korrelation der Expression von MDMX-Var6 mit histopathologischen Eigenschaften der Tumoren war nicht zu erkennen (Tab. 2.1; Tab. 4.2). Die Präsenz dieser Variante scheint jedoch die Wirkung von FL-MDMX zu modifizieren. In welchen Größenordnungen MDMX-Var6 exprimiert werden muss, um FL-MDMX zu beeinflussen, ist noch unklar und bedarf noch weiterer Untersuchungen. Eine exemplarische Analyse von ovariellen Normalgewebe zeigte keine Expression dieser Transkriptvariante (Daten nicht gezeigt). Obwohl die bisherigen Ergebnisse eine besondere Bedeutung in der Tumorentwicklung vermuten lassen, sind noch weitere Untersuchungen erforderlich, um diese Aussage zu verifizieren.

5.3 Isoform MDMX211

Im Gegensatz zur Transkriptvariante MDMX-Var6 ist bei MDMX211 das RING-Finger Motiv erhalten, die p53-Bindungsdomäne fehlt jedoch fast vollständig. Es wurde gezeigt, dass die Expression von MDMX211, unabhängig von p53, zu einem starken Ansteigen des MDM2-Levels führt (Giglio *et al.*, 2005). Die in dieser Arbeit verwendeten MCF-7 Zellen weisen primär ein hohes Level an MDM2 auf (Freedman und Levine, 1999). Ein Anstieg nach Überexpression von MDMX211 konnte nicht bestätigt werden, vermutlich wegen des hohen Grundlevels (Abb. 4.13-B). Übereinstimmend mit den Daten von Giglio *et al.* (2005) wird das p53-Level durch MDMX211 stabilisiert. Die fehlende Aktivierung von p21 (Abb. 4.13-B) spricht auch hier dafür, dass p53 zwar stabilisiert wird, aber transkriptionell inaktiv ist. Es ist davon auszugehen, dass in der Anwesenheit von MDMX211, steigende p53-Levels der Vielzahl von MDM2-p53 Komplexen entsprechen. Die Apoptose nach Zugabe von cis-Platin auf die Zellen wird durch Platinkomplexe und Crosslinks

in der DNA induziert. Die Behandlung von MCF-7 Zellen mit cis-Platin führt zu einem Anstieg von p53 und dessen Zielgenen p21 und PUMA. Zudem wird die Expression von MDM2 gesteigert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass mit MDMX211 transfizierte Zellen nach cis-Platin Behandlung einen weniger starken Anstieg von p21 und MDM2 aufweisen. Zusätzlich wird MDMX211 stabilisiert und kann wiederum den Komplex von p53 und MDM2 stärken. Vermutlich wird cis-Platin damit in seiner Wirkung, besonders in der Induktion apoptotischer Vorgänge, abgeschwächt. Vor allem die Expression von MDMX211 nach cis-Platin Behandlung ist ein Indiz für die Widerstandsfähigkeit der Zellen gegenüber dieser Art von Chemotherapie.

6 Zusammenfassung und weiterführende Gedanken

Es wurde in dieser Arbeit dargelegt, dass in den 31 ovariellen Tumorproben vielfach MDMX-Spleißvarianten exprimiert werden. Zusätzlich konnten die Ergebnisse von Sigalas *et al.* bestätigt werden, dass MDM2-Spleißvarianten auch in Ovarialtumoren vorkommen (Sigalas *et al.*, 1996). Nach der Transfektion von MCF-7 Zellen mit den Transkriptvarianten MDMX-Var6 (fehlende RING-Finger Domäne) und MDMX211 (fehlende p53-Bindungsdomäne) zeigen diese unterschiedliche Auswirkungen auf den p53-Pathway. Auch die Behandlung der MCF-7-Zellen mit cis-Platin zeigt ein differentielles Verhalten von FL-MDMX und den Spleißvarianten MDMX-Var6 und MDMX211. Eine bedeutende Rolle der MDMX-Transkriptvarianten in der Chemoresistenz ovarieller Tumoren kann vermutet werden.

Der Nachweis der Expression von MDMX- und MDM2-Varianten in Tumorzelllinien und -gewebe sowie die Ergebnisse der funktionellen Analyse sprechen für die kanzerogene Aktivität. Bei den MDM2-Spleißvarianten existieren bereits *in vivo*-Modelle, die diese Eigenschaften untermauern (Fridman *et al.*, 2003; Steinman *et al.*, 2004). Bei MDMX liegen noch keine aussagekräftigen Modelle vor. Die Herausforderung wird zukünftig sein, die onkogene Aktivität dieser Varianten zu diskriminieren. Die Fähigkeit, FL-MDMX zu binden oder zu modifizieren, verflechtet sich mit der direkten Wirkung gegenüber p53. Es sind also nicht nur die intrinsischen Eigenschaften der Varianten zu betrachten, sondern auch deren Wirkung auf Bindungspartner des MDMX bzw. MDM2. Eine weitere Variable im Modell ist das Expressionsverhältnis der MDMX-Variante zu dem des FL-Transkripts. Obwohl Studien mit MDMX-S und MDMX211 keine Korrelation mit FL-MDMX bewiesen haben (Bartel *et al.*, 2005; Prodosmo *et al.*, 2008), darf diese Komponente nicht außer Acht gelassen werden. In dieser Arbeit zeigte die Transfektion der Varianten MDMX211 und MDMX-Var6 deutliche Effekte auf das MDM2-Level (Abb. 4.13-B). Inwieweit das

auf Tumoren zutrifft, ist in weiterführenden Untersuchungen zu klären, auch in Hinblick auf den jeweiligen Mechanismus. Um ein funktionelles Modell zu konstruieren, bedarf es akkurater Detektionssysteme, um FL-MDMX von dessen Transkriptvarianten zu unterscheiden. Diese sind nicht nur auf mRNA-Ebene sondern auch im Bereich der Proteine notwendig. Es hat sich gezeigt, dass die im Zeitraum dieser Laborarbeit kommerziell erhältlichen Antikörper nicht vollständig dazu geeignet sind, zufriedenstellende Ergebnisse zu erzielen. Auf mRNA-Ebene ist die Entwicklung spezifischer Primer vermutlich die effektivste Variante. Erste Ergebnisse sind in dieser Arbeit erlangt worden. Es sind noch weitere Untersuchungen notwendig, um ein effektives System zur Entwicklung spezifischer Primer zu erreichen.

7 Literaturangaben

Altschul SF, Gish W, Miller W, Meyers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol* 215(3): 403-410.

Barak Y, Gottlieb E, Juven-Gershon T, Oren M (1994) Regulation of mdm2 expression by p53: alternative promoters produce transcripts with nonidentical translation potential. *Genes Dev* 8:1739-1749.

Bartel F, Taubert H, Harris LC (2002) Alternative and aberrant splicing of MDM2 mRNA in human cancer. *Cancer Cell* 2:9-15.

Bartel F, Harris LC, Würfl P, Taubert H (2004) MDM2 and its splice variant messenger RNAs: expression in tumors and down-regulation using antisense oligonucleotides. *Mol Cancer Res* 2(1):29-35. Review

Bartel F, Schulz J, Blümke K, Kappler M, Bache M, Schmidt H, Taubert H (2004) HDMX amplification and high levels of HDMX-S splice variant are correlated with a poor prognosis in soft tissue sarcomas. *Verh Dtsch Ges Pathol* 88:199-206.

Bartel F, Pinkert CA, Fiedler W, Wurl P, Schmidt H, Taubert H. (2004) Expression of alternatively and aberrantly spliced transcripts of the MDM2 mRNA is not tumorspecific *Int J Cancer* 24:143-51.

Böhnke A (2005) Untersuchungen zur Funktion von HDMX und HDMX-S bei DNA-Schäden in Ovarialkarzinom-Zelllinien. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg .

Bottger V, Bottger A, Garcia-Echeverria C, Ramos YF, van der Eb AJ, Jochemsen AG, Lane DP (1999) Comparative study of the p53-mdm2 and p53-MDMX interfaces. *Oncogene* 18: 189-199.

Bristow RE, Tomacruz RS, Armstrong DK, Trimble EL, Montz FJ (2002) Survival effect of maximal cytoreductive Surgery for advanced ovarian carcinoma during the platinum era: a meta-analysis. *J Clin Oncol* 20:1248-1259.

Cahilly-Snyder L, Yang-Feng T, Francke U, George DL (1987) Molecular analyses and chromosomal mapping of amplified genes isolated from a transformed mouse 3T3 cell line. *Somatic Cell Mol. Genet.* 13: 235-244 1987.

Cannistra SA (2004) Medical Progress: Cancer of the ovary. *The New England Journal of Medicine* 2519-2529.

Chandler DS, Singh RK, Caldwell LC, Bitler JL, Lozano G (2006) Genotoxic stress induces coordinately regulated alternative splicing of the p53 modulators MDM2 and MDM4. *Cancer Res.* 66: 9502-8.

Chung DC, Rustgi AK (2003) The hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: genetics and clinical implications. *Ann Intern Med* 138:560-70.

de Graaf P, Little NA, Ramos YF, Meulmeester E, Letteboer SJ, Jochemsen AG (2003) Hdmx protein stability is regulated by the ubiquitin ligase activity of Mdm2. *J. Biol. Chem.* 3: 38315-24.

Dias CS, Liu Y, Yau A, Westrick L, Evans SC (2006) Regulation of hdm2 by stress-induced hdm2alt1 in tumor and nontumorigenic cell lines correlating with p53 stability. *Cancer Res* 66:9467-73.

Dogan E, Saygili U, Tuna B, Gol M, Gürel D, Acar B, Koyuncuoglu M. (2005) p53 and mdm2 as prognostic indicators in patients with epithelial ovarian cancer: a multivariate analysis. *Gynecol Oncol.* 97(1):46-52.

Evans SC, Viswanathan M, Grier JD, Narayana M, El-Naggar AK, Lozano G (2001) An alternatively spliced HDM2 product increases p53 activity by inhibiting HDM2. *Oncogene* 20: 4041-4049.

Fakharzadeh SS, Trusko SP, George DL (1991) Tumorigenic potential associated with enhanced expression of gene that is amplified in mouse tumor cell line. *EMBO J.* 10:1565-1569.

Fang S, Jensen JP, Ludwig RL, Vousden KH, Weissman AM (2000) Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *J. Biol. Chem.* 275: 8945-8951.

Finch RA, Donoviel DB, Potter D, Shi M, Fan A, Freed DD, Wang C, Zambrowicz BP, Ramirez-Solis R, Sands AT, Zhang N (2002). Mdmx is a negative regulator of p53 activity in vivo. *Cancer Res.* 62:3221-3225.

Freedman DA, Levine AJ (1999) Regulation of the p53 protein by the MDM2 oncoprotein-thirty-eighth G.H.A. Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Res* 59:1-7.

Fridman JS, Hernando E, Hemann MT, de Stanchina E, Cordon-Cardo C, Lowe SW (2003) Tumor promotion by Mdm2 splice variants unable to bind p53. *Cancer Res.* 63: 5703-6.

Giglio S, Mancini F, Gentiletti F, Sparaco G, Felicioni L, Barassi F, Martella C, Prodosmo A, Iacovelli S, Buttitta F, Farsetti A, Soddu S, Marchetti A, Sacchi A, Pontecorvi A, Moretti F (2005) Identification of an aberrantly spliced form of HDMX in human tumors: a new mechanism for HDM2 stabilization. *Cancer Res.* 65: 9687-94.

Graaf P, Little NA, Ramos YFM, Meulmeester E, Letteboer SJF, Jochemsen AG (2003) Hdmx Protein Stability Is Regulated by the Ubiquitin Ligase Activity of Mdm2. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 278 (40): 38315-38324

- Gu J, Nie L, Wiederschain D, Yuan ZM (2001) Identification of p53 sequence elements that are required for MDM2-mediated nuclear export. *Mol. Cell Biol.* 21: 8533-8546.
- Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M (1997) Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387: 296-299.
- Honda R, Tanaka H, Yasuda H (1997) Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett.* 420: 25-27.
- Honda R, Yasuda H (2000) Activity of MDM2, a ubiquitin ligase, toward p53 or itself is dependent on the RING finger domain of the ligase. *Oncogene* 19: 1473-1476.
- Hoskins WJ, Bundy BN, Thiepgen JT, Omura GA (1992) The influence of cytoreductive surgery on recurrence-free interval and survival in small-volume stage III epithelial cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *Gynecol Oncol* 47:159-166.
- Jackson JG, Pereira-Smith OM (2006) p53 is preferentially recruited to the promoters of growth arrest genes p21 and GADD45 during replicative senescence of normal human fibroblasts. *Cancer Res* 66:8356-8360.
- Jeyaraj S, O'Brien DM, Chandler DS (2009) MDM2 and MDM4 splicing: an integral part of the cancer spliceome. *Front Biosci.* 14:2647-56.
- Jones SN, Roe AE, Donehower LA, Bradley A (1995) Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature* 378: 206-208.
- Kawai H, Lopez-Pajares V, Kim MM, Wiederschain D, Yuan ZM (2007) RING domain-mediated interaction is a requirement for MDM2's E3 ligase activity *Cancer Res.* Jul 1;67(13):6026-30.
- Kiechle M: *Gynäkologie und Geburtshilfe*. 1.Aufl. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, Amsterdam, 2006, S.538-550.
- King MC, Marks JH, Mandell JB (2003) Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science* 302:643-6
- Kuhn W, Florack K, Roder J et al. (1998) The influence of upper abdominal surgery on perioperative morbidity and mortality in patients with advanced ovarian cancer FIGO III and FIGO IV. *Int J Gynecol Cancer* 8:56-63.
- Lahav G. (2008) Oscillations by the p53-Mdm2 feedback loop. *Adv Exp Med Biol* 641: 28-38.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W et al. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921.

- Lenos K, Grawenda AM, Lodder K, Kuijjer ML, Teunisse AF, Repapi E, Grochola LF, Bartel F, Hogendoorn PC, Wuerl P, Taubert H, Cleton-Jansen AM, Bond GL, Jochemsen AG (2012) Alternate splicing of the p53 inhibitor HDMX offers a superior prognostic biomarker than p53 mutation in human cancer. *Cancer Res.* (online first) 14.10.1158/0008-5472.CAN-12-0215
- Lin J, Wu X, Chen J, Chang A, Levine AJ (1995) Functions of the p53 protein in growth regulation and tumor suppression. In: 215-223.
- Liu G, Xia T, Chen X (2003) The activation domains, the proline-rich domain, and the C-terminal basic domain in p53 are necessary for acetylation of histones the proximal p21 promoter and interaction with p300/CREB-binding protein. *J Biol Chem.* 278(19):17557-65.
- Longley DB, Johnston PG (2005) Molecular mechanisms of drug resistance. *J. Pathol.* 205(2): 275-292.
- Lukas J, Gao DQ, Keshmeshian M, Wen WH, Tsao-Wei D, Rosenberg S, Press MF (2001) Alternative and aberrant messenger RNA splicing of the mdm2 oncogene in invasive breast cancer. *Cancer Res.* 61(7):3212-9.
- Luo J, Su F, Chen D, Shiloh A, Gu W (2000) Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis. *Nature* 408: 377-381.
- Matsumoto R, Tada M, Nozaki M, Zhang CL, Sawamura Y, Abe H (1998) Short alternative splice transcripts of the mdm2 oncogene correlate to malignancy in human astrocytic neoplasms. *Cancer Res.* 58: 609-613.
- Mendrysa SM, McElwee MK, Michalowski J, O Leary KA, Young KM, Perry ME (2003) Mdm2 is critical for inhibition of p53 during lymphopoiesis and the response to ionizing irradiation. *Mol. Cell. Biol.* 23: 462-472.
- Meyer T, Rustin GJ (2000) Role of tumour markers in monitoring epithelial ovarian cancer. *BrJ Cancer* 82:1535-8
- Modrek B, Lee C (2002) A genomic view of alternative splicing. *Nat. Genet.* 30: 13-19.
- Montes de Oca Luna R, Wagner DS, Lozano G (1995) Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53. *Nature* 378: 203-206.
- Okamoto A, Sameshima Y, Yokoyama S, Terashima Y, Sugimura T, Terada M, Yokota J (1991) Frequent allelic losses and mutations of the p53 gene in human ovarian cancer. *Cancer Res.* 1:5171-6.
- Perry ME, Mendrysa SM, Saucedo LJ, Tannous P, Holubar M (2000) p76Mdm2 inhibits the ability of p90Mdm2 to destabilize p53. *J. Biol. Chem.* 275:5733-5738.

Petru E, Pickel H, Heydarfadai M, Lahousen M, Haas J, Schaidler H, Tamussino H (1992) Nongenital cancers metastatic to the ovary. *Gynecol Oncol* 44:83-6.

Phillips A, Teunisse A, Lam S, Lodder K, Darley M, Emaduddin M, Wolf A, Richter J, de Lange J, Verlaan-de Vries M, Lenos K, Boehnke A, Bartel F, Blaydes JP, Jochemsen AG (2010) HDMX-L is expressed from a functional p53-responsive promoter in the first intron of the HDMX gene and participates in an autoregulatory feedback loop to control p53 activity. *J Biol Chem.* 285(38):29111-27.

Prives C, Manley JL (2001) Why is p53 acetylated? *Cell* 107(7): 815-8.

Prodosmo A, Giglio S, Moretti S, Mancini F, Barbi F, Avenia N, Di Conza G, Schünemann HJ, Pistola L, Ludovini V, Sacchi A, Pontecorvi A, Puxeddu E, Moretti F (2008) Analysis of human MDM4 variants in papillary thyroid carcinomas reveals new potential markers of cancer properties. *J. Mol. Med.* 86: 585-96.

Rallapalli R, Strachan G, Cho B, Mercer E, Hall DJ (1999) A novel MDMX transcript expressed in a variety of transformed cell lines encodes a truncated protein with potent p53 repressive activity. *J. Biol. Chem.* 274: 8299-8308.

Ramos YF, Stad R, Attema J, Peltenburg LT, van der Eb AJ, Jochemsen AG (2001) Aberrant expression of HDMX proteins in tumor cells correlates with wild-type p53. *Cancer Res.* 1: 1839-42.

Sabbatini P, McCormick F (2002) MDMX inhibits the p300/CBP-mediated acetylation of p53. *DNA Cell Biol.* 21(7): 519-25.

Schaal TD, Maniatis T (1999) Multiple distinct splicing enhancers in the protein-coding sequences of a constitutively spliced pre-mRNA. *Mol. Cell. Biol.* 19:261-273.

Sharp PA (1994) Split genes and RNA splicing. *Cell* 77: 805-815.

Sharp DA, Kratowicz SA, Sank MJ, George DL (1999) Stabilization of the MDM2 oncoprotein by interaction with the structurally related MDMX protein. *J. Biol. Chem.* 274: 38189-38196.

Shvarts A, Steegenga WT, Riteco N, van Laar T, Dekker P, Bazuine M, van Ham RC, van der Houven van Oordt W, Hateboer G, van der Eb AJ, Jochemsen AG (1996) MDMX: a novel p53-binding protein with some functional properties of MDM2. *EMBO J.* 15(19):5349-57.

Sigalas I, Calvert AH, Anderson JJ, Neal DE, 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.

Srebrow A, Kornblihtt AR (2006) The connection between splicing and cancer. *Journal of Cell Science* 119: 2635-2641.

- Stad R, Ramos YF, Little N, Grivell S, Attema J, van der Eb AJ, Jochemsen AG (2000) Hdmx stabilizes Mdm2 and p53. *J. Biol. Chem.* 275: 28039-28044.
- Steinman HA, Burstein E, Lengner C, Gosselin J, Pihan G, Duckett CS, Jones SN (2004) An alternative splice form of Mdm2 induces p53-independent cell growth and tumorigenesis. *J. Biol. Chem.* 279: 4877-86.
- Tanimura S, Ohtsuka S, Mitsui K, Shirouzu K, Yoshimura A, Ohtsubo M (1999) MDM2 interacts with MDMX through their RING finger domains. *FEBS Lett.* 447: 5-9.
- Tavani A, Negri E, Franceschi S, Parazzini F, La VC (1993) Risk factors for epithelial ovarian cancer in women under age 45. *Eur. J. Cancer* 29A: 1297-1301.
- Tavassoli FA, Devilee P (2003) World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. IARC Press, Lyon: 113-145.
- Toledo F, Wahl GM (2007) MDM2 and MDM4: p53 regulators as targets in anti-cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol.* 39:1476-82.
- van Krieken JH, Jung A, Kirchner T, Carneiro F, Seruca R, Bosman FT, Quirke P, Flèjou JF, Plato Hansen T, de Hertogh G, Jares P, Langner C, Hoefler G, Ligtenberg M, Tiniakos D, Tejpar S, Bevilacqua G, Ensari A (2008) KRAS mutation testing for predicting response to anti-EGFR therapy for colorectal carcinoma: proposal for an European quality assurance program. *Virchows Arch.* 453(5):417-31.
- Venables JP (2004) Aberrant and Alternative Splicing in Cancer. *Cancer Research* 64: 7647-7654.
- Vogelstein B, Lane D, Levine AJ (2000) Surfing the p53 network. *Nature* 408: 307-310.
- Vousden KH, Lane DP (2007) p53 in health and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 275-283.
- Wang Z, Burge CB (2008) Splicing regulation: from a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. *RNA* 14:802-813.
- Whittemore AS (1994) Characteristics relating to ovarian cancer risk: implications for prevention and detection. *Gynecol Oncol* 55: S15-S19

8 Anhang

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

Tabelle 8.1. pTNM-Klassifikation und FIGO-Stadien des Ovarialkarzinoms

9 Thesen

1. Das häufige Versagen der Therapie beim metastasierten Ovarialkarzinom ist unter anderem auf eine Chemoresistenz zurückzuführen
2. Alternatives und aberrantes Spleißen spielt eine wesentliche Rolle in der Karzinogenese des humanen Ovarialkarzinoms
3. Die Expression von unterschiedlichen MDMX-Spleißvarianten ist neben Transkriptvarianten des MDM2-Gens vielfach in humanen Ovarialkarzinomen zu beobachten
4. Auch nach der Translation zeigen die MDMX-Varianten unterschiedliche Proteingrößen und -muster
5. MDMX Transkripte haben einen Einfluß auf die Funktionalität des p53-Pathways in Tumoren des Ovars und daraus resultierend einen Einfluß auf die Tumorentstehung und Tumorbehandlung
6. MCF-7 Zellen zeigen nach Transfektion von MDMX-Var6 bzw. MDMX-211 differentielles Verhalten auf die Behandlung mit cis-Platin im Vergleich zu FL-MDMX
7. MDMX-Isoformen spielen eine Rolle in der Chemoresistenz ovarieller Tumoren und können Angriffspunkt für eine verbesserte Therapie des Ovarialkarzinoms sein

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Claudia Löbel

Geburtsdatum: 18.07.1984

Geburtsort: Karl-Marx-Stadt

Wohnort: Untere Bornränder 18; 07751 Großpüirschütz

Familienstand: ledig

Beruflicher Werdegang

seit 01.01.2012 als Research Fellow am AO Institut Davos, Schweiz

Studium

10/2005-11/2011	Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
14.11.2011	2. Ärztliche Prüfung mit Erhalt der Approbation
08/2010-07/2011	Praktisches Jahr
3. Tertial	Innere Medizin in der Zürcher Höhenklinik Davos-Clavadel, Schweiz
2. Tertial	Orthopädie im Spital Münsingen, Schweiz
1. Tertial	Chirurgie im Paul-Gerhardt-Stift Wittenberg

Famulaturen

09/2009	Universitätsklinik und Poliklinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie Halle/Saale
08/2009	Institut für Pathologie Universitätsklinikum Halle/Saale
02-03/2009	Psychiatrisches Krankenhaus Halle
02-04/2008	Praxisfamulatur Sportklinik Halle: Zentrum für Gelenkchirurgie
09/2008	Innere Medizin, kardiologische Abteilung, Elisabeth-Krankenhaus Halle/Saale
08-09/2006	Forschungspraktikum im Mikrobiologischen Institut der Kyorin University Tokyo, Japan
11/2004-03/2005	Medizinische Freiwilligenarbeit in Banepa, Nepal

Schule

08/1997-06/2004	Leuchtenburg Gymnasium Kahla
03/2002-01/2003	High-School-Jahr in Tokyo, Japan
07/1995-06/1997	Sportgymnasium Chemnitz
07/1991-06/1995	Karl-Liebnecht Grundschule Chemnitz

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne Zuhilfenahme unerlaubter fremder Hilfe angefertigt habe. Ich habe keine anderen als die im Literaturverzeichnis angeführten Quellen benutzt. Sämtliche Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen wurden, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Claudia Löbel

Halle, den 11.07.2012

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Die Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Claudia Löbel

Halle, den 11.07.2012

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. rer. nat. Frank Bartel für die sehr gute Betreuung, die anregenden Diskussionen, sowie die anhaltende Geduld, all meine Fragen zu beantworten.

Bei der Arbeitsgruppe Molekularpathologie am Institut für Pathologie möchte ich für die entspannte und freundschaftliche Atmosphäre im Labor bedanken. Besonders der medizinisch-technischen Assistentin Ute Rolle danke ich für die stets sehr zuverlässige Hilfe in allen Belangen der Zellkultur.

Außerdem möchte ich mich bei allen hier nicht namentlich aufgeführten Mitarbeitern des Institutes für Pathologie bedanken, welche mir auf verschiedene Art und Weise bei der Durchführung dieser Arbeit behilflich waren.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie für die stetige Unterstützung und Motivation bedanken.