

Aus dem Institut für Pathologie
der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Analyse von Polymorphismen im MDMX-Gen und deren Einfluss auf die Entstehung
und Progression von Ovarialkarzinomen

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

von Christina Pempe
geboren am 26.01.1982

in Halle (Saale)

Gutachter: 1. Herr PD Dr. Frank Bartel
2. Herr Prof. Dr. Martin Hartmann (Erlangen)
3. Herr Prof. Dr. Ulrich Lehmann-Mühlenhoff (Hannover)

Datum der Eröffnung: 06.06.2012
Datum der Verteidigung: 11.07.2013

Referat

Das Ovarialkarzinom ist die fünfthäufigste Krebserkrankung der Frau. Trotz verbesserter Therapien weist es auch heute noch die höchste Sterberate unter allen gynäkologischen Tumoren auf. MDM2 und MDMX (MDM4) wurden als Onkogene identifiziert, die das Tumorsuppressorgen p53 binden und seine transkriptionelle Aktivität beeinflussen. Verschiedene Arbeiten konnten zeigen, dass Veränderungen im MDM2-Gen den p53-Signalweg abschwächen und die Tumorenstehung beeinflussen. Aufgrund struktureller Ähnlichkeiten zu MDM2 war es das Ziel dieser Arbeit, den Einfluss von Einzelnukleotidpolymorphismen im MDMX-Gen auf die Entstehung und den Krankheitsverlauf von Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom zu untersuchen. Mittels Real-time PCR wurden die SNPs rs3789052 (SNP9518), rs1563828 (SNP31826) und rs4252697 (SNP16620) an einem Kollektiv von 108 Ovarialkarzinompatientinnen analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass SNPs einen signifikanten Einfluss auf das Erkrankungsalter und die Überlebenszeit der Patientinnen besitzen. Frauen mit dem SNP9518 (rs3789052) erkrankten 10 Jahre früher, wenn sie homozygot für das C-Allel sind. Dieser Unterschied besteht nur in der Gruppe der Tumoren ohne ER-Expression ($p=0,046$). Ein ähnliches Ergebnis konnte auch für den SNP16620 (rs4252697) gezeigt werden. Patientinnen mit C/C-Genotyp und Tumoren ohne ER-Expression erkrankten 5,7 Jahre früher als Frauen, deren Tumoren einen Östrogenrezeptor exprimieren ($p=0,022$). Für den SNP31826 (rs1563828) wurde für Patientinnen mit homozygotem Minor-Allel ein 5 Jahre früheres Erkrankungsalter ermittelt ($p=0,087$). Zusätzlich zeigte sich, dass Frauen mit SNP16620 (rs4252697) und homozygotem C-Allel 22 Monate länger überleben als Frauen mit mindestens einem T-Allel ($p=0,027$). Ebenfalls wurde für Patientinnen mit dem SNP31826 (rs1563828) und homozygotem Minor-Allel eine 24 Monate längere Überlebenszeit nachgewiesen, verglichen mit Patientinnen, die einen G/G-Genotyp aufwiesen ($p=0,05$). Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass SNPs im MDMX-Gen mit einer Abschwächung des p53-Signalwegss assoziiert sind und sowohl die Tumorentstehung, als auch den Krankheitsverlauf bei Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom signifikant beeinflussen. Zusätzlich gibt es Hinweise, dass die Tumorentstehung in Abhängigkeit von der Östrogenrezeptorexpression moduliert wird.

Pempe, Christina: Analyse von Polymorphismen im MDMX-Gen und deren Einfluss auf die Entstehung und Progression von Ovarialkarzinomen.
Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 75 Seiten, 2012

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Das Ovarialkarzinom	1
1.1.1 Ätiologie und Pathogenese	1
1.1.2 Histologie.....	3
1.1.3 Klinik und Diagnose	3
1.1.4 Prognosefaktoren	4
1.1.5 Therapie	6
1.2 Der Tumorsuppressor p53.....	7
1.3 MDM2 und MDMX: Regulatoren des Tumorsuppressors p53	8
1.3.1 Das MDM2-Protein	8
1.3.2 MDM2 als Onkogen	8
1.3.3 Das MDMX-Protein.....	10
1.3.4 MDMX als Onkogen.....	11
1.4 Genetische Polymorphismen.....	12
1.5 Polymorphismen im p53-Signalweg.....	13
1.6 Aufgabenstellung.....	15
2. Material	16
2.1 Tumormaterial und Patientengut.....	16
2.2 Primer und Oligonukleotide	17
2.3 Taqman Assays.....	18
2.4 Enzyme	18
2.5 Kits	18
2.6 Chemikalien und Reagenzien	18
2.7 Geräte und Verbrauchsmaterialien	19
2.8 Puffer und Lösungen	19
3. Methoden	21
3.1 DNA-Isolation aus Paraffinmaterial.....	21
3.2 Genotypisierung mittels Real-Time PCR	22
3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)	22
3.4 Sequenzierreaktion.....	23
3.5 DNA-Untersuchungen	24
3.5.1 Agarose-Gelelektrophorese	24
3.5.2 Aufreinigung von DNA aus Agarose-Gel.....	24
3.6 Statistische Auswertung	25
4.1 Die Auswahl der Polymorphismen	26
4.1.1 SNP807 (rs4252668).....	26
4.1.2 SNP9671 (rs3789051) und SNP9518 (rs3789052)	27

4.1.3 SNP16620 (rs4252697)	27
4.1.4 SNP31826 (rs1563828)	27
4.2 Die Analyse der Polymorphismen	27
4.2.1 Polymorphismus SNP807 (rs4255668)	27
4.2.2 Polymorphismus SNP9671 (rs3789051)	28
4.2.3 Polymorphismus SNP9518 (rs3789052)	28
4.2.4 Polymorphismus SNP31826 (rs1563828)	35
4.2.5 Polymorphismus SNP16620 (rs4252697)	42
5. Diskussion	51
5.1 Einfluss der SNPs im MDMX-Gen auf das Erkrankungsalter	51
5.2 Einfluss der SNPs im MDMX-Gen auf das Gesamtüberleben	54
5.3 Einfluss der SNPs im MDMX-Gen auf das rezidivfreie Überleben	55
6. Zusammenfassung	58
Literaturverzeichnis	59

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis:

Abb. 1: Schematisches Modell zur Entstehung des serösen Ovarialkarzinoms	2
Abb. 2: Relatives Überleben in Abhängigkeit vom Tumorstadium.....	5
Abb. 3: Vergleichende Darstellung des MDM2- und MDMX-Proteins.....	10
Abb. 4.: Schematische Darstellung der Lokalisation der SNPs im MDMX-Gen.....	26
Abb. 5: Östrogenrezeptorexpression; SNP9518 (rs3789052)	30
Abb. 6: Diagnosealter in Abhängigkeit vom Östrogenrezeptorstatus; SNP9518 (rs3789052).....	31
Abb. 7: Überlebenskurven in Abhängigkeit vom Östrogenrezeptorstatus; SNP9518 (rs3789052).....	32
Abb. 8: Überlebenskurven in Abhängigkeit vom p53-Mutationsstatus; SNP 9518 (rs3789052).....	34
Abb. 9: Östrogenrezeptorexpression; SNP31826 (rs1563828)	37
Abb. 10: Diagnosealter in Abhängigkeit vom Östrogenrezeptorstatus; SNP31826 (rs1563828).....	38
Abb. 11: Überlebenskurven in Abhängigkeit vom Östrogenrezeptorstatus; SNP31826 (rs1563828).....	40
Abb. 12 : Überlebenskurven in Abhängigkeit vom p53-Mutationsstatus; SNP31826 (rs1563828).....	41
Abb. 13: Östrogenrezeptorexpression; SNP16620 (rs4252697)	44
Abb. 14: Diagnosealter in Abhängigkeit vom Östrogenrezeptorstatus; SNP16620 (rs4252697).....	45
Abb. 15: Überlebenskurven in Abhängigkeit vom Allelstatus; SNP16620 (rs4252697)	46
Abb. 16: Überlebenskurven in Abhängigkeit vom Östrogenrezeptorstatus; SNP16620 (rs4252697).....	47

Tabellenverzeichnis:

Tab. 1: Klinisch-pathologische Daten der Ovarialkarzinompatientinnen	16
Tab. 2: In dieser Arbeit verwendete Primer im MDMX-Gen.....	17
Tab. 3: Lokalisation der SNPs im MDMX-Gen und deren Heterozygotehäufigkeit.....	26
Tab. 4: Häufigkeitsverteilung des SNP807 (rs4255668).....	28
Tab. 5: Häufigkeitsverteilung des SNP9518 (rs3789052).....	29
Tab. 6: Mittlere Überlebenszeiten in Abhängigkeit vom p53-Mutationsstatus; SNP9518 (rs3789052).....	34
Tab. 7: Häufigkeitsverteilung des SNP31826 (rs1563828).....	36
Tab. 8: Mittlere Überlebenszeiten in Abhängigkeit vom p53-Mutationsstatus; SNP31826 (rs1563828).....	42
Tab. 9: Häufigkeitsverteilung des SNP16620 (rs4252697).....	43
Tab. 10: Mittlere Überlebenszeiten in Abhängigkeit vom p53-Mutationsstatus; SNP16620 (rs4252697).....	48
Tab. 11: Zusammenfassung statistischer Ergebnisse der SNPs (Teil 1)	49
Tab. 12: Zusammenfassung statistischer Ergebnisse der SNPs (Teil 2)	50
Tab. 13: Stadieneinteilung des Ovarialkarzinoms (TNM- und FIGO-Klassifikation)	74

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Aqua bidest.	destilliertes Aqua
Arg	Arginin
bp	Basenpaar
BRCA1	breast cancer-associated Gen 1
BRCA2	breast cancer-associated Gen 2
°C	Grad Celsius
CT	Computertomographie
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-Triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytosin-5'-Triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanin-5'-Triphosphat
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-Triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EB-Puffer	Extraktionspuffer
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Östrogenrezeptor
ER +	positive Östrogenrezeptorexpression
ER -	keine Östrogenrezeptorexpression
Ex	Exon
Expr.	Expression
et al.	et altera
FAM	fluoreszierender Farbstoff
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
fl-MDMX	full-length MDMX
HCl	Chlorwasserstoff
HLA	human leukocyte antigen
HNPCC	hereditäres non-polypöses Kolonkarzinom
In	Intron
IRS	immunreactive Score
KCl	Kaliumchlorid
kum.	kumuliert
LIF	Leukemia inhibitory factor
MDM2	murine double minute Gen 2

MDMX (MDM4)	murine double minute 4 homolog
MDMX-S	MDMX short form
MDMX-L	MDMX long form
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
miRNA	microRNA
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
mut	mutiert
NaCl	Natriumchlorid
NES	nuclear-export signal
NLS	nuclear-localization signal
NoLS	nucleolar-localization signal
PET	Positronenemissionstomographie
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pro	Prolin
rpm	rounds per minute
RT-PCR	real time PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNP	single nucleotide polymorphism
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
Überexpr.	Überexpression
UTR	untranslatierter Bereich
UV	Ultraviolett
VIC	fluoreszierender Farbstoff
WHO	World Health Organisation
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1 Das Ovarialkarzinom

In Deutschland erkrankten 2004 etwa 10.000 Frauen an einem Ovarialkarzinom. Damit steht es, mit einem Anteil von 4,9%, an fünfter Stelle aller malignen Tumoren der Frau und ist nach dem Endometriumkarzinom der zweithäufigste weibliche Genitaltumor (Robert-Koch Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2008). Mit zunehmendem Alter steigt das Erkrankungsrisiko und zeigt einen Häufigkeitsgipfel nach der Menopause. Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt bei 65 Jahren. Maligne Ovarialtumoren besitzen von allen gynäkologischen Tumorerkrankungen die höchste Mortalität und weisen eine 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate von etwa 40% auf (Tumorregister München, 2011). Weltweit bestehen große Unterschiede zwischen den Kontinenten. Hohe Inzidenzraten finden sich in Nordamerika und Westeuropa, während in Japan und in den Entwicklungsländern die Inzidenz geringer ist (Pisani et al., 2002).

1.1.1 Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie des Ovarialkarzinoms ist weitgehend ungeklärt. Es wird vermutet, dass reproduktive Faktoren eine wesentliche Rolle spielen. Wichtige Risikofaktoren für die Tumorentstehung sind familiäre Belastung, Kinderlosigkeit, Infertilität, frühe Menarche und späte Menopause. Protektiv hingegen wirken Schwangerschaft, Stillen, orale Kontrazeptiva und Sterilisation (Riman et al., 2004). Hieraus ergeben sich zwei wesentliche Hypothesen zur Entstehung des epithelialen Ovarialkarzinoms:

1. Infolge ständiger Ovulationen kommt es zu Mikrotraumen und Reparaturvorgängen an der epithelialen Ovaroberfläche. In dessen Folge steigt das Risiko für Zellmutationen und Neoplasie (Fathalla, 1971).
2. Hohe Gonadotropinwerte stimulieren das ovarielle Stroma und führen zu erhöhten Östrogenwerten, die die epitheliale Proliferation und maligne Zelltransformation fördern (Cramer und Welch, 1983).

Basierend auf molekulargenetischen und morphologischen Studien entwickelten Shih und Kurman ein Modell, das zwei Mechanismen der Tumorentstehung unterscheidet (Shih und Kurman, 2004; Abb. 1). Tumoren vom Typ I werden als low-grade Karzinome charakterisiert und entwickeln sich schrittweise aus Zystadenomen und Adenofibromen. Sie weisen ein langsames Tumorwachstum auf und befinden sich zum Zeitpunkt der Diagnosestellung in einem frühen klinischen Stadium (Shih und Kurman, 2004). 60% der low-grade Karzinome besitzen aktivierende Mutationen in den

Onkogenen BRAF oder KRAS, welche in high-grade Karzinomen kaum zu finden sind (Singer et al., 2005). BRAF und KRAS aktivieren über eine Signalkaskade die Zielkinasen MAPK und ERK (Robinson und Cobb, 1997), die für die Transmission von Wachstumssignalen in den Zellkern verantwortlich sind. Tumoren vom Typ II werden als high-grade Karzinome bezeichnet und betreffen 75% der epithelialen Ovarialtumoren. In diesen Tumoren finden sich hauptsächlich Mutationen in den Tumorsuppressorgenen p53 und BRCA1/2 (Shaw et al., 2002; Shih und Kurman 2004; Press et al., 2008). High-grade Karzinome wachsen schnell und aggressiv, zeigen keine nachweisbaren Vorläuferläsionen und befinden sich zum Zeitpunkt der Diagnose meistens in einem fortgeschrittenen klinischen Stadium mit Metastasierung (Shih und Kurman, 2004).

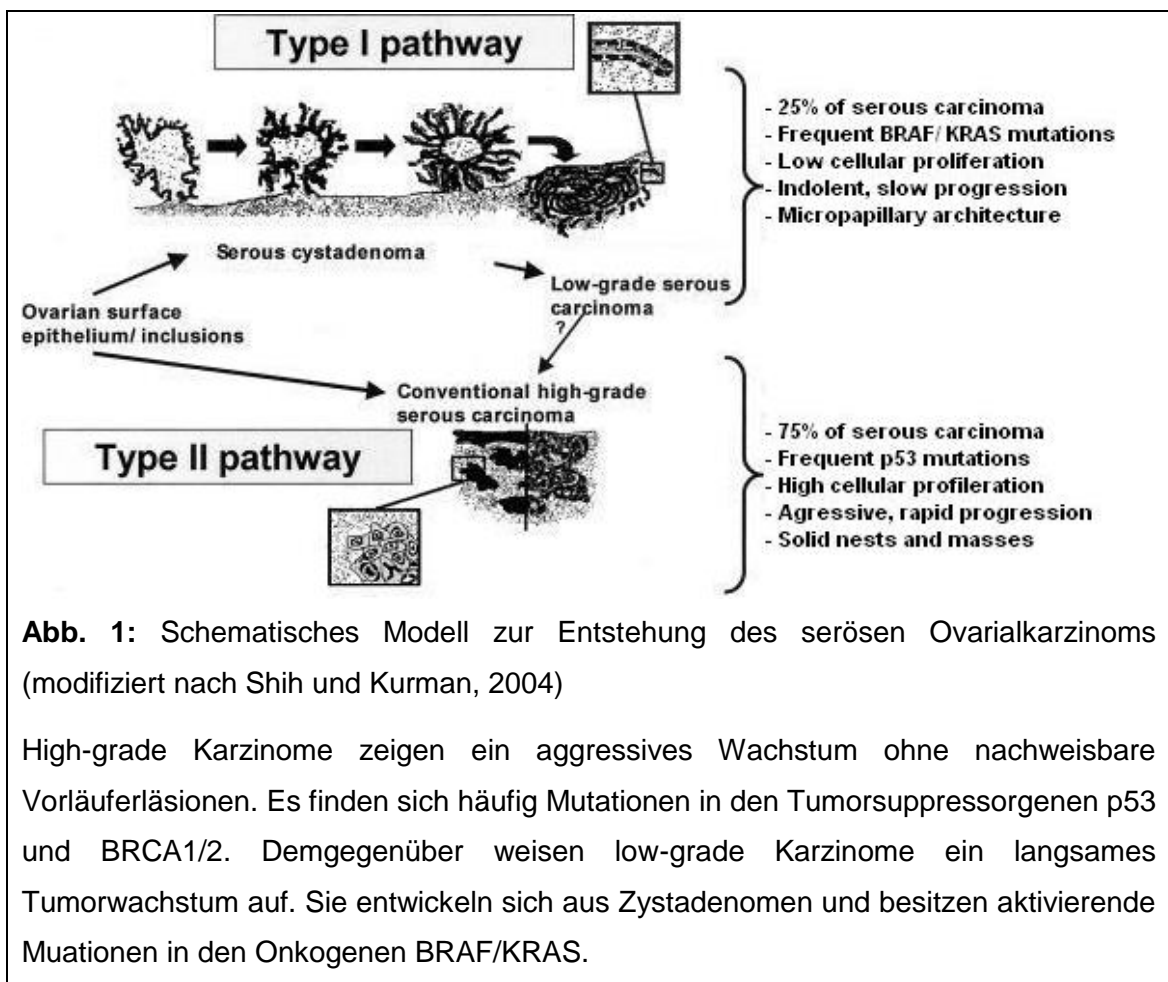


Abb. 1: Schematisches Modell zur Entstehung des serösen Ovarialkarzinoms (modifiziert nach Shih und Kurman, 2004)

High-grade Karzinome zeigen ein aggressives Wachstum ohne nachweisbare Vorläuferläsionen. Es finden sich häufig Mutationen in den Tumorsuppressorgenen p53 und BRCA1/2. Demgegenüber weisen low-grade Karzinome ein langsames Tumorwachstum auf. Sie entwickeln sich aus Zystadenomen und besitzen aktivierende Mutationen in den Onkogenen BRAF/KRAS.

In Deutschland erkranken etwa 1% aller Frauen in ihrem Leben an einem Ovarialkarzinom (Friedl und Propping, 2010). Die familiäre Disposition stellt dabei einen weiteren Risikofaktor für die Entwicklung des Tumors dar (Amos und Struewing, 1993). In 5-10% aller epithelialen Ovarialkarzinome finden sich genetische Veränderungen in den Genen BRCA1 (Chromosom 17q21) und BRCA2 (Chromosom

13q12), deren Genprodukte an den zellulären DNA-Reparaturmechanismen beteiligt sind (Welch und King, 2001). Das kumulative Risiko, im Alter von 70 Jahren an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, beträgt für BRCA2 Mutationen 40% und für BRCA1 Mutationen 18% (Chen und Parmigiani, 2007). Insgesamt ist das Risiko an einem Ovarialkarzinom zu erkranken für Patientinnen mit familiärer Disposition 20-fach höher als in der Normalbevölkerung. Ein weiterer Risikofaktor besteht für weibliche Angehörige aus Familien mit hereditären nichtpolypösen Darmkarzinomen (HNPCC).

1.1.2 Histologie

Die histologische Einteilung der Ovarialkarzinome erfolgt auf Grundlage der aktuellen WHO-Klassifikation. Demnach können sie in epitheliale Tumoren, Keimstrang-Stromatumoren und Keimzelltumoren unterteilt werden (Tavassoli und Devilee, 2003). Karzinome, die vom Oberflächenepithel des Ovars ausgehen, sind für etwa 90% der malignen Ovarialtumoren verantwortlich (Stalsberg et al., 1988). Die wichtigsten histologischen Typen sind das seröse (30-70%), das muzinöse (5-20%) und das endometroide (10-20%) Ovarialkarzinom (Rosen et al., 2009). Wesentlich seltener werden Klarzell-, Übergangszell- oder undifferenzierte Karzinome beobachtet. Ovarialkarzinome breiten sich früh intraabdominal aus, wobei eine Metastasierung bevorzugt in das Omentum majus und das Peritoneum erfolgt. Zusätzlich wird eine lymphatische Tumorausbreitung in die pelvinen und paraaortalen Lymphknoten beobachtet. Hämatogene Metastasen sind selten und treten in der Regel erst in fortgeschrittenen Krankheitsstadien auf (Böcker et al., 2008). Klinisch und morphologisch lassen sich Borderline-Tumoren von den malignen Ovarialkarzinomen abgrenzen. 5-10% aller epithelialen Neubildungen sind Borderline-Tumoren. Sie sind histologisch definiert durch eine verstärkte atypische Epithelproliferation mit erhöhter Mitosezahl und nukleärer Atypie, aber ohne destruierende Stromainfiltration (Prat, 2004). Das Erkrankungsalter liegt bei 45 Jahren und etwa 10 Jahre unter dem invasiver Ovarialkarzinome. Mit wenigen Ausnahmen ist die Prognose für Patientinnen mit einem Borderline-Tumor bei entsprechender Therapie positiv (Harris et al., 1992).

1.1.3 Klinik und Diagnose

Das Ovarialkarzinom bleibt in der Regel lange symptomlos, so dass 70% der Tumoren erst in einem fortgeschrittenen Stadium, FIGO III-IV, diagnostiziert werden (Landis et al., 1999). Die 5-Jahresüberlebensrate der Patientinnen beträgt in diesen Stadien lediglich 20-30% (Tumorregister München, 2011) und kann als wesentlicher Grund für die niedrige Gesamtüberlebensrate von etwa 40% angesehen werden (Högberg et al.,

1993). Anamnestisch berichten viele Patientinnen über unspezifische gastrointestinale Symptome wie Bauchschmerzen, Völlegefühl, Obstipation, Übelkeit und Erbrechen, sowie über einen Gewichtsverlust bei gleichzeitiger Zunahme des Bauchumfanges. Zusätzlich können urologische Beschwerden wie Pollakisurie oder eine zunehmende Harninkontinenz bestehen (Kreienberg, 2009). Akute abdominale Schmerzen können durch große Ovarialtumoren verursacht werden oder durch Verwachsungen des Tumors im kleinen Becken entstehen (Kreienberg, 2009). Neben der klinischen bimanuellen Palpation hat die transvaginale Sonographie den höchsten Stellenwert in der Diagnostik des Ovarialkarzinoms (Die Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, 2010). Weitere bildgebende Verfahren (zum Beispiel MRT, CT, PET) werden additiv zur sonographischen Untersuchung eingesetzt und haben ihre Bedeutung im präoperativen Staging und in der Rezidivdiagnostik. Das tumorassoziierte Antigen CA-125 ist im Serum bei über 80% der Patientinnen mit einem epithelialen Ovarialkarzinom erhöht (Bast et al., 1983). Jedoch finden sich erhöhte CA-125 Werte auch bei einer Vielzahl anderer Malignome, wie Mamma-, Endometrium-, Zervix-, Bronchial- und Kolonkarzinome, sowie bei benignen gynäkologischen Erkrankungen (Sjövall et al., 2002; Moss et al., 2005). Aufgrund der geringen Spezifität und Sensitivität kann der Tumormarker CA-125 nicht als diagnostisches Mittel herangezogen werden, sondern hat seinen Stellenwert in der Rezidiverkennung und der Therapieerfolgskontrolle (Helzlsouer et al., 1993; Riedinger et al., 2008). Für ein generelles Screening sind die im Moment zur Verfügung stehenden Methoden nicht geeignet (Bast, 2003; Fields und Chevlen, 2006; van Nagell et al., 2007).

1.1.4 Prognosefaktoren

Die Prognose wird wesentlich durch klinische Faktoren wie Stadium der Erkrankung, Tumorgrading und dem postoperativ verbliebenen Tumorrest bestimmt. Weitere wichtige Faktoren für das Überleben der Patientinnen sind das Lebensalter und der präoperative Allgemeinzustand (Die Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, 2010). Von prognostischer Relevanz ist ebenfalls der histologische Subtyp. Dabei haben klarzellige und muzinöse Ovarialtumoren eine ungünstigere Prognose als seröspapilläre und endometroide Karzinome. Zusätzlich entwickeln sie häufiger eine Resistenz auf platinhaltige Chemotherapeutika (Malkasian et al., 1984; Goff et al., 1996; Hess et al., 2004; Hornung et al., 2004). Das Tumorstadium zum Zeitpunkt der Diagnosestellung hat eine zentrale prognostische Bedeutung für das Ovarialkarzinom (Brun et al., 2000). Die klinische Stadieneinteilung des

Ovarialkarzinoms erfolgt nach der Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO) (siehe Tab. 12). 23% der Ovarialtumoren werden im Stadium FIGO I diagnostiziert (Tumorregister München, 2011) (Abb. 2), welches eine 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von etwa 90% aufweist (Chung et al., 2007). Die Mehrzahl der Patientinnen befinden sich jedoch zum Zeitpunkt der Diagnosestellung in einem fortgeschrittenen Tumorstadium, FIGO IIIC-IV, das mit einem deutlich schlechteren Überleben von unter 30% verbunden ist (Tumorregister München, 2011) (Abb. 2).

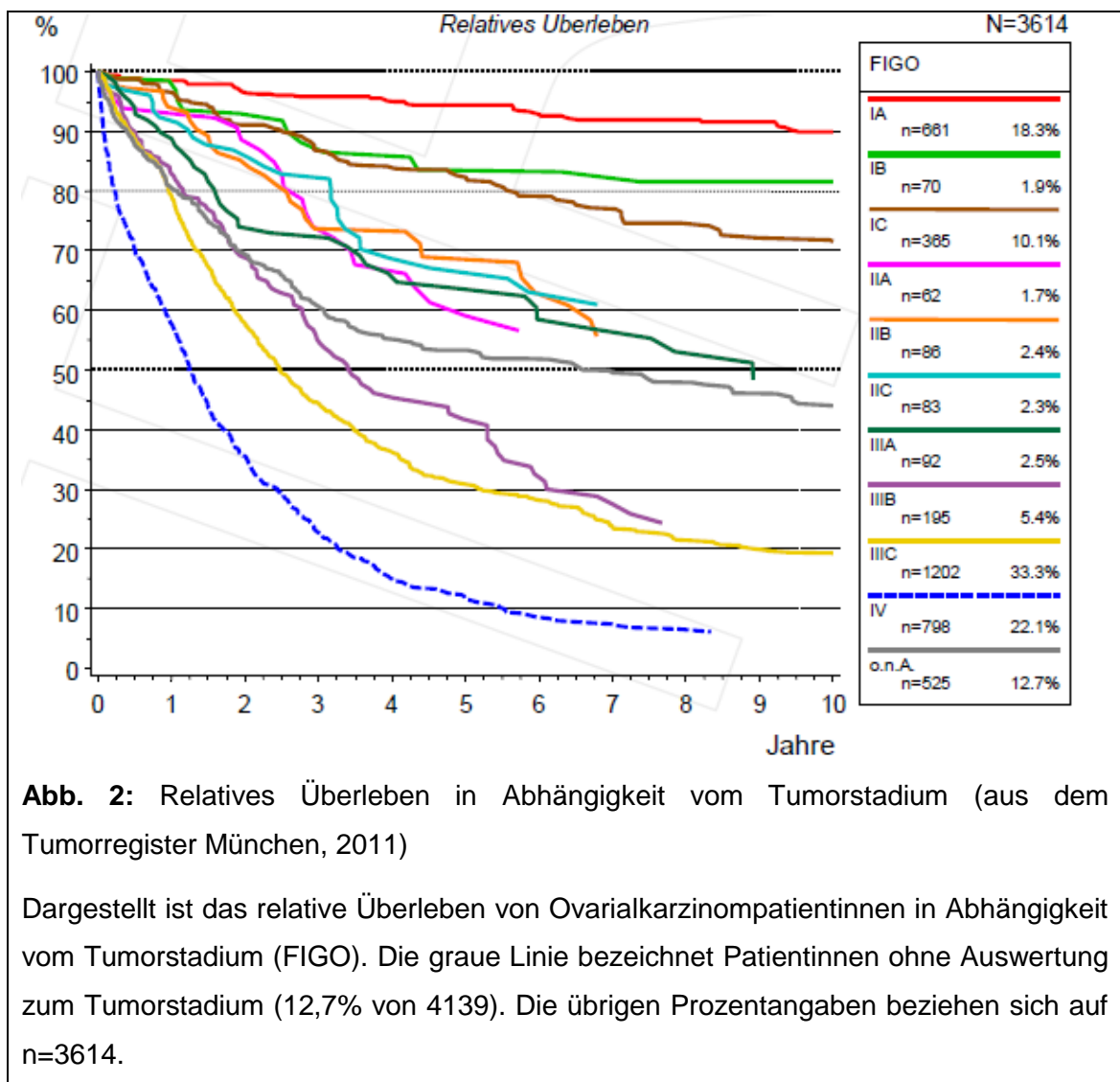


Abb. 2: Relatives Überleben in Abhängigkeit vom Tumorstadium (aus dem Tumorregister München, 2011)

Dargestellt ist das relative Überleben von Ovarialkarzinompatientinnen in Abhängigkeit vom Tumorstadium (FIGO). Die graue Linie bezeichnet Patientinnen ohne Auswertung zum Tumorstadium (12,7% von 4139). Die übrigen Prozentangaben beziehen sich auf n=3614.

Der postoperative Tumorrest bestimmt wesentlich die Prognose beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom (Griffiths, 1975; Bertelsen, 1990; Le et al., 1997). Er ist derzeit der einzige Prognosefaktor, der sich effektiv beeinflussen lässt. Die beste Prognose besitzen Patientinnen ohne nachweisbaren postoperativen Tumorrest (Peiretti et al., 2010; Wimberger et al., 2010). Jedoch weisen auch Patientinnen mit einem

verbliebenen Residualtumor unter 1 cm ein deutlich besseres Gesamtüberleben auf, als Patientinnen mit einem größeren Tumorrest (Hoskins et al., 1994; Bolis et al., 1996). In einer großen Metaanalyse von Bristow et al. konnte gezeigt werden, dass eine Steigerung der Tumorreduktionsrate um 10%, zu einer Verlängerung des Gesamtüberlebens von 5,5% führt (Bristow et al., 2002). Das histologische Grading ist hauptsächlich in den frühen klinischen Stadien von relevanter Bedeutung (Dembo et al., 1990; Villa et al., 1998), während der prognostische Wert beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom widersprüchlich ist. Eine mögliche Ursache wird hierbei im fehlenden internationalen Standard zum Grading des Ovarialkarzinoms gesehen (Silverberg, 2000). Weitere prognostische Faktoren, die zu einer Verbesserung der Überlebenschancen führen, sind das Lebensalter bei Erstdiagnose und der präoperative Allgemeinzustand (Swenerton et al., 1985). In einer großen Metaanalyse konnte gezeigt werden, dass Patientinnen über 69 Jahre, unabhängig von Stadium, Resttumor und Allgemeinzustand, eine signifikant schlechtere Prognose aufweisen als jüngere Patientinnen (Thigpen et al., 1993).

1.1.5 Therapie

Die Standardtherapie des Ovarialkarzinoms besteht aus radikaler Operation mit Entfernung aller makroskopisch erkennbaren Tumoranteile und einer anschließenden Chemotherapie. Während der Operation ist die chirurgische Exploration für die Festlegung des Stadiums und die Entscheidung über eine adjuvante Chemotherapie bedeutsam (Die Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, 2010). In den Frühstadien (FIGO I-IIA) haben Ovarialkarzinome eine gute Prognose, und häufig kann allein durch Operation (FIGO IA) oder durch Operation und adjuvante Chemotherapie eine dauerhafte Heilung erreicht werden. Voraussetzung ist ein adäquates und komplettes chirurgisches Staging. Nach verschiedenen Studien kann jedoch davon ausgegangen werden, dass bei etwa 30% der untersuchten Patientinnen mit einem initial diagnostiziertem Frühstadium im Rahmen einer Zweitlaparotomie ein Up-grading vorgenommen werden muss (Young et al., 1983; Schueler et al., 1998). In einem fortgeschrittenen Tumorstadium (FIGO IIB-IV) sollte eine maximale Tumorreduktion während der Primäroperation angestrebt werden, da hierdurch das Überleben der Patientinnen signifikant verbessert werden kann (Bristow et al., 2002; Die Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, 2010). Nach der operativen Tumorentfernung wird eine adjuvante Chemotherapie mit einer platinhaltigen Verbindung und Paclitaxel durchgeführt (Du Bois et al., 2005; Die Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, 2010). Trotz adäquater

Primärtherapie erleidet ein Großteil der Patientinnen nach einem krankheitsfreien Intervall ein Tumorrezidiv. Die Rezidive werden nach dem Zeitpunkt ihres Auftretens in Frührezidive (< 6 Monate platinfreie Zeit) und Spätrezidive (> 6 Monate platinfreie Zeit) eingeteilt (Herzog und Pothuri, 2006). Im Unterschied zum prognostisch ungünstigeren Frührezidiv profitieren Patientinnen mit einem Spätrezidiv von einer sekundären Operation (Jänicke et al., 1992) und einer platinhaltigen Reinduktions-Chemotherapie (Markman et al., 1991). Dabei steigt die Chance, erneut tumorfrei zu bleiben, mit der Länge des klinischen Remissionsintervalls. Im Gegensatz dazu, ist eine weitere Operation beim Frührezidiv nicht sinnvoll, da hierdurch keine Lebensverlängerung erreicht werden kann (Schmalfeldt, 2009). Zusätzlich besteht bei diesen Patientinnen häufig eine platinrefraktäre Situation, so dass in diesen Fällen eine gut verträgliche Zweitlinienchemotherapie mit Etoposid, Paclitaxel, Topotecan, Gemcitabin oder verschiedenen Alkylanzien in Betracht gezogen werden kann. Die Prognose insgesamt wird dabei jedoch kaum verbessert (Markman und Bookman, 2000).

1.2 Der Tumorsuppressor p53

Der humane Tumorsuppressor p53 reguliert als potenter Transkriptionsfaktor nach DNA-Schädigung die Expression von Genen, die an der Zellzykluskontrolle, der DNA-Reparatur oder der Einleitung der Apoptose beteiligt sind (Vogelstein et al., 2000). Diese Eigenschaft führt dazu, dass p53 in der Literatur auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet wird (Lane, 1992). Mutationen und Funktionsverlust des Proteins sind eng mit der Entstehung maligner Tumoren assoziiert. Im Jahr 1990 wurde deutlich, dass ein Verlust der Tumorsuppressorfunktion von p53 für die seltene Erbkrankheit, dem Li-Fraumeni-Syndrom, verantwortlich ist. Die Betroffenen besitzen ein ererbtes mutiertes Allel des p53-Gens, das andere Allel ist intakt. Durch zusätzliche Mutation des Wildtyp-Allels entwickeln Patienten bereits im Kindes- und frühen Erwachsenenalter multiple Tumoren (Malkin et al., 1990). Mutationen des p53-Gens können in über 50% der menschlichen Tumoren nachgewiesen werden (Vogelstein et al., 2000). Zusätzlich erhöhen Veränderungen im p53-Gen das Risiko, dass Karzinome auf konventionelle Radio- und Chemotherapie eine Resistenz entwickeln (Lee und Bernstein, 1993; Mueller und Eppenberger, 1996). Neben seiner Schlüsselfunktion in der Tumorsuppression fördert p53 auch die Blastozystenimplantation, indem es die Expression eines *Leukemia inhibitory factor* (LIF) im Uterus induziert (Stewart et al., 1992; Hu et al., 2007b). Intrauterin wurden in p53-negativen Mäusen niedrigere Konzentrationen an LIF gemessen, als in p53-positiven Mäusen. Dadurch kommt es zu einer erniedrigten Implantations- und Fertilitätsrate in p53-negativen Mäusen (Hu et al.,

2007b). Diese Erkenntnisse konnten auch auf den Bereich der menschlichen Reproduktion übertragen werden (Kaang et al., 2009).

1.3 MDM2 und MDMX: Regulatoren des Tumorsuppressors p53

1.3.1 Das MDM2-Protein

Das „murine double minute“ 2-Gen wurde ursprünglich in spontan transformierten 3T3 Maus-Zelllinien entdeckt (Fakharzadeh et al., 1991), wobei eine Überexpression des MDM2-Genproduktes als Ursache für die Zelltransformation beschrieben wurde (Cahilly-Snyder et al., 1987; Fakharzadeh et al., 1991). Im Jahr 1992 wurde das dazugehörige humane MDM2-Gen auf Chromosom 12q13-14 identifiziert (Oliner et al., 1992). Das MDM2-Protein bindet an das Tumorsuppressorgen p53 und blockiert die p53-vermittelte Transaktivierung (Momand et al., 1992). Da p53 wiederum die Transkription des MDM2-Gens aktiviert, bildet sich ein negativer Rückkopplungsmechanismus, der beide Proteine auf einem niedrigen Niveau hält (Wu et al., 1993). Mit Hilfe der RING-Finger-Domäne am C-terminalen Ende fungiert das MDM2-Protein als E3-Ubiquitin Ligase und besitzt die Fähigkeit, p53 zu binden und zu ubiquitinieren (Haupt et al., 1997; Kubbutat et al., 1997). Es konnte gezeigt werden, dass eine höhere Anzahl an Ubiquitin-Molekülen notwendig ist, um p53 effizient degradieren zu können. Dabei ist die Fähigkeit zur Mono- oder Polyubiquitinierung abhängig von der MDM2-Proteinexpression. Geringe MDM2-Proteinmengen führen zu einer Monoubiquitinierung des p53-Proteins, während große MDM2-Proteinmengen eine Polyubiquitinierung bewirken (Li et al., 2003). Außerdem kann MDM2 sich selbst ubiquitinieren und seinen eigenen Abbau induzieren (Fang et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, dass DNA-Schäden und Stresssignale eine posttranslationale Modifikation von p53 bewirken. Nachfolgend ist eine Interaktion mit MDM2 nicht mehr möglich, so dass das p53-Protein in der Zelle akkumuliert (Iwakuma und Lozano, 2003). Des Weiteren katalysiert MDM2 den Transport von p53 aus dem Zellkern in das Zytoplasma, um die Degradierung des Tumorsuppressors einzuleiten (Tao und Levine, 1999).

1.3.2 MDM2 als Onkogen

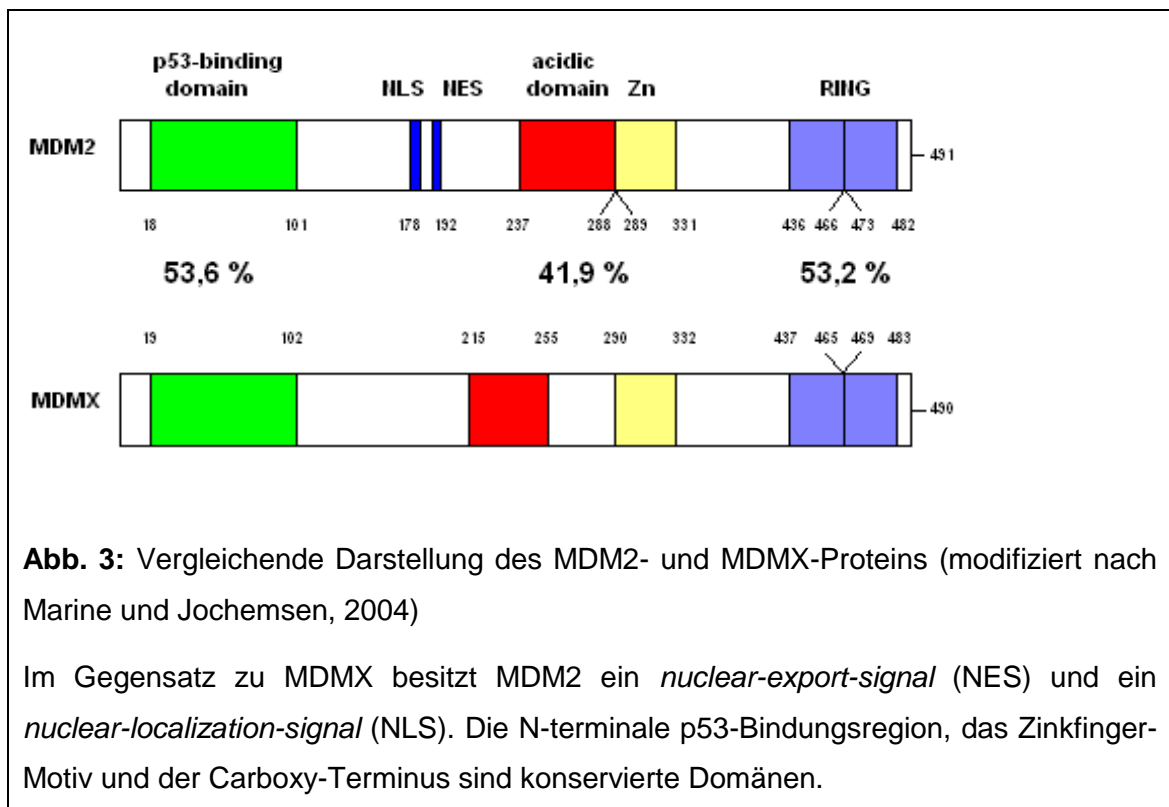
In 50% der menschlichen Tumoren ist p53 durch Genmutation inaktiviert. In vielen anderen Tumoren mit Wildtyp p53-Gen, ist die Funktion durch Alterationen im p53-Signalweg gestört (Vogelstein et al., 2000). Das MDM2-Onkogen ist ein wichtiger negativer Regulator des p53-Proteins. In gesunden Zellen befinden sich MDM2 und

p53 in einem natürlichen und fein tarierten Gleichgewicht, das durch komplexe Mechanismen und Mediatoren reguliert und aufrecht erhalten wird (Wu et al., 1993). Bereits geringe Änderungen der MDM2-Proteinexpression, hervorgerufen beispielsweise durch Einzelnukleotidpolymorphismen (single nucleotide polymorphism [SNPs]), können das sensible Gleichgewicht stören (Bond et al., 2004). In knock-out Mäusen konnte gezeigt werden, dass ein Verlust an MDM2 mit einer hohen embryonalen Letalität verbunden ist, vermutlich weil in ihren Zellen die p53-vermittelte Apoptose induziert wird. Im Gegensatz dazu überlebten Mäuse mit einem zusätzlichen Verlust von p53 (Doppelknockout) und zeigten eine normale Entwicklung (Jones et al., 1995). Zelluntersuchungen ergaben, dass stark erniedrigte MDM2-Proteinlevel mit einer erhöhten p53-Transkription und Apoptoseinduktion verbunden sind, während eine moderate Erniedrigung an MDM2 suppressiv auf die Tumorentstehung wirkt (Mendrysa et al., 2006; Poyurovsky und Prives, 2006). Für eine Überexpression von MDM2 konnte gezeigt werden, dass die Wildtyp p53-Funktion ohne genetische Mutation inaktiviert werden kann (Chen et al., 1996). In diesem Fall ist die Wirkung der Überexpression gleichzusetzen mit einem Verlust von p53 (Oliner et al., 1992). Mäuse mit überexprimierten MDM2-Protein entwickelten überdurchschnittlich viele Tumoren, vor allem solche, die auch in p53-mutierten Mäusen identifiziert wurden (Toledo und Wahl, 2006). Untersuchungen zum Einfluss der MDM2-Überexpression auf das Gesamtüberleben konnten nachweisen, dass eine MDM2-Überexpression in Weichteilsarkomen, lymphatischen Leukämien und in Gliomen mit einer schlechten klinischen Prognose assoziiert ist. Andere Arbeiten zeigten jedoch für Melanome und kleinzellige Lungenkarzinome eine positive Korrelation zwischen einer MDM2-Überexpression und dem Gesamtüberleben der Patienten (Onel und Cordon-Cardo, 2004). Eine Proteinüberexpression kann durch verschiedene Mechanismen, zum Beispiel Erhöhung der Transkriptions- und Translationsrate, der Genamplifikation oder durch alternative Spleißvarianten erfolgen (Momand et al., 1998). Für menschliche Tumoren wird in der Literatur eine MDM2-Amplifikationsfrequenz von insgesamt 5-10% angegeben (Toledo und Wahl, 2006; Hollstein und Hainaut, 2010). Die höchste Frequenz wurde in Weichteiltumoren beobachtet (etwa 30%), während für Ovarialkarzinome eine Häufigkeit von 3,1% angegeben wird (Momand et al., 1998). Das Spleißen der prä-mRNA stellt einen Feinregulationsmechanismus dar, durch den ebenfalls die Proteinexpression reguliert werden kann. Neben der eigentlichen mRNA konnten weitere onkogene Spleißvarianten identifiziert werden, denen häufig die p53-bindende Region fehlt (Sigalas et al., 1996; Matsomoto et al., 1998; Kraus et al., 1999). Diese Spleißvarianten wurden häufiger in high-grade als in low-grade Karzinomen

gefunden (Bartel et al., 2001). Die Ergebnisse verschiedener Studien zur Prognose von Tumoren mit Spleißvarianten sind widersprüchlich. Während einige Autoren zeigten, dass die Expression von aberranten MDM2-Spleißvarianten bei Brust- und Hirntumoren mit einer schlechten Prognose korreliert (Matsomoto et al., 1998; Lukas et al., 2001), konnten andere Studien bei Weichteilsarkompatienten keinen Zusammenhang herstellen (Bartel et al., 2001).

1.3.3 Das MDMX-Protein

MDMX (auch als MDM4 bezeichnet) wurde 1996 als weiteres p53-assoziiertes Protein entdeckt (Shvarts et al., 1996). Das humane MDMX-Gen ist auf Chromosom 1q32 lokalisiert und kodiert für ein Protein aus 490 Aminosäuren (Shvarts et al., 1997). Der Vergleich der Proteinstruktur von MDMX und MDM2 zeigt strukturelle Ähnlichkeiten (Abb. 3).



Die am stärksten konservierten Domänen sind die N-terminale p53-Bindungsregion, das Zinkfinger-Motiv und der Carboxy-Terminus (Shvarts et al., 1996). Analog zu MDM2, ist auch MDMX in der Lage, p53 zu binden und seine transkriptionelle Aktivität zu inhibieren (Shvarts et al., 1996). Jedoch kann MDMX die Stabilität von p53 vermutlich nicht unabhängig von MDM2 regulieren (Francoz et al., 2006). MDMX und

MDM2 interagieren über ihre C-terminale RING-Finger-Domäne miteinander und bilden Heterodimere. Untersuchungen ergaben, dass MDMX-MDM2 Heterodimere stabiler sind, als ihre homo-oligomere Proteinform (Tanimura et al., 1999). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die RING-Finger-Domäne essentiell für die Funktion als E3-Ubiquitin-Ligase ist (Sharp et al., 1999; Tanimura et al., 1999). Im Gegensatz zu MDM2 fungiert MDMX nicht selbst als E3-Ubiquitin-Ligase, sondern stabilisiert MDM2 und unterstützt dessen Ubiquitinierung von p53 (Jackson und Berberich, 2000; Stad et al., 2000; Linares et al., 2003). Des Weiteren moduliert MDMX durch Interaktion mit MDM2 dessen Autoubiquitinierung und kann somit den Abbau von MDM2 regulieren (Tanimura et al., 1999). Die Degradierung von MDMX selbst kann erst nach Bindung von MDM2 an MDMX erfolgen (de Graaf et al., 2003; Pan und Chen, 2003). Im Gegensatz zu MDM2, gibt es für MDMX bis heute keinen Beweis, dass die Transkription von MDMX durch zelluläre Stresssignale moduliert wird. Wahrscheinlich wird die Aktivität von MDMX über seine Proteinexpression reguliert (Marine et al., 2006). Weitere Untersuchungen ergaben, dass sich in beiden Proteinen ein *nucleolar-localization signal* (NoLS) in der RING-Finger-Domäne befindet. Zusätzlich besitzt das MDM2-Protein ein *nuclear-export-signal* (NES) und ein *nuclear-localization-signal* (NLS), während diese im MDMX-Protein nicht zu finden sind. Daraus lässt sich ableiten, dass MDMX hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert ist (Li et al., 2002) und MDM2 für den Transport in den Zellkern benötigt (Migliorini et al., 2002a; Marine und Jochemsen, 2004).

1.3.4 MDMX als Onkogen

Das humane MDMX-Gen befindet sich auf Chromosom 1q32, in einer Region, die in Karzinomen häufig amplifiziert wird (Ried et al., 1995; Tirkkonen et al., 1998). Untersuchungen für MDMX ergaben, dass ein Verlust an MDMX bei knock-out Mäusen mit einer hohen embryonalen Letalität verbunden ist, während ein zusätzlicher Verlust von p53 zu einer normalen Entwicklung führt (Parant et al., 2001; Finch et al., 2002; Migliorini et al., 2002b). Die Ursache für die hohe Sterberate der Embryonen liegt in einer verminderten Zellproliferation, welche zu einem verzögertem Wachstum und einer p53-induzierten Apoptose des Neuroepithels führt (Finch et al., 2002; Migliorini et al., 2002b). Francoz et al. beschrieben weiterhin, dass im Gegensatz zum alleinigen Fehlen von MDM2, ein gleichzeitiger Verlust von MDM2 und MDMX nicht mit einer zusätzlichen Erhöhung der p53-Menge verbunden ist. Daraus ergeben sich Hinweise, dass MDMX die Stabilität von p53 nicht unabhängig von MDM2 reguliert (Francoz et al., 2006). Erstmals wurde für humane Gliome beschrieben, dass eine gesteigerte

MDMX-Genamplifikation und Proteinexpression ein neuer molekularer Mechanismus ist, der ohne Mutation von p53 oder MDM2-Amplifikation zu einem Verlust des p53 kontrollierten Wachstums führt (Riemenschneider et al., 1999). Eine MDMX-Proteinüberexpression wurde insgesamt in 17,2% der Karzinome (Toledo und Wahl, 2006) und in 30% der Tumorzelllinien nachgewiesen. In allen Fällen korrelierte die Amplifikation von MDMX mit dem Wildtyp p53-Genstatus und dem Fehlen einer gleichzeitigen MDM2-Amplifikation (Ramos et al., 2001; Danovi et al., 2004). Zellen mit erhöhter MDMX-Proteinexpression oder Amplifikation können demnach das p53-Netzwerk weniger effizient aktivieren, um auf DNA-Schäden zu reagieren (Gilkes et al., 2006). Die Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass MDMX bei Überexpression als Onkogen fungiert und die Tumorentstehung beim Menschen beeinflusst (Marine et al., 2006). Analog zu MDM2 wurden auch für MDMX alternative Spleißvarianten identifiziert. Im Jahr 1999 entdeckten Rallapalli et al. eine neue, kürzere Transkriptionsform, die als MDMX-S (Short-Form) bezeichnet wird. Diese besitzt im Vergleich zur full-length-MDMX-Form (fl-MDMX) eine 10-fach höhere Bindungskapazität für p53 und ist somit in der Lage, die p53-vermittelte Transkriptionsaktivität stärker als fl-MDMX zu hemmen (Rallapalli et al., 1999). Dabei korreliert die Menge an MDMX-S nicht mit einer Erhöhung von fl-MDMX-mRNA, sodass eine Überexpression von MDMX-S vermutlich unabhängig vom Level der MDMX-mRNA erfolgt (Mancini et al., 2009). Die Arbeitsgruppe um Bartel et al. beschrieb für Weichteilsarkompatienten eine signifikant schlechtere Prognose bei nachgewiesener erhöhter MDMX-S-mRNA (Bartel et al., 2005). Interessanterweise wurde in dieser Studie keine Assoziation zwischen MDMX-S-Überexpression und p53-Status gefunden, sodass für die Funktion von MDMX-S vermutlich andere Mechanismen notwendig sind. Eine weitere Spleißvariante (MDMX-211) wurde in Schilddrüsenkarzinomen und in kleinzelligen Lungentumoren identifiziert (Giglio et al., 2005; Prodosmo et al., 2008). Dieser Variante fehlt die komplette p53-Bindungsregion, so dass p53 nicht von MDMX-211 gebunden werden kann. Jedoch kann MDMX-211 über die RING-Finger-Domäne mit MDM2 interagieren und ist in der Lage MDM2 zu stabilisieren, um eine Degradierung von p53 einzuleiten (Giglio et al., 2005).

1.4 Genetische Polymorphismen

Als genetischer Polymorphismus wird das gleichzeitige Vorkommen verschiedener erblicher Formen eines Merkmals bezeichnet (Grimm, 2006). Dabei sollte das seltenere Allel in der untersuchten Population eine Frequenz von mindestens 1% aufweisen. Bei über 90% aller Variationen der DNA erfolgt ein Austausch einer

einzelnen Nukleotidbase, die als Einzelnukleotidpolymorphismen (single nucleotide polymorphism [SNPs]) bezeichnet werden. SNPs weisen in der Bevölkerung eine Häufigkeit von über 5% auf (Grimm, 2006) und können sich in kodierenden und nichtkodierenden Bereichen des menschlichen Genoms befinden (Schaaf und Zschocke, 2008).

1.5 Polymorphismen im p53-Signalweg

Eine Veränderung von Guanin/Cytosin führt im Codon 72 des p53-Gens zu einem Austausch der Aminosäure Arginin (Arg72) zu Prolin (Pro72) (Harris et al., 1986). Dieser Polymorphismus befindet sich einer „Proline-Rich“-Region, die entscheidend für wachstumsinhibierende Signale und die Apoptoseinduktion ist (Walker und Levine, 1996; Venot et al., 1998). Innerhalb verschiedener ethnischer Gruppen tritt die Sequenzvariation mit unterschiedlicher Frequenz auf. Dabei nimmt die Häufigkeit der Aminosäure Prolin in der Population von Nord (Schweden 17%) nach Süd (Nigeria 63%) zu (Beckman et al., 1994). Untersuchungen ergaben, dass die Codon-72-Polymorphismusvarianten funktionell verschieden sind (Thomas et al., 1999). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Arg72-Variante ein höheres apoptotisches Potential besitzt als die Pro72-Variante (Dumont et al., 2003; Pim und Banks, 2004; Bergamaschi et al., 2006). Anhand dieser Ergebnisse wurden weiterführende epidemiologische Studien durchgeführt, um den Einfluss des Polymorphismus auf die Tumorentstehung zu untersuchen. Die diesbezügliche Studienlage ist widersprüchlich. Während einige Studien belegen, dass die Pro72-Variante mit einem erhöhten Tumorrisiko assoziiert ist (Shen et al., 2002; Jones et al., 2004), beschrieben andere Studien diesen Zusammenhang für die Arg72-Variante (Storey et al., 1998; Zehbe et al., 1999). Andere Arbeitsgruppen konnten für Patienten mit einem Codon72-Polymorphismus kein erhöhtes Risiko nachweisen, an einem Tumor zu erkranken (Helland et al., 1998; Hildesheim et al., 1998; Yamashita et al., 1999).

Ein weiterer Einzelnukleotidpolymorphismus (T>G) an Position 309 (SNP309) des MDM2-Gens wurde 2004 entdeckt (Bond et al., 2004). Der SNP309 befindet sich in der P2-Promotorregion des MDM2-Gens und erhöht die Affinität des Transkriptionsfaktors SP1 zum MDM2-P2-Promotor durch Verlängerung der SP1-vermittelten-DNA-Bindungsregion (Bond et al., 2004). Die Analyse ergab, dass SP1 mit höherer Affinität an das G-Allel des SNP309 binden kann und die Transkription sowie die Proteinexpression von MDM2 steigert. In Zellen mit einem homozygotem G-Allel führt die erhöhte MDM2-Expression zu einer Abschwächung des p53-Tumorsuppressorweges (Grochola et al., 2010). Es konnte anhand des Li-Fraumeni-

Syndroms gezeigt werden, dass Patienten mit einem G/G-Genotyp ihren Tumor früher entwickelten und die Erkrankung zusätzlich mit einer höheren Anzahl an Primärtumoren verbunden war (Bond et al., 2004; Bougeard et al., 2006; Ruijs et al., 2007). Andere Studien, die den Einfluss des SNP309 an Weichteilsarkomen, Lymphomen, Kolon- und Blasenkarzinomen, sowie bei Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches untersuchten, beschrieben ebenfalls ein früheres Diagnosealter für Patienten mit einem G/G-Genotyp gegenüber Patienten mit mindestens einem T-Allel (Bond et al., 2004; Menin et al., 2006; Sanchez-Carbayo et al., 2007; Khatri et al., 2008; Yoon et al., 2008). Bartel et al. untersuchten an Ovarialkarzinompatientinnen den Einfluss des SNP309 und konnten belegen, dass das G-Allel bei Patientinnen im Tumorstadium FIGO III mit einem signifikant schlechteren Gesamtüberleben assoziiert war. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Patientinnen mit einem G/G-Genotyp und ER-positiven Tumoren früher an einem Ovarialkarzinom erkrankten (Bartel et al., 2008). Auch für B-Zell-Lymphome und Weichteilsarkome wurde beschrieben, dass das G-Allel mit einem früheren Erkrankungsalter für Frauen, aber nicht für Männer verbunden ist (Bond et al., 2006). Die Daten geben Hinweise darauf, dass Östrogen bevorzugt die Transkription von MDM2 stimuliert, wenn ein G-Allel vorliegt und die Tumorentstehung möglicherweise östrogenabhängig moduliert wird (Hu et al., 2007a).

1.6 Aufgabenstellung

Ausgehend von bestehenden Publikationen war es das Ziel dieser Arbeit, den Einfluss von SNPs im MDMX-Gen auf die Entstehung und Progression von Ovarialkarzinomen zu untersuchen.

Einzelnukleotidpolymorphismen im MDM2-Gen wurden bereits umfangreich analysiert und ihre Bedeutung für die Tumorentstehung nachgewiesen. Dagegen ist die Datenlage über Alterationen im MDMX-Gen gering. Insbesondere gibt es kaum Arbeiten über den Einfluss von SNPs im MDMX-Gen bei Patientinnen mit einem malignen Ovarialtumor. Untersuchungen zum SNP309 des MDM2-Gens zeigten, dass dieser bei Ovarialkarzinompatientinnen mit einem signifikant schlechteren Gesamtüberleben und einem früheren Diagnosealter korrelierte (Bartel et al., 2008). MDMX besitzt strukturelle Ähnlichkeiten zu MDM2. Demnach könnten genetische Veränderungen im MDMX-Gen ebenso die Aktivität und Stabilität von p53 verändern und nachfolgend den p53-Signalweg abschwächen. Dies hätte einen Einfluss auf die Entstehung und den Krankheitsverlauf von Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom und sollte in dieser Arbeit untersucht werden.

Zunächst wurden alle Fälle mit der Diagnose Ovarialkarzinom aus dem Befundsystem des Institutes für Pathologie (Paschman Datenbank) herausgefiltert und die entsprechenden in Formalin-fixierten Schnitte herausgesucht. Nach Isolierung der DNA, erfolgte für die SNPs die Genotypisierung der Tumorproben und der gesunden Kontrollpersonen.

Anschließend wurden die erhaltenen molekularen Ergebnisse mit klinischen Daten, wie Alter bei Diagnosestellung, Tumorstadium, Resttumor, oder Zeitpunkt der Rezidiventstehung korreliert. Ziel war es, einen möglichen Einfluss der SNPs auf das Erkrankungsalter und den Krankheitsverlauf von Ovarialkarzinomen nachzuweisen.

2. Material

2.1 Tumormaterial und Patientengut

Zu Beginn wurden alle Patientinnen mit der Diagnose Ovarialkarzinom im Zeitraum von 1997 bis 2009 aus dem Befundsystem des Institutes für Pathologie herausgefiltert (Paschmann Datenbank) (Tab.1).

Tab. 1: Klinisch-pathologische Daten der Ovarialkarzinomproben

Angabe prozentualer Anteile der einzelnen Tumorzelltypen der vorliegenden Proben. Des Weiteren Daten zum Tumorstadium bei Probengewinnung, Alter der Patientinnen, Resttumorgewebe nach Primär-Operation und Art der adjuvanten Chemotherapie.

Charakteristika	Patienten (n=108)	
	Anzahl	Prozent
Tumorzelltyp		
serös	62	57,4
endometroid	15	13,9
gemischt	12	11,1
klarzellig	9	8,3
transitional	1	0,9
undifferenziert	7	6,5
muzinös	2	1,9
Tumorstadium		
FIGO Stadium I	33	30,6
FIGO Stadium II	9	8,3
FIGO Stadium III	59	54,6
FIGO Stadium IV	7	6,5
Alter der Patienten, Jahre		
Mittelwert	64,4	
Median	64,2	
Standardabweichung	10,1	
Art der Therapie		
Cisplatin+Paclitaxel	61	56,5
Platin-basierte Chemotherapie +/- Paclitaxel	20	18,5
andere	2	1,9
keine (FIGO IA)	8	7,4
abgelehnt/verstorben	11	10,2
Daten fehlen	4	3,7
Resttumor		
kein	44	46,3
< 1 cm	20	21,1
> 1 cm	31	32,6

Alle histologischen Schnitte wurden durch zwei Pathologen (Elise Gradhand und Steffen Hauptmann) unabhängig begutachtet. In einigen Fällen wurde die Erstdiagnose zu einem späteren Zeitpunkt korrigiert, da der ursprüngliche Tumor später zum Beispiel als Metastase oder benigne Raumforderung klassifiziert wurde.. Das DNA-Vergleichsmaterial stammt von gesunden Kontrollpersonen. Diese Proben wurden durch das HLA-Labor der Immunologie, der Humangenetik und der Rechtsmedizin der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zur Verfügung gestellt. Das Alter der Kontrollpersonen lag zwischen 21 und 85 Jahren, mit einem Mittelwert von 41,9 Jahren. Die Kontrollpersonen haben Ihr Einverständnis zur wissenschaftlichen Nutzung ihrer DNA gegeben.

In dieser Arbeit sollte ausserdem untersucht werden, ob der Östrogenrezeptorstatus einen zusätzlichen Einfluss auf die Tumorentstehung und den Krankheitsverlauf der Ovarialkarzinompatientinnen hat. Die Quantifizierung der Östrogenrezeptorexpression erfolgte durch den immunoreactive Score (IRS), der durch Multiplikation der Färbeintensität mit dem Prozentsatz der positiven Zellen errechnet wird (Remmele and Stegner, 1987). In der vorliegenden Arbeit wurde zwischen einer fehlenden, einer geringen und einer hohen Östrogenrezeptorexpression unterschieden. Ein IRS von 0 bedeutet keine ER-Expression. Werte zwischen 1 und 3 definieren eine schwache ER-Expression und ein IRS>4 wird als hohe ER-Expression bewertet.

2.2 Primer und Oligonukleotide

Die verwendeten Primer wurden mit Hilfe des Programms CloneManager erstellt und von TIB MOLBIOL (Berlin) synthetisiert (Tab. 2).

Tab. 2: In dieser Arbeit verwendete Primer im MDMX-Gen

<i>Name des Primers</i>	<i>Sequenz 5' → 3'</i>	<i>Orientierung</i>
XEx1fw	5'-CCTCGTGTGAGGCCGTGTGG-3'	sense
XEx1rev	5'-GGCCGCCTGCTCCTCACTCT-3'	antisense
X9507fw	5'-GAGTGCTCTACCTGATAACC-3'	sense
X9777rev	5'-GGCAACCAGCAGAAGTAA-3'	antisense
X9443fw	5'-GAAGTCCTGTTGGAATCTTA-3'	sense
X9592rev	5'-CCAACCTCCAACCTGATGTTA-3'	antisense
X31684fw	5'-GCTTAATTTCCACACAGATTAG-3'	sense
X32015rev	5'-TTGGCAATGAACTACCATAATG-3'	antisense

2.3 Taqman Assays

In dieser Arbeit verwendeten Taqman SNP Genotyping Assays:

XSNP807 Applied Biosystems, USA

XSNP9671 Applied Biosystems, USA

XSNP9518 Applied Biosystems, USA

XSNP16620 Applied Biosystems, USA

XSNP31826 Applied Biosystems, USA

2.4 Enzyme

Hot FIREPol® (5 U/μL) Solis Biodyne, Estland

Green Mastermix Promega, Heidelberg

2.5 Kits

BigDye Terminator v3.1 Sequencing Kit Applied Biosystem, USA

2.6 Chemikalien und Reagenzien

Agarose Serva, Heidelberg

Bromphenolblau Serva, Heidelberg

Borsäure Roth, Karlsruhe

Desoxyribonukleotide

(dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 100 mM) Promega, Heidelberg

DNA-Standard (100 bp-Leiter) Invitrogen, Karlsruhe

EB-Lösung Roth, Karlsruhe

Ethylendiamintetraacetat (EDTA) Roth, Karlsruhe

Ethanol (96%) Merck, Darmstadt

Ethidiumbromid Serva, Heidelberg

Formamid Roth, Karlsruhe

Isopropanol Roth, Karlsruhe

Kaliumchlorid Merck, Darmstadt

Magnesiumchlorid Roth, Karlsruhe

Natriumacetat Serva, Heidelberg

Natriumchlorid Serva, Heidelberg

Natriumdodecylsulfat (SDS) Serva, Heidelberg

Octan Sigma, USA

Proteinase K Serva, Heidelberg

Tris Roth, Karlsruhe
Tris-HCl Roth, Karlsruhe
Tween 20 Serva, Heidelberg
Xylencyanol Serva, Heidelberg

2.7 Geräte und Verbrauchsmaterialien

BioDocAnalyse (Gelauswertung) Biometra, Göttingen
BioPhotometer Eppendorf, Hamburg
Elektrophorese-Gerät BioPlex, Freiburg
Mettler AM 100 (Analysewaage) Mettler, Gießen
Mikropipetten Eppendorf, Hamburg
Peltier Thermal-Cycler Bio Rad, München
Pipetten Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße Eppendorf, Hamburg
Rotor-Gene RG-3000 Qiagen, Hilden
Trio-Thermoblock TB1 Biometra, Göttingen
Vakuumentrifuge (Concentrator 5301) Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5804 R Eppendorf, Hamburg

2.8 Puffer und Lösungen

Verdaupuffer-I Manos: 3,03 g Tris + 350 ml Aqua bidest.
(pH 8,5 mit HCl einstellen)
0,15 g EDTA
2,5 ml Tween 20
mit Aqua bidest. auf 500 ml auffüllen

Proteinase-K-Stammlösung: 720 µl Verdaupuffer
80 µl Proteinase K

Salzpuffer Lahiri: 0,61g Tris + 300 ml Aqua bidest.
(pH 7,6 mit HCl einstellen)
0,37 g MgCl₂
0,29 g EDTA
0,37 g KCl
1,17 g NaCl
mit Aqua bidest. auf 500 ml auffüllen

DNA-Lösungspuffer:	1 ml Tris-HCl pH 7,6 20 µl EDTA pH 8,0 auf 100 ml auffüllen
5xTBE-Puffer:	54,0 g Tris-HCl 27,5 g Borsäure 20 ml 0,5M EDTA pH 8,0 mit Aqua bidest. auf 1l auffüllen
Auftragungspuffer:	10,0 ml Formamid 10,0 mg Xylencyanol 10,0 mg Bromphenolblau 0,2 ml 0,5M EDTA pH 8,0

3. Methoden

3.1 DNA-Isolation aus Paraffinmaterial

1. 10-20 dicke Schnitte in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß geben.
2. Unter Zusatz von 1 ml Octan 10 min schütteln, dann Zentrifugation für 3-5 min bei 12000 rpm.
3. Schritt zweimal wiederholen bis sich das Paraffin vollständig gelöst hat.
4. Zugabe von 1 ml 96-99%igem Ethanol und anschließende Zentrifugation, Schritt wiederholen.
5. Pellet in der Vakuumzentrifuge bei 45°C für 5 min vollständig trocknen.
6. Zugabe von 720 µl Verdaupuffer-I Manos und 80 µl Proteinase-K-Stammlösung.
7. Probe über Nacht bei 37°C im Thermomixer leicht schütteln.
8. Temperatur im Thermomixer auf 95°C erhöhen, danach kurze Abkühlung und Zentrifugation für 5 min bei 12000 rpm und 4°C.
9. Gewebereste entfernen und mit dem gewonnenen Überstand weiterarbeiten.
10. Überstand in ein neues 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß geben und 800 µl Salzpuffer-Lahiri und 25 µl 20% SDS zugeben.
11. Erwärmung der Lösung für 10 min auf 55°C und nach kurzer Abkühlung für 5-10 min bei 4°C und 12000 rpm zentrifugieren.
12. Aufteilen des Überstandes auf zwei neue 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße.
13. Zugabe von Isopropanol im gleichen Volumenverhältnis und Ausfällen der DNA.
14. Lagerung der Probe über Nacht bei -20°C.
15. Probe für 20-30 min bei 4°C und 15000 rpm zentrifugieren und Abgießen des Isopropanols.
16. Vereinigung der beiden Eppendorf-Reaktionsgefäße und Zugabe von 500 µl 70%igem Ethanol.
17. Pellet auffangen und in das zweite Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen.
18. Erstes Eppendorf-Reaktionsgefäß nochmals mit 500 µl Ethanol waschen und 10 min bei 4°C und 10000 rpm zentrifugieren, Überstand ausgießen und gut auslaufen lassen.
19. Pellet trocknen und 5 min bei 45°C zentrifugieren, Zugabe von 50-100 µl DNA-Lösungspuffer.
20. 5 µl der gewonnenen DNA und 495 µl Aqua bidest. bei 260 und 280 nm messen.
21. Reinheitsquotient R nach folgender Formel berechnen:
$$260 \text{ nm} \times 5000 = \text{Konzentration in ng/}\mu\text{l}; 260:280 \text{ nm} = R.$$
22. Proben bei -20 bis -80°C lagern.

3.2 Genotypisierung mittels Real-Time PCR

Die Taqman „Genotyping-Assays“ wurden für die entsprechenden SNPs bei der Firma Applied Biosystems bestellt. Der Taqman-Assay enthält für das Wildtyp-Allel eine FAM-markierte Sonde sowie für das mutierte Allel eine VIC-markierte Sonde. Je nachdem welches Allel in der Probe vorhanden ist, erhält man bei homozygoten Proben nur ein Signal bzw. bei heterozygoten Proben das Signal beider Farbstoffe. Für die PCR wurde folgender 20 µl Reaktionsansatz aus den Komponenten des Hotfire-Pol-Kits (Solis Biodyne, Estland) verwendet:

2,0 µl 10x Puffer B

1,2 µl MgCl₂

1,6 µl dNTPs

0,1 µl Hotfire-Pol

0,5 µl Taqman-Assay

1,0 µl DNA (20 ng/µl)

4,0 µl Q

9,55 µl Aqua bidest.

Der Ansatz wurde mit dem folgenden Programm im Real-Time-PCR-Gerät Rotorgene 3000 (Qiagen, Hilden) vermessen:

1. 95 °C 15 min

2. 95 °C 15 s

3. 60 °C 20 s

4. 72 °C 20 s

5. Schritt 2-4 40 mal wiederholen

Jeder Lauf enthielt zusätzlich 3 Proben, deren Allelverteilung vorher durch Sequenzierung bestimmt wurde. Die Auswertung erfolgte mit der Allelic Discrimination-Software des Rotorgene 3000.

3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Alle PCR-Reaktionen wurden mit den Komponenten der Hotfire-Pol der Firma Solis Biodyne (Estland) durchgeführt. Ein 25 µl Ansatz bestand aus folgenden Komponenten:

16,75 µl Aqua bidest.

2,5 µl 10x Puffer B

2,5 µl MgCl₂ (25 mM)

2,0 µl dNTPs (100 mM)
je 1,0 µl Primer (20 µM)
0,25 µl HotStart-Taq-Polymerase

Dem Reaktionsansatz wurden je 1 µl DNA in einer Konzentration von 20 ng zugegeben. Danach erfolgte die PCR-Reaktion im Peltier Thermal-Cycler PT200.

Um ein besseres PCR-Produkt zu erzielen, wurde der PCR-Ansatz im weiteren Verlauf der Arbeit auf folgenden Reaktionsansatz umgestellt:

12,5 µl Green Mastermix
je 1 µl Primer (20 µM)
9,5 µl Aqua bidest.

Auch diesem Reaktionsansatz wurde 1 µl DNA in einer Konzentration von 20 ng zugegeben und die PCR Reaktion erfolgte nach dem gleichen Programm im Thermal-Cycler PT200.

3.4 Sequenzierreaktion

Die Sequenzierung der DNA erfolgte unter Nutzung des BigDye™ Terminator Sequencing Kits 3.1 der Firma ABI Prism (Applied Biosystems, USA).

Für einen Sequenzieransatz wurden folgende Komponenten verwendet:

10,0 µl Sequenzierpuffer
2,0 µl BigDyeSequencing Mix
2,0 µl spezifischer Primer
4,0 µl Aqua bidest.
3,0 µl PCR-Produkt

Die Sequenzierreaktion erfolgte in 0,5 ml Reaktionsgefäßen im Trioblock™-Thermocycler mit Heizdeckel nach folgendem Programm:

1. 96 °C 1 min
2. 96 °C 10 s
3. 50 °C 5 s
4. 60 °C 4 min
5. Schritt 2-4 25 mal wiederholen
6. 4 °C

Anschließend erfolgte die Reinigung des Sequenzierproduktes. Dabei wurden die Reaktionsgefäße vor direkter Lichteinstrahlung geschützt. Jedem Ansatz wurden 2 µl 125 mM EDTA, 2 µl 3 M Natriumacetat und 50 µl 96 %iger Ethanol zugegeben, auf dem Standrüttler gut vermischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die gefällte DNA wurde anschließend für 30 min bei 4 °C und 6000 rpm abzentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes und Waschen des Pellets mit 70 µl 70 %igem Ethanol, wurde 10 min bei 4 °C und 6000 rpm zentrifugiert. Nach vorsichtigem Abpipettieren des Ethanols wurde das Pellet circa 10 min bei 80 °C im Thermocycler getrocknet. Die Analyse der Proben erfolgte am Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durch Frau Dr. Darmer und Herrn Dr. Christov.

3.5 DNA-Untersuchungen

3.5.1 Agarose-Gelelektrophorese

Zum Nachweis der erfolgreichen Amplifikation der DNA nach einer PCR-Reaktion wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. In Abhängigkeit von der zu erwartenden 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. Es wurden jeweils 5 µl PCR Produkt mit 1,5 µl DNA-Auftragspuffer gemischt und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei circa 90 Volt. Nach dem Gellauf wurden die Banden mittels UV-Licht sichtbar gemacht und mit dem Geldokumentationssystem BioDocAnalyse (Biometra) ausgewertet. Zur Größenbestimmung der PCR-Produkte dienten DNA-Längenstandards.

3.5.2 Aufreinigung von DNA aus Agarose-Gel

Für die Aufreinigung von DNA wurden zunächst circa 10-20 µl des PCR-Produktes im Agarose-Gel aufgetrennt (siehe 3.5.1). Danach wurden die entsprechenden Banden auf dem UV-Tisch mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß platziert. Es wurde darauf geachtet, dass die Banden einzeln ausgeschnitten wurden und dabei kein Kontakt zu anderen Banden entstand. Außerdem wurde die Zeit unter dem UV-Licht so gering wie möglich gehalten, um DNA-Veränderungen zu vermeiden. Anschließend erfolgte die DNA-Reinigung aus dem Agarosegel. Zum Gelstück wurde das dreifache Volumen an QX1-Puffer zugegeben und 10 min im Thermoblock bei 50°C aufgelöst. Die Lösung wurde auf eine

Säule gegeben und 1 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Danach wurde zweimal mit je 350 µl PE-Puffer gewaschen und zentrifugiert. Zuletzt wurde 3 min trocken zentrifugiert und die Säule auf ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß gesetzt, um die DNA mit 50 µl EB-Lösung aus der Säule in das neue Eppendorf-Reaktionsgefäß zu lösen.

3.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software SPSS 17.0. Dabei wurde eine maximal zulässige Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05 festgelegt und Werte innerhalb des Wahrscheinlichkeitsintervalls als signifikant eingestuft. Die Daten wurden als Mittelwert +/- Standardabweichung dargestellt. Als statistische Verfahren wurden Überlebenszeitanalysen (Cox-Regression, Kaplan-Meier-Analysen), t-Tests, Mann-Whitney-Tests und bivariate Korrelationen verwendet. Mit Hilfe der Überlebenszeitanalysen wurde für verschiedene Gruppen die Zeit zwischen einem definierten Anfangs- und einem bestimmten Endereignis untersucht (Weiß, 2010). Dabei ermöglichte die Kaplan-Meier-Methode eine Einschätzung der Wahrscheinlichkeit, inwiefern ein Ereignis (zum Beispiel Rezidiv, Komplikationen) in einer bestimmten Zeitspanne nicht vorkommt. Zusätzlich können spezifische Überlebensraten (zum Beispiel 1- oder 5-Jahres-Überlebensrate) abgelesen werden. Das Cox-Modell wurde eingesetzt, um den gleichzeitigen Effekt mehrerer Einflussgrößen auf eine Zielvariable, zum Beispiel Überlebenszeit, zu untersuchen. Dies ist insofern von Bedeutung, damit zusätzliche Faktoren (zum Beispiel FIGO-Stadium, Resektionsgrad) bei einer Tumorerkrankung in die statistische Auswertung einbezogen werden können.

4. Ergebnisse

Aus der Datenbank des NCBI wurden die single nucleotide polymorphism (SNPs) aus dem MDMX-Gen herausgesucht, die in dieser Arbeit untersucht werden sollten (NCBI Datenbank 2011, Tab. 3). Die Lokalisation der einzelnen SNPs im MDMX-Gen ist schematisch in Abb. 4 dargestellt.

Tab. 3: Lokalisation der SNPs im MDMX-Gen und deren Heterozygotenhäufigkeit (NCBI Datenbank)

SNPs	Lokalisation	Heterozygoten-Häufigkeit
SNP807 = rs4252668	Exon 1	0,3%
SNP9671 = rs3789051	Intron 1	42,1%
SNP9518 = rs3789052	Intron 1	41,1%
SNP16620 = rs4252697	Intron 5	34,8%
SNP31826 = rs1563828	Intron 10	49,4%

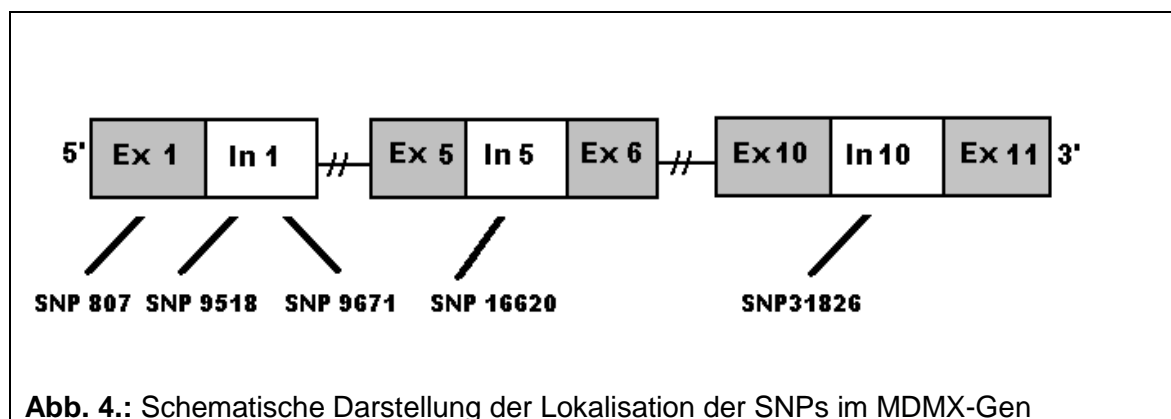


Abb. 4.: Schematische Darstellung der Lokalisation der SNPs im MDMX-Gen

4.1 Die Auswahl der Polymorphismen

4.1.1 SNP807 (rs4252668)

Der SNP807 (rs4252668) im Exon 1, ist in der 5'-UTR-Region des MDMX-Gens lokalisiert. In diesem Genlocus binden vor allem regulatorische Proteine. Demnach könnten SNPs die Translationseffizienz beeinflussen und die MDMX-Proteinexpression verändern (Ramos et al., 2001; Danovi et al., 2004).

4.1.2 SNP9671 (rs3789051) und SNP9518 (rs3789052)

Die beiden SNPs liegen im Intron 1 des MDMX-Gens. In dieser Region befindet sich ein zusätzlicher P2-Promotor, der durch p53-aktivierende Signale induziert wird und die Transkription einer neuen mRNA steuert. Diese mRNA wird effizienter translatiert und kodiert für eine lange Proteinform (MDMX-L). Im Unterschied zur normalen, vom P1-Promotor translatierten Form, verfügt MDMX-L über eine geringere p53-Bindungskapazität und kann die p53-abhängige Transkription nur in einem kleineren Ausmaß inhibieren (Phillips et al., 2010). Die Allele der SNPs könnten mit unterschiedlicher Affinität an den P2-Promotor binden und die Transkriptions- und Translationsfähigkeit beeinflussen.

4.1.3 SNP16620 (rs4252697)

Der SNP16620 im Intron 5 des MDMX-Gens könnte das Spleißverhalten von MDMX beeinflussen. Dadurch könnten unterschiedliche Transkriptionsformen entstehen, die den p53-Signalweg in seiner Funktion stören.

4.1.4 SNP31826 (rs1563828)

Dieser SNP befindet sich im Intron 10 des MDMX-Gens. Aufgrund seiner hohen Heterozygotenfrequenz von 49,4% (Tab. 3), wurde der SNP für diese Arbeit ausgewählt.

4.2 Die Analyse der Polymorphismen

4.2.1 Polymorphismus SNP807 (rs4255668)

Die Genotypenbestimmung der Ovarialkarzinome und der Kontrollen ergab eine ähnliche Verteilung. Das Wildtyp-Allel (T/T-Genotyp) war in beiden Gruppen am häufigsten vertreten, während das homozygote Minor-Allel (C/C-Genotyp) nicht nachgewiesen werden konnte. In der Kontrollgruppe wurde für den heterozygoten Genotyp eine Frequenz von 2,63% ermittelt (Tab. 4). Eine Auswertung dieses SNP wurde aufgrund der ähnlichen Genotypenverteilung nicht vorgenommen.

Tab. 4: Häufigkeitenverteilung des SNP807 (rs4255668)

Angabe der Häufigkeiten der Ovarialkarzinome und Kontrollen in Abhängigkeit vom Allelstatus.

	<i>T/T</i>		<i>C/T</i>		<i>C/C</i>		<i>Gesamt</i>
	<i>n</i>	<i>%</i>	<i>n</i>	<i>%</i>	<i>n</i>	<i>%</i>	<i>n</i>
Ovarialkarzinome	126	100	0	0	0	0	126
Kontrollen	37	97,37	1	2,63	0	0	38

4.2.2 Polymorphismus SNP9671 (rs3789051)

Mittels RT-PCR konnte der Allelstatus in der Kontrollgruppe nicht sicher bestimmt werden. Auch die anschließende Sequenzierung der Proben führte zu keinem eindeutigen Ergebnis. Insgesamt konnte bei 32% aller Kontrollproben kein Genotyp ermittelt werden. Aufgrund der Unstimmigkeiten wurde auf die weitere Genotypisierung der Ovarialtumoren verzichtet.

4.2.3 Polymorphismus SNP9518 (rs3789052)

4.2.3.1 Häufigkeiten

Die Ermittlung der Häufigkeiten zeigte eine ähnliche Verteilung der Genotypen bei Ovarialkarzinompatientinnen (C/C: 22,1%; C/T: 50,0%; T/T: 27,9%) und gesunden Kontrollen (C/C: 21,4%; C/T: 50,0%; T/T: 28,6%). In high-grade Karzinomen war der Anteil am homozygotem C-Allel etwas höher (23,3%) als in low-grade Karzinomen (19,3%). Der heterozygote Genotyp (C/T) war in beiden Gruppen am stärksten vertreten (Tab. 5; Daten der Kontrollen nicht dargestellt).

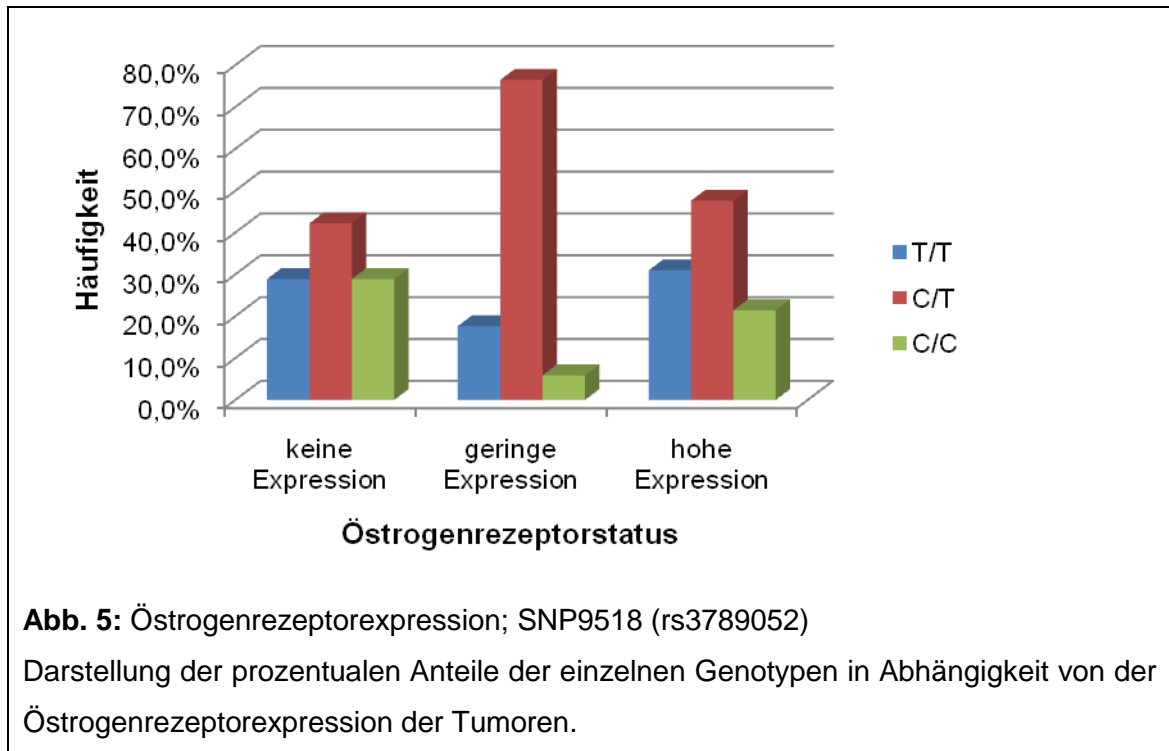
Tab. 5: Häufigkeitenverteilung des SNP9518 (rs3789052)

Angabe der Häufigkeiten der gesamten Ovarialkarzinome, sowie der high-grade und low-grade Karzinome in Abhängigkeit vom Allelstatus und der Östrogenrezeptorexpression.

	Östrogenrezeptorstatus						Gesamt n
	keine Expression		geringe Expression		hohe Expression		
	n	%	n	%	n	%	
Karzinome gesamt							
T/T	13	28,89	3	17,65	13	30,95	29
C/T	19	42,22	13	76,47	20	47,62	52
C/C	13	28,89	1	5,88	9	21,43	23
Gesamt	45	100,00	17	100,00	42	100,00	104
high-grade Karzinome							
T/T	7	22,58	2	18,18	9	29,03	18
C/T	16	51,61	9	81,82	13	41,94	38
C/C	8	25,81	0	0,00	9	29,03	17
Gesamt	31	100,00	11	100,00	31	100,00	73
low-grade Karzinome							
T/T	6	42,86	1	16,67	4	36,36	11
C/T	3	21,43	4	66,67	7	63,64	14
C/C	5	35,71	1	16,67	0	0,00	6
Gesamt	14	100,00	6	100,00	11	100,00	31

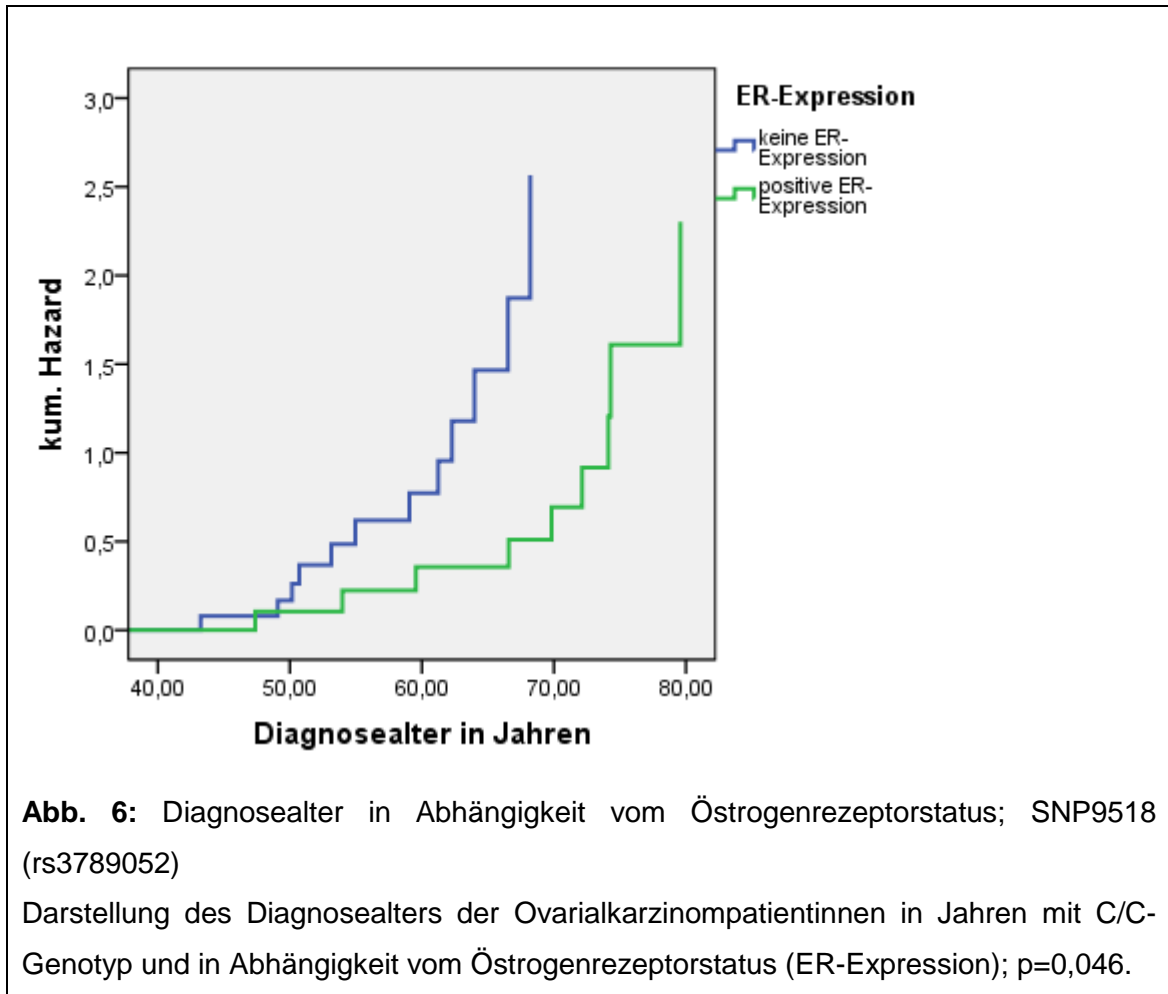
Die weitere Analyse des Östrogenrezeptorstatus ergab für mehr als die Hälfte der Ovarialkarzinome eine positive Expression (56,7%), wobei 40,4% eine hohe und 16,3% der Tumoren eine geringe Östrogenrezeptorexpression aufwiesen. Der heterozygote Genotyp (C/T) konnte in über 50% der ER-positiven Tumoren und in 42,2% der Tumoren ohne ER-Expression ermittelt werden. Die homozygoten Genotypen C/C und T/T wurden mit einer geringeren Frequenz nachgewiesen (Abb. 5). In low-grade Karzinomen ohne nachweisbare ER-Expression war das homozygote T-Allel am häufigsten vertreten (42,9%). In der Gruppe der low-grade Karzinome mit geringer und

hoher ER-Expression überwog jedoch der heterozygote Genotyp (66,7% und 63,6%). Eine ähnliche Verteilung zeigte sich auch bei den high-grade Karzinomen (Tab. 5). Insgesamt konnten keine signifikanten Unterschiede in der Allelverteilung bei low-grade und high-grade Karzinomen ermittelt werden ($p=0,088$ und $p=0,195$).



4.2.3.2 Diagnosealter

Die statistische Auswertung des SNP9518 ergab für Ovarialkarzinompatientinnen ein durchschnittliches Erkrankungsalter von 64,5 Jahren. Es zeigte sich, dass der Allelstatus keinen wesentlichen Einfluss auf das Diagnosealter hat (T/T: 64,4 Jahre; C/T: 65,3 Jahre; C/C: 62,8 Jahre). Die weitere Analyse unter Einbeziehung des Östrogenrezeptorstatus ergab jedoch ein signifikant 10 Jahre früheres Erkrankungsalter für Patientinnen mit homozygotem C-Allel und Ovarialtumoren ohne ER-Expression, im Vergleich zu Patientinnen mit einem ER-positiven Tumor (58,7 Jahre versus 68,2 Jahre) ($p=0,046$) (Abb.6). Ein ähnlicher Unterschied konnte bei Frauen mit T/T- und C/T-Genotyp nicht gefunden werden: Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom ohne ER-Expression erkrankten im Durchschnitt im Alter von 64,1 Jahren, wenn ein T/T-Genotyp nachgewiesen wurde (ER-positiv: 64,7 Jahre; $p=0,88$; Tab.12). Für Patientinnen mit einem C/T-Genotyp konnte ein durchschnittliches Diagnosealter von 63,3 Jahren ermittelt werden (ER-positiv: 66,4 Jahre; $p=0,293$).



4.2.3.3 Überlebenszeit und Cox-Regression

Die Analyse der Daten zur mittleren Überlebenszeit der Ovarialkarzinompatientinnen ergab, dass Frauen mit einem homozygotem T-Allel länger überlebten als Frauen mit C/T- oder C/C-Genotyp. Jedoch ist dieser Unterschied statistisch nicht signifikant ($p=0,58$) (Tab. 11). Darüber hinaus wurde untersucht, ob der ER-Status als Kovariable einen zusätzlichen Einfluss auf das mittlere Gesamtüberleben der Patientinnen besitzt. Auch in diesem Zusammenhang konnte kein signifikanter Unterschied ermittelt werden. Patientinnen mit T/T-Genotyp und ER-exprimierenden Tumoren überlebten im Durchschnitt 69,9 Monate, während Patientinnen mit C/T- oder C/C-Genotyp 49,3 Monate bzw. 39,7 Monate überlebten ($p=0,8$). Im Gegensatz dazu, war die Überlebenszeit der Patientinnen mit Ovarialtumoren ohne ER-Expression länger. Sie überlebten im Durchschnitt 72,7 Monate, bei homozygotem C-Allel und 57,5 Monate bzw. 51,1 Monate, wenn ein C/T- oder T/T-Genotyp nachgewiesen wurde ($p=0,3$) (Abb.7).

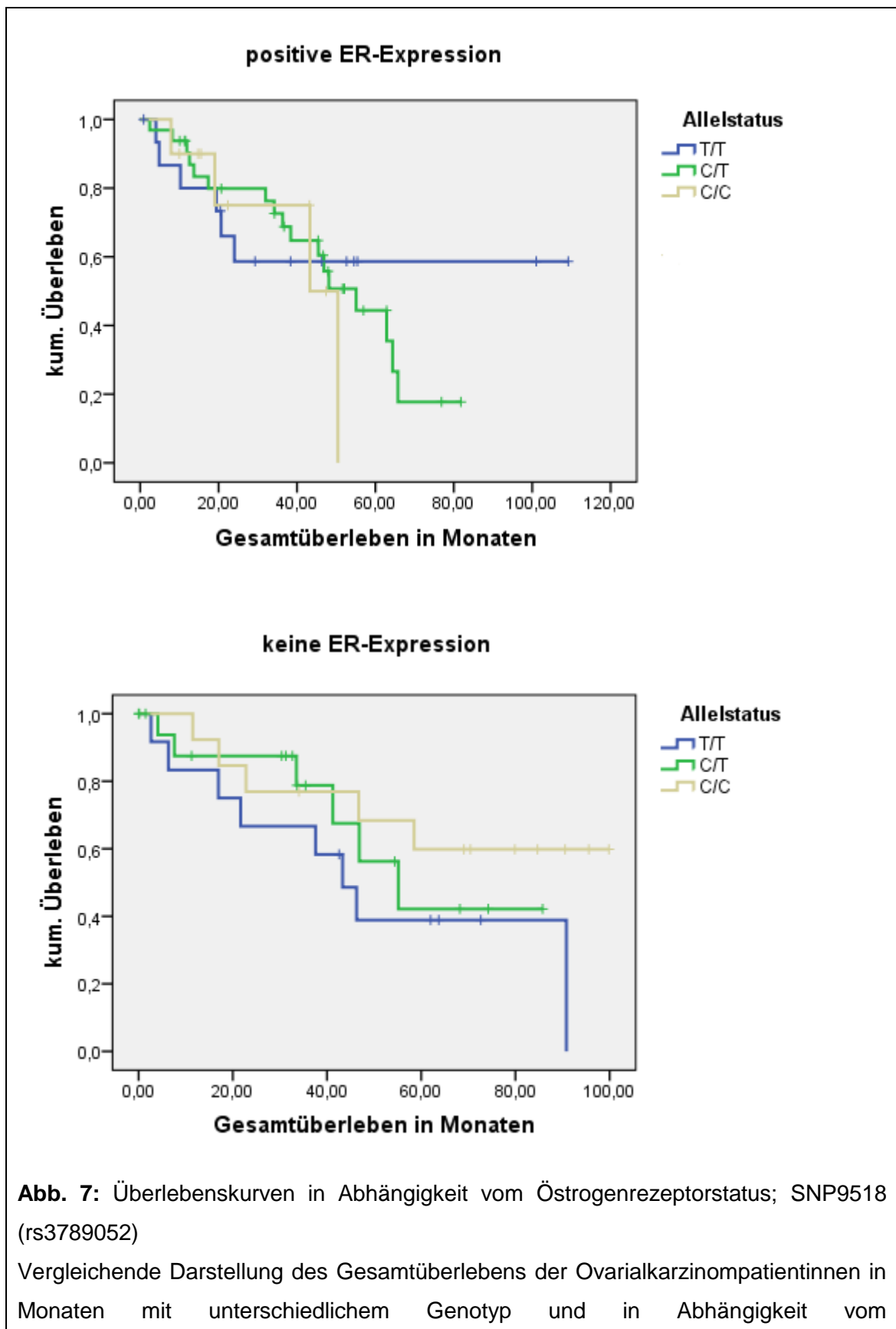


Abb. 7: Überlebenskurven in Abhängigkeit vom Östrogenrezeptorstatus; SNP9518 (rs3789052)

Vergleichende Darstellung des Gesamtüberlebens der Ovarialkarzinompatientinnen in Monaten mit unterschiedlichem Genotyp und in Abhängigkeit vom

Östrogenrezeptorstatus (ER-Expression). **oben:** positive ER-Expression; $p=0,8$;
unten: keine ER-Expression; $p=0,3$.

Die Cox-Regression konnte für Patientinnen mit einem T/T-Genotyp und Tumoren ohne ER-Expression ein 1,9fach erhöhtes Risiko gegenüber Patientinnen mit C/T- und C/C-Genotyp ermitteln, an einem Ovarialkarzinom zu versterben ($p=0,16$). Demgegenüber zeigte sich für Ovarialtumoren mit positiver ER-Expression kein höheres Risiko (Tab. 11). Im letzten Schritt sollte ermittelt werden, ob der Mutationsstatus und die Proteinexpression von p53 einen Einfluss auf das Gesamtüberleben der Ovarialkarzinompatientinnen besitzen. Um eine bessere Auswertung zu erreichen, wurden die Fälle in 3 Gruppen aufgeteilt. Die erste Gruppe bildeten alle Fälle mit einem nachgewiesenen Wildtyp p53-Gen und nicht detektierbarem p53-Protein. In diesen Fällen liegt ein intaktes p53-Gen vor. In die zweite Gruppe wurden alle Fälle mit Wildtyp p53-Gen und nachgewiesener Proteinüberexpression eingeschlossen. Die letzte Gruppe beinhaltete Tumoren mit einem mutierten p53-Gen und einer zusätzlichen Proteinüberexpression. Die Analyse der Fälle mit intaktem p53-Gen ergab, dass Frauen mit T/T-Genotyp länger überlebten, als Frauen mit C/T-Genotyp oder C/C-Genotyp (Tab. 6). Wenn nur der T/T-Genotyp betrachtet wird, ergibt sich eine signifikant längere Überlebenszeit für Tumoren mit Wildtyp-Gen ohne Expression (103,1 Monate) gegenüber Fällen mit Wildtyp-Gen und Überexpression (23,0 Monate; $p=0,004$) (Abb.8).

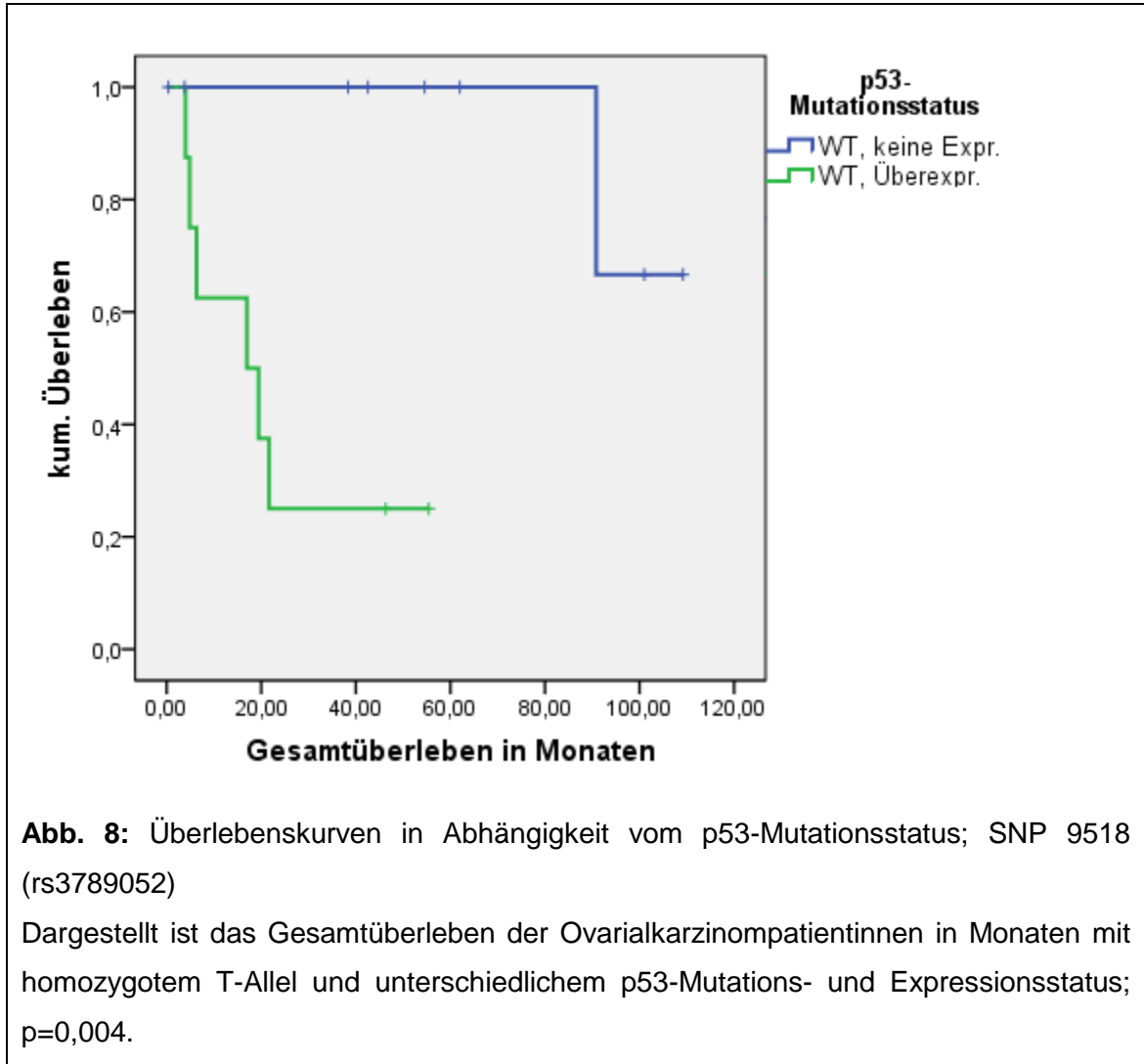


Abb. 8: Überlebenskurven in Abhängigkeit vom p53-Mutationsstatus; SNP 9518 (rs3789052)

Dargestellt ist das Gesamtüberleben der Ovarialkarzinompatientinnen in Monaten mit homozygotem T-Allel und unterschiedlichem p53-Mutations- und Expressionsstatus; $p=0,004$.

Tab. 6: Mittlere Überlebenszeiten in Abhängigkeit vom p53-Mutationsstatus; SNP9518 (rs378052)

Angabe der mittleren Überlebenszeiten in Monaten in Abhängigkeit vom Genotyp und des p53-Mutations- und Expressionsstatus.

	<i>T/T</i>	<i>C/T</i>	<i>C/C</i>	<i>Gesamt</i>
Wildtyp-Gen, keine Expression	103,1	49,8	80,7	74,5
Wildtyp-Gen, Überexpression	23,0	58,4	41,1	46,8
mutiert mit/ohne Überexpression	36,0	55,0	48,5	48,6

4.2.4 Polymorphismus SNP31826 (rs1563828)

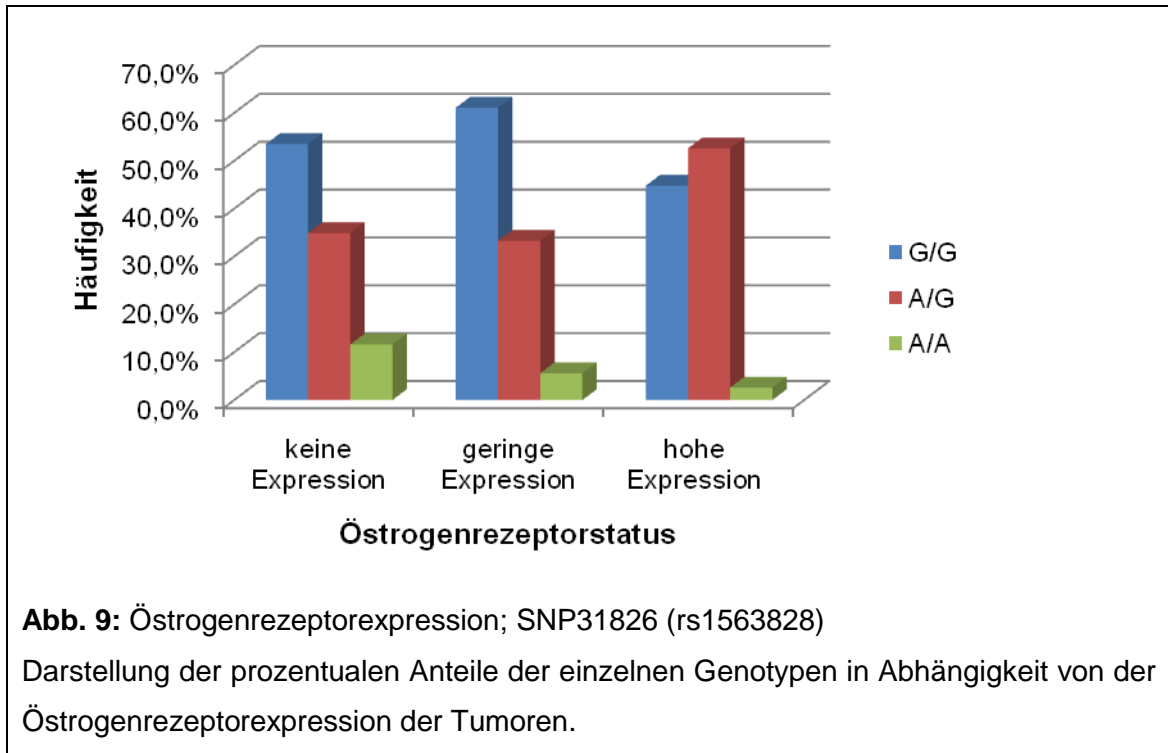
4.2.4.1 Häufigkeiten

Die Genotypenanalyse des SNP31826 ergab für das Wildtyp-Allel (G/G) eine Häufigkeit von 51,5% und für die Genotypen A/A und A/G eine Frequenz von 7,0% und 41,4%. Das homozygote Wildtyp-Allel wiesen außerdem mehr als die Hälfte der high-grade und low-grade Karzinome auf, während das Minor-Allel nur zu einem geringeren Anteil nachgewiesen werden konnte (Tab.7). Die Analyse des Östrogenrezeptorstatus ergab nur einen geringen Unterschied in der Häufigkeitenverteilung der Karzinome mit geringer und hoher beziehungsweise fehlender ER-Expression. Das homozygote Wildtyp-Allel konnte in 61,1% (44,8%) der Tumoren mit geringer (hoher) und in 53,5% der Tumoren ohne Östrogenrezeptor nachgewiesen werden. Der heterozygote Genotyp und das Minor-Allel zeigen bei Tumoren ohne ER-Expression eine Häufigkeit von 34,9% und 11,6% (Abb. 9). In high-grade Karzinomen war das homozygote Wildtyp-Allel bei Tumoren mit geringer und fehlender ER-Expression ebenfalls am stärksten vertreten. Bei Tumoren mit hoher ER-Expression wurde dagegen der heterozygote Genotyp am häufigsten nachgewiesen. Das homozygote A-Allel zeigte in allen Gruppen der high-grade Karzinome eine deutlich geringere Frequenz ($p=0,332$). Die Häufigkeitenverteilung der low-grade Karzinome ergab ein ähnliches Ergebnis ($p=0,463$) (Tab. 7).

Tab. 7: Häufigkeitenverteilung des SNP31826 (rs1563828)

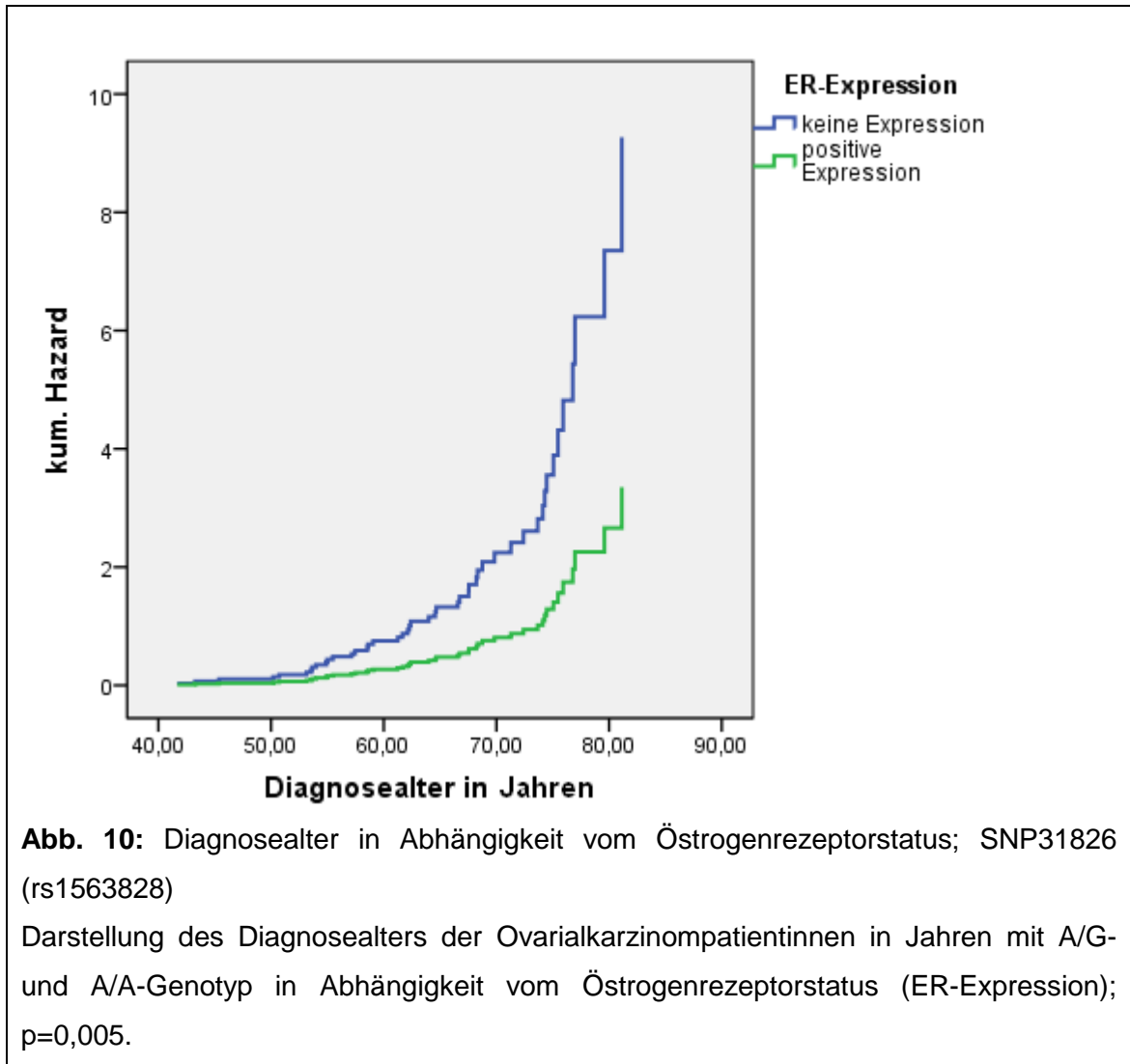
Angabe der Häufigkeiten der gesamten Ovarialkarzinome, sowie der high-grade und low-grade Karzinome in Abhängigkeit vom Allelstatus und der Östrogenrezeptorexpression.

	Östrogenrezeptorstatus						Gesamt n
	keine Expression		geringe Expression		hohe Expression		
	n	%	n	%	n	%	
Karzinome gesamt							
G/G	23	53,5	11	61,1	17	44,8	51
A/G	15	34,9	6	33,3	20	52,6	41
A/A	5	11,6	1	5,6	1	2,6	7
Gesamt	43	100,0	18	100,0	38	100,0	99
high-grade Karzinome							
G/G	15	50,0	8	72,7	12	42,8	38
A/G	12	40,0	3	27,3	15	53,6	32
A/A	3	10,0	0	0,0	1	3,6	3
Gesamt	30	100,0	11	100,0	28	100,0	73
low-grade Karzinome							
G/G	8	61,5	2	33,3	5	50,0	15
A/G	3	23,1	3	50,0	5	50,0	11
A/A	2	15,4	1	16,7	0	0,0	3
Gesamt	13	100,0	6	100,0	10	100,0	29



4.2.4.2 Diagnosealter

Nach Korrelation der gewonnenen Ergebnisse mit den klinischen Daten wurde festgestellt, dass Frauen mit dem selteneren Allel (A/A) im Durchschnitt 5 Jahre früher erkrankten, als Frauen mit dem Wildtyp-Allel (G/G) (59,2 Jahre versus 64,7 Jahre). Dieses Ergebnis ist mit einem p-Wert von 0,087 statistisch nicht signifikant, jedoch lässt sich ein deutlicher Trend erkennen. Aufgrund der niedrigen Fallzahlen bei Patientinnen mit A/A-Genotyp erfolgte die Aufteilung der Fälle in 2 Gruppen. Dabei wurden alle Fälle mit mindestens einem Minor-Allel mit den Fällen verglichen, die homozygot für das Wildtyp-Allel sind. Bei alleiniger Betrachtung der Patientengruppe mit mindestens einem A-Allel zeigte sich, dass Frauen mit Tumoren ohne ER-Expression signifikant 8 Jahre früher erkrankten, gegenüber Frauen mit ER-exprimierenden Tumoren (59,4 Jahre versus 67,7 Jahre; $p=0,005$) (Abb. 10). Ein ähnlicher Unterschied konnte für Patientinnen mit Wildtyp-Allel nicht nachgewiesen werden (Tab. 12).

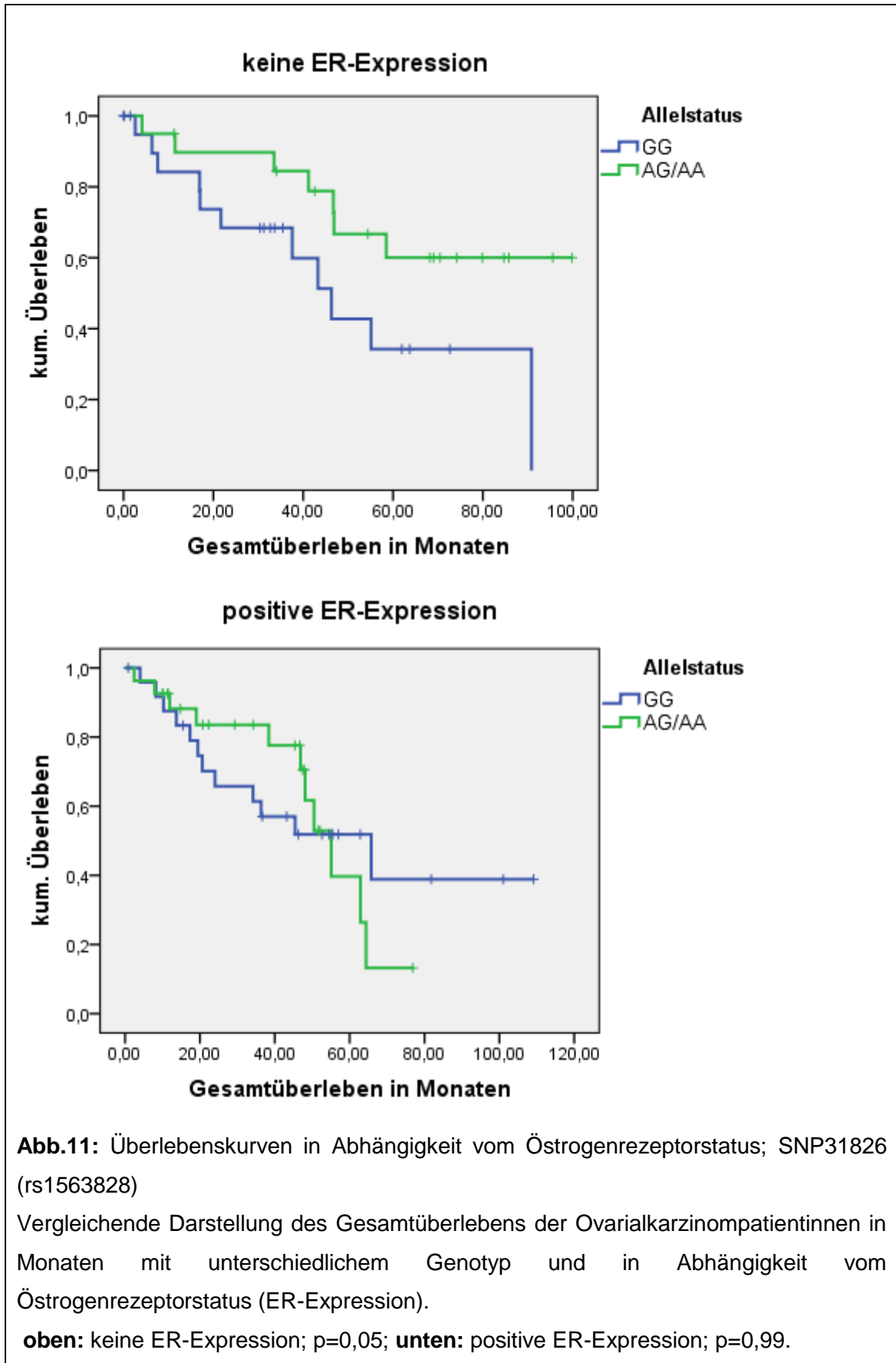


Unsere Daten waren Grundlage für die Arbeit von Atwal et al., 2009. Die Studie wurde um einige Fälle erweitert, so dass insgesamt 95 Patientinnen mit familiärer Genese und 110 Frauen mit einem sporadischen Ovarialtumor untersucht wurden. Auch hier konnte für den SNP31826 gezeigt werden, dass das A-Allel, verglichen mit dem G-Allel, sowohl beim familiären als auch beim sporadischen Ovarialkarzinom mit einem signifikant früheren Erkrankungsalter assoziiert war. Die Ergebnisse der Studie zeigten für die Gruppe der sporadischen Ovarialkarzinome, dass Patientinnen mit dem Minor-Allel signifikant 9 Jahre früher erkrankten, verglichen mit Patientinnen mit dem Wildtyp-Allel ($p=0,0137$). Für familiäre Ovarialkarzinome wurde ein durchschnittliches Erkrankungsalter von 56 Jahren ermittelt, wenn ein G/G-Genotyp nachgewiesen wurde, während Frauen, die homozygot für das seltenere Allel (A/A) sind, im Durchschnitt signifikant 5-6 Jahre früher erkrankten ($p=0,0236$) (Atwal, et al. 2009).

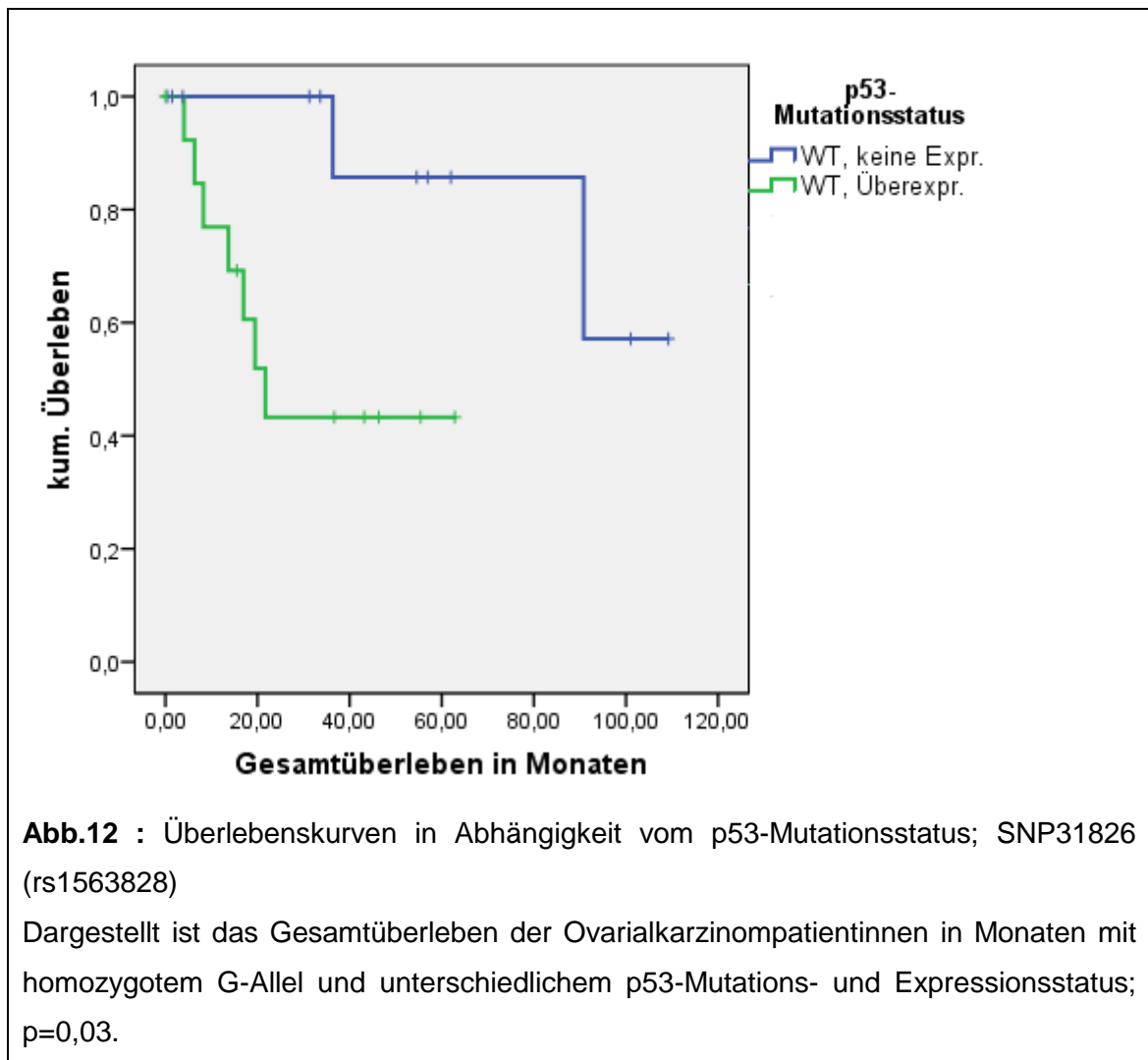
4.2.4.3 Überlebenszeit und Cox-Regression

Die Berechnungen ergaben, dass Patientinnen, die homozygot für das Wildtyp-Allel sind, im Durchschnitt 9 Monate kürzer lebten (57,6 Monate), als Patientinnen mit mindestens einem A-Allel (66,8 Monate). Jedoch ist dieser Unterschied statistisch nicht signifikant ($p=0,14$). Wenn zusätzlich der Einfluss des Östrogenrezeptorstatus betrachtet wird, zeigte sich jedoch, dass Frauen mit mindestens einem A-Allel und Tumoren ohne ER-Expression signifikant 2 Jahre länger überlebten (74,4 Monate) verglichen mit Frauen, die homozygot für das häufigere Allel (G/G) sind (50,5 Monate; $p=0,05$). Demgegenüber konnte für ER-positive Tumoren kein Unterschied ermittelt werden. Patientinnen mit einem G/G-Genotyp überlebten 61,5 Monate und Patientinnen mit mindestens einem A-Allel wiesen eine Überlebenszeit von 50,4 Monaten auf ($p=0,99$) (Abb. 11; Tab.11).

Die Cox-Regression ermittelte für Frauen mit homozygotem Wildtyp-Allel ein 1,5fach höheres Risiko am Ovarialtumor zu versterben, verglichen mit Frauen, die mindestens ein A-Allel besitzen ($p=0,14$). Wenn zusätzlich nur die Gruppe der Tumoren ohne Östrogenrezeptor betrachtet wird, zeigte sich sogar ein 2,5fach höheres Risiko für Frauen mit einem homozygotem G-Allel. Jedoch ist dieser Unterschied mit einem p-Wert von 0,059 statistisch nicht signifikant, aber deutlich als Trend erkennbar. Demgegenüber wurde bei ER-exprimierenden Tumoren kein erhöhtes Risiko nachgewiesen (Tab.11).



Im letzten Schritt sollte für den SNP31826 ermittelt werden, ob der p53-Mutationsstatus und die Proteinexpression einen Einfluss auf das Gesamtüberleben besitzen. Dazu erfolgte die Aufteilung der Fälle in 3 Gruppen (siehe 4.2.3.3). Es zeigte sich, dass Frauen mit homozygotem G-Allel und intaktem p53-Gen ein signifikant längeres Überleben aufwiesen (93,5 Monate), verglichen mit Frauen mit Wildtyp-Gen und Überexpression (34,7 Monate; $p=0,03$) (Abb. 12). Bei Frauen mit A/A- oder A/G-Genotyp hatte der p53- Mutationsstatus keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben (Tab. 8).



Tab. 8: Mittlere Überlebenszeiten in Abhängigkeit vom p53-Mutationsstatus; SNP31826 (rs1563828)

Angabe der mittleren Überlebenszeiten in Monaten in Abhängigkeit vom Genotyp und des p53-Mutations- und Expressionsstatus.

	G/G	A/G+A/A	Gesamt
Wildtyp-Gen, keine Expression	93,5	62,3	74,3
Wildtyp-Gen, Überexpression	34,7	58,1	50,0
mutiert mit/ohne Überexpression	42,9	64,0	48,6

4.2.5 Polymorphismus SNP16620 (rs4252697)

4.2.5.1 Häufigkeiten

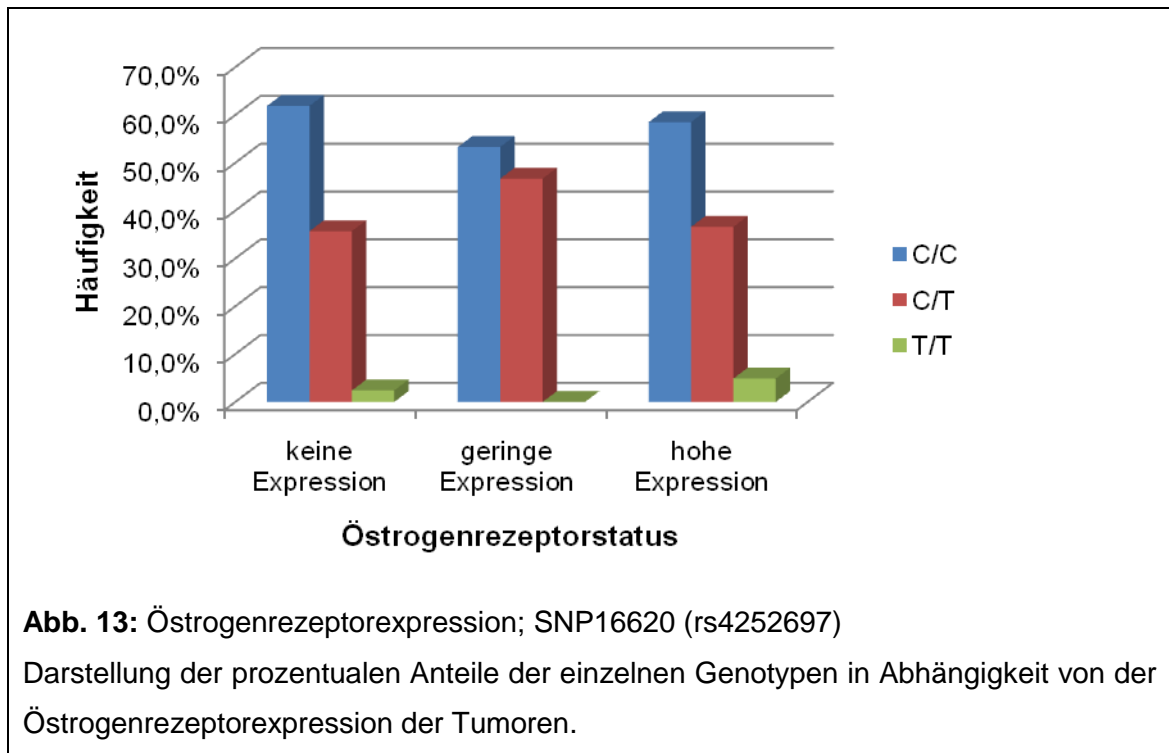
Bei den untersuchten Ovarialkarzinomen war das homozygote C-Allel am häufigsten vertreten. Danach folgten der heterozygote Genotyp und das homozygote T-Allel (C/C: 59,2%; C/T: 37,8%; T/T: 3,1%). Auch bei den high-grade und low-grade Karzinomen zeigte das Wildtyp-Allel die höchste Frequenz. Der heterozygote Genotyp konnte bei 42% der high-grade Karzinome und bei 27,6% der low-grade Karzinome nachgewiesen werden. Lediglich 4,3% der high-grade Karzinome zeigten ein homozygoten T-Allel, während dieser Allelstatus bei den low-grade Karzinomen nicht ermittelt werden konnte (Tab. 9).

Die Östrogenrezeptoranalyse der Ovarialkarzinome ergab für 57,1% der Tumoren eine positive ER-Expression. Das homozygote Wildtyp-Allel wurde in mehr als der Hälfte der Tumoren mit niedriger bzw. hoher Östrogenrezeptorexpression nachgewiesen. Lediglich 2,4% der Tumoren ohne ER-Expression zeigten einen homozygoten T/T-Genotyp, während ein homozygoten Wildtyp-Allel bzw. ein heterozygoter Genotyp in 61,9% und 35,7% der Tumoren ermittelt werden konnte (Abb. 12). Bei low-grade und high-grade Karzinomen zeigte sich eine ähnliche Verteilung der ER-Expression ($p=0,990$ und $p=0,812$). Auch hier war das homozygote C-Allel am häufigsten vertreten, sowohl bei Tumoren mit fehlender, als auch bei Tumoren mit geringer und positiver ER-Expression. Danach folgten der heterozygote Genotyp und der T/T-Genotyp (Tab. 9).

Tab. 9: Häufigkeitenverteilung des SNP16620 (rs4252697)

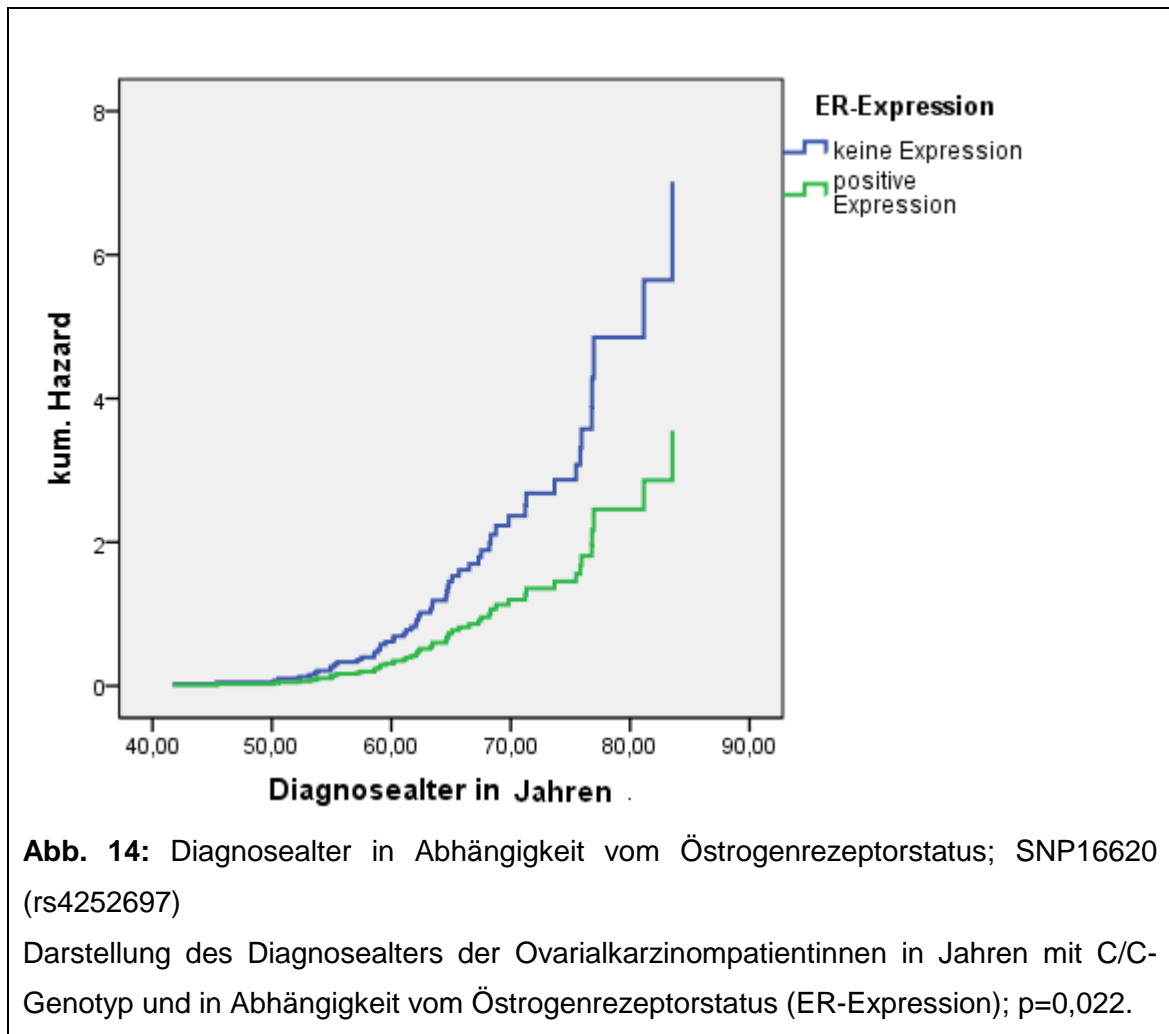
Angabe der Häufigkeiten der gesamten Ovarialkarzinome, sowie der high-grade und low-grade Karzinome in Abhängigkeit vom Allelstatus und der Östrogenrezeptorexpression.

	Östrogenrezeptorstatus						Gesamt n
	keine Expression		geringe Expression		hohe Expression		
	n	%	n	%	n	%	
Karzinome gesamt							
C/C	26	61,9	8	53,3	24	58,5	58
C/T	15	35,7	7	46,7	15	36,6	37
T/T	1	2,4	0	0	2	4,9	3
Gesamt	42	100,0	15	100,0	41	100,0	98
high-grade Karzinome							
C/C	16	57,1	5	45,5	16	53,3	37
C/T	11	39,3	6	54,5	12	40,0	29
T/T	1	3,6	0	0	2	6,7	3
Gesamt	28	100,0	11	100,0	30	100,0	69
low-grade Karzinome							
C/C	10	71,4	3	75,0	8	72,7	21
C/T	4	28,6	1	25,0	3	27,3	8
T/T	0	0	0	0	0	0	0
Gesamt	14	100,0	4	100,0	11	100,0	29



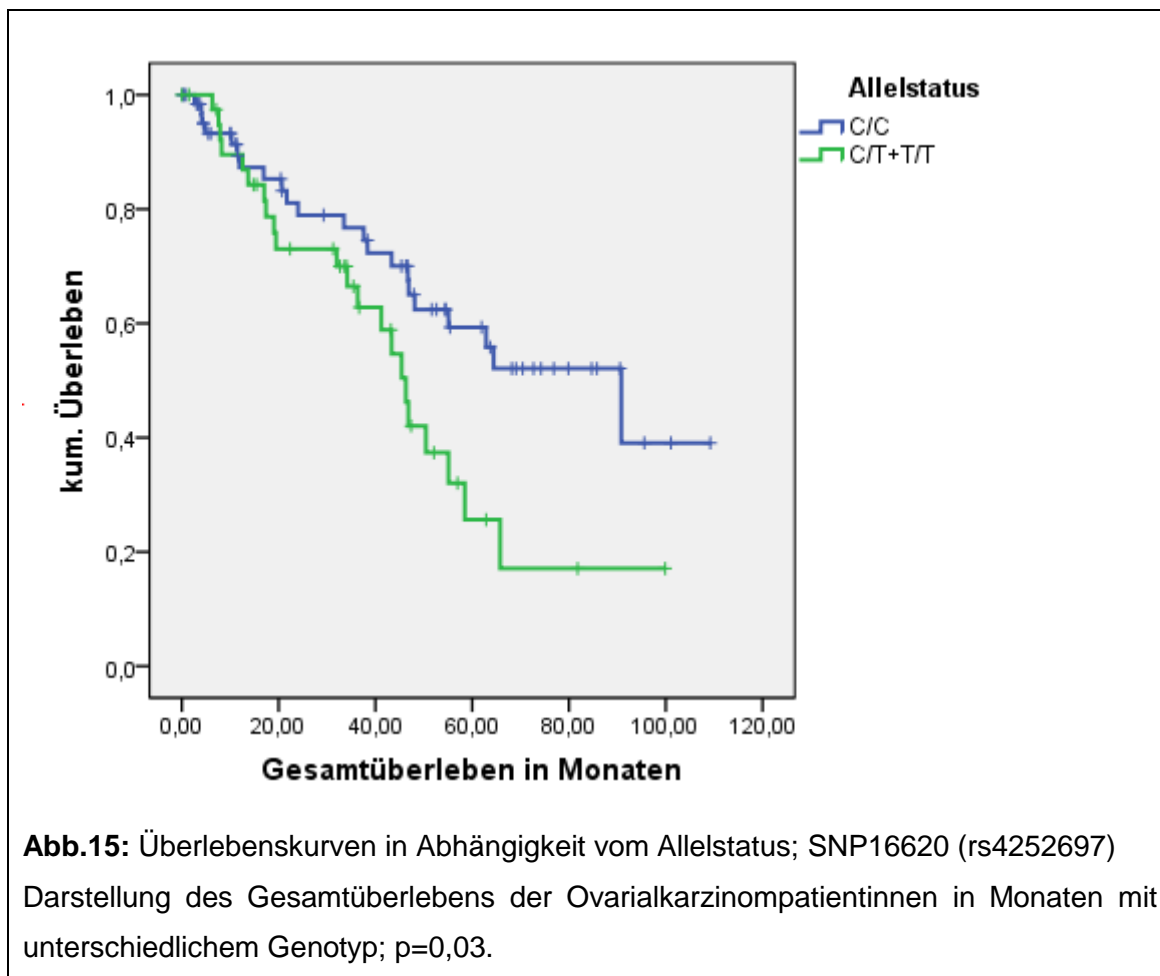
4.2.5.2 Diagnosealter

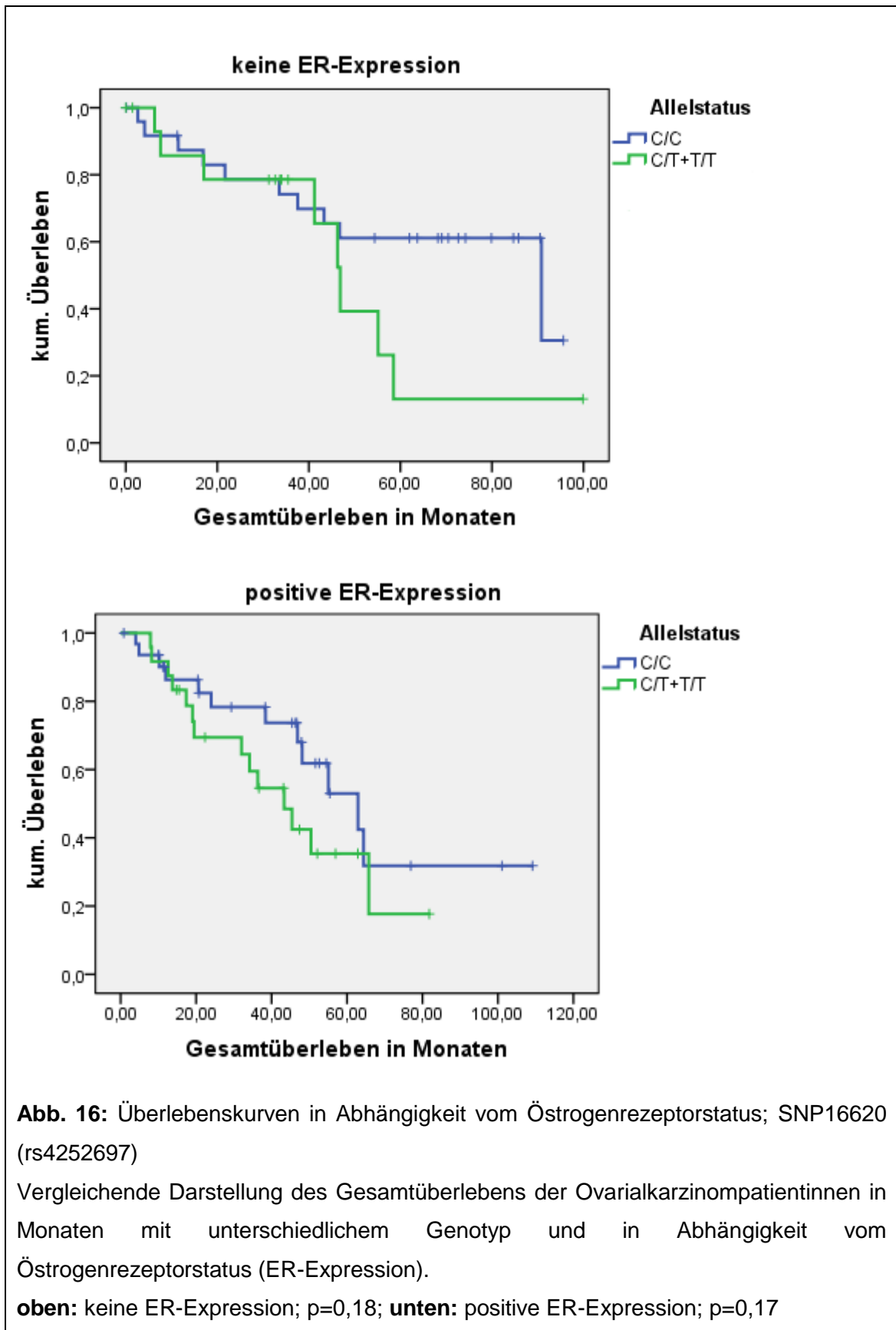
Die Auswertung konnte für diesen SNP ein durchschnittliches Diagnosealter von 64,6 Jahren ermitteln. Unter Kovarianz des Östrogenrezeptorstatus zeigte sich für Frauen mit Tumoren ohne ER-Expression, dass sie signifikant 4 Jahre früher erkrankten als Frauen mit ER-positiven Tumoren (62,1 Jahre versus 66,2 Jahre; $p=0,044$). Aufgrund von niedrigen Fallzahlen in der Gruppe der Patientinnen mit einem homozygoten T-Allel, erfolgte die Aufteilung der Fälle in zwei Gruppen. Dabei wurden die Fälle mit homozygotem C-Allel mit den Fällen verglichen, die mindestens ein T-Allel besitzen. Bei alleiniger Betrachtung des homozygoten C-Allels, zeigte sich für Patientinnen mit Tumoren ohne ER-Expression ein circa 6 Jahre früheres Erkrankungsalter, gegenüber Patientinnen mit ER-exprimierenden Ovarialtumoren (60,4 Jahre versus 66,1 Jahre). Dieser Unterschied ist mit einem p-Wert von 0,022 hochsignifikant (Abb. 14; Tab.12). Zusätzlich erkrankten Frauen mit homozygotem C-Allel signifikant 6 Jahre früher, als Patientinnen mit mindestens einem T-Allel (60,4 Jahre versus 66,4 Jahre, $p=0,049$).



4.2.5.3 Überlebenszeit und Cox-Regression

Für Patientinnen mit homozygotem Wildtyp-Allel, die signifikant früher erkrankten, zeigte sich, dass sie, verglichen mit Patientinnen mit mindestens einem T-Allel, aber signifikant länger überlebten (70,5 Monate versus 48,0 Monate; $p= 0,03$). (Abb. 15). Dieser Unterschied ist unabhängig von der ER-Expression. Die Einbeziehung des Östrogenrezeptors als Kofaktor ergab für Patientinnen mit Ovarialtumoren und positiver ER-Expression eine längere Überlebenszeit, wenn sie homozygot für das C-Allel sind, gegenüber Frauen mit C/T- oder T/T-Genotyp. Gleichmaßen konnte für die Gruppe der Patientinnen mit Tumoren ohne ER-Expression eine längere Überlebenszeit für Patientinnen mit dem Wildtyp-Allel nachgewiesen werden (Abb. 16). Jedoch sind die Unterschiede statistisch nicht signifikant (Tab. 11).





Die Cox-Regression ermittelte für Patientinnen mit mindestens einem T-Allel ein signifikant 2fach höheres Risiko am Tumor zu versterben, gegenüber Patientinnen, die homozygot für das C-Allel sind ($p=0,03$). Ebenfalls konnte für die Gruppen der Ovarialtumoren mit positiver und fehlender ER-Expression jeweils ein 2fach höheres Risiko für Frauen mit C/T- und T/T-Genotyp, im Vergleich zu Frauen mit dem Wildtyp-Allel nachgewiesen werden. Jedoch zeigte sich hier keine statistische Signifikanz ($p=0,17$ für ER positiv; $p=0,19$ für ER negativ) (Tab. 11).

Um den Einfluss des p53-Mutations- und Proteinexpressionsstatus zu untersuchen, wurde analog zu den anderen SNPs eine Aufteilung der Fälle in 3 Gruppen vorgenommen (siehe 4.2.3.3). Die Auswertung der Daten zeigte, dass Patientinnen mit einem homozygotem C-Allel, und Tumoren mit Wildtyp-Gen ohne Expression signifikant länger überlebten (76,9 Monate) als Patientinnen, deren Tumoren Wildtyp-Gen mit Überexpression (52,8 Monate) oder ein mutiertes p53-Gen aufwiesen (49,0 Monate; $p=0,05$) (Tab.10).

Tab. 10: Mittlere Überlebenszeiten in Abhängigkeit vom p53-Mutationsstatus; SNP16620 (rs4252697)

Angabe der mittleren Überlebenszeiten in Monaten in Abhängigkeit vom Genotyp und des p53-Mutations- und Expressionsstatus.

	<i>C/C</i>	<i>C/T+T/T</i>	<i>Gesamt</i>
Wildtyp-Gen, keine Expression	76,9	68,0	76,3
Wildtyp-Gen, Überexpression	52,8	33,7	47,0
mutiert mit/ohne Überexpression	49,0	47,2	48,0

Tab. 11: Zusammenfassung statistischer Ergebnisse der SNPs (Teil 1)

Angabe der mittleren Überlebenszeiten in Monaten und des relativen Risikos mit den dazugehörigen p-Werten in Abhängigkeit vom Allelstatus und der ER-Expression.

SNP	Allelstatus	Mittlere Überlebenszeit¹	p-Wert	Relatives Risiko²	p-Wert
9518					
Gesamt	T/T	61,2	0,58	1,19	0,59
	C/T+C/C	60,8			
ER -	T/T	51,1	0,15	1,93	0,16
	C/T+C/C	69,1			
ER +	T/T	69,9	0,59	0,78	0,59
	C/T+C/C	48,6			
31826					
Gesamt	G/G	57,6	0,14	1,58	0,14
	A/G+A/A	66,8			
ER -	G/G	50,5	0,05	2,52	0,059
	A/G+A/A	74,4			
ER +	G/G	61,5	0,99	0,99	0,99
	A/G+A/A	50,4			
16620					
Gesamt	C/C	70,5	0,03	0,5	0,03
	C/T+T/T	48,0			
ER -	C/C	66,5	0,18	0,5	0,19
	C/T+T/T	47,8			
ER +	C/C	63,4	0,17	0,54	0,17
	C/T+T/T	44,5			

¹ mittlere Überlebenszeit in Monaten ermittelt in Kaplan-Meier-Analyse

² relatives Risiko ermittelt in Cox-Regressionsanalyse

Tab. 12: Zusammenfassung statistischer Ergebnisse der SNPs (Teil 2)

Angabe des Diagnosealters in Jahren mit dem dazugehörigen p-Wert in Abhängigkeit vom Allelstatus und der ER-Expression.

SNP	ER-Expression¹	Diagnosealter²	p-Wert
Allelstatus			
9518			
Gesamt	ER +	66,3	0,044
	ER -	62,2	
T/T	ER +	64,7	0,88
	ER -	64,1	
C/T+C/C	ER +	66,8	0,027
	ER -	61,4	
31826			
Gesamt	ER +	66,4	0,49
	ER -	62,4	
G/G	ER +	65,1	0,99
	ER -	65,1	
A/G+A/A	ER +	67,7	0,005
	ER -	59,4	
16620			
Gesamt	ER +	66,2	0,044
	ER -	62,1	
C/C	ER +	66,1	0,022
	ER -	60,4	
C/T+T/T	ER +	65,7	0,84
	ER -	66,4	

¹ Status der Östrogenrezeptorexpression der Tumoren

² durchschnittliches Alter der Patientinnen bei Diagnosestellung in Jahren

5. Diskussion

5.1 Einfluss der SNPs im MDMX-Gen auf das Erkrankungsalter

Mit der Identifizierung von MDMX wurde ein weiteres Onkogen beschrieben, das die Transkriptionsaktivität und Stabilität von p53 reguliert. Funktionelle p53- und MDM2-Polymorphismen und deren Auswirkungen auf die Tumorzinzidenz, -progression und das Gesamtüberleben bei Ovarialkarzinompatientinnen wurden bereits beschrieben (Grochola, et al. 2010). Demgegenüber ist die Datenlage zu Veränderungen im MDMX-Gen gering. Es ist bekannt, dass sich das MDMX-Gen auf Chromosom 1 in einer Region befindet, die in Ovarialkarzinomen häufig verändert ist (Gallion, et al. 1990). Demzufolge lag der Schwerpunkt dieser Arbeit in der Analyse verschiedener SNPs im MDMX-Gen, um dessen Auswirkungen auf die Tumorentstehung und den Krankheitsverlauf von Patientinnen mit einem malignen Ovarialtumor zu untersuchen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass SNPs das Erkrankungsalter der Ovarialkarzinompatientinnen maßgeblich beeinflussen. Es konnte für den SNP31826 nachgewiesen werden, dass Patientinnen mit dem selteneren Allel im Durchschnitt 5 Jahre früher (59,2 Jahre) erkrankten, als Patientinnen, die homozygot für das Wildtyp-Allel sind (64 Jahre). Dieser Unterschied ist zwar statistisch nicht signifikant, jedoch deutlich als Trend erkennbar ($p=0,087$). Die weitere Unterteilung der Fälle in zwei Gruppen ergab für Patientinnen mit mindestens einem A-Allel ein signifikant 8 Jahre früheres Erkrankungsalter gegenüber Patientinnen mit dem Wildtyp-Allel (59,5 Jahre versus 67,7 Jahre; $p=0,005$). Die zugrunde liegenden Daten wurden in die Arbeit von Atwal et al. aufgenommen und um weitere Fälle erweitert. Insgesamt untersuchte die Arbeitsgruppe den Einfluss des SNP31826 an 110 Frauen mit einem invasiven sporadischen Ovarialkarzinom. Dabei wurde ein durchschnittliches Erkrankungsalter von 64 Jahren festgestellt. Dieses entspricht dem Erkrankungsalter, das wir ermitteln konnten (64,4 Jahre) (Ergebnis nicht gezeigt). Verglichen mit unseren Daten, kam die Studie bezüglich des Allelstatus zu ähnlichen Ergebnissen. Frauen, die homozygot für das Minorallel (A/A-Genotyp) sind, erkrankten signifikant durchschnittlich 9 Jahre früher als Patientinnen mit einem G/G-Genotyp (Atwal, et al. 2009, $p=0,0137$). Damit zeichnete sich, im Vergleich zu unserer Arbeit, sogar ein größerer, statistisch signifikanter Unterschied ab. Eine mögliche Ursache könnte darin liegen, dass in der Arbeit von Atwal et al. eine größere Patientengruppe untersucht wurde. In diesem Zusammenhang sind weitere Studien an anderen Patientenkollektiven notwendig, um die erhobenen Ergebnisse zu bestätigen. Zusätzlich wurden von Atwal et al. auch 95 Frauen mit familiären Ovarialkarzinomen untersucht. Das durchschnittliche Erkrankungsalter betrug 52 Jahre und liegt unter dem Erkrankungsalter der Frauen mit

sporadischen Ovarialkarzinomen. Auch hier zeigte sich, dass Frauen die homozygot für das seltenere Allel sind (A/A-Status), den Tumor im Durchschnitt 4-5 Jahre früher entwickelten, verglichen mit Frauen, die homozygot für das Wildtyp-Allel sind (G/G-Status; $p=0,0236$). Atwal et al. postulierten weiterhin, dass viele SNPs innerhalb des MDMX-Gens miteinander in Beziehung stehen. Diese Korrelation ist in der kaukasischen Bevölkerung stärker als in der afrikanischen oder afroamerikanischen Bevölkerung. Die Haplotypenanalyse der Fälle ergab innerhalb der kaukasischen Bevölkerung einen dominanten Haplotyp in 67% der Fälle, jedoch nur zu einem niedrigeren Prozentsatz (30%) innerhalb der afroamerikanischen Bevölkerung. Dies lässt vermuten, dass die einzelnen Haplotypen unter positivem Selektionsdruck entstanden sind (Atwal, et al. 2009). Auch die Arbeitsgruppe um Kulkarni et al. beschäftigte sich mit dem Einfluss des SNP31826 im Intron 10 des MDMX-Gens an zwei unabhängigen Kohorten von Mammakarzinompatientinnen. Das durchschnittliche Erkrankungsalter betrug in der ersten Kohorte für den homozygoten Wildtyp (C/C) 52,7 Jahre, den heterozygoten Genotyp (C/T) 53,5 Jahre und der homozygoten Variante (T/T) 53,8 Jahre. In der zweiten Kohorte wurde ein deutlich geringeres Diagnosealter von 38,1 Jahren (C/C); 36,0 Jahren (C/T) und 36, 2 Jahren (T/T) ermittelt ($p=0,17$). Die Ergebnisse der Arbeit zeigten, dass Patientinnen mit Brusttumoren ohne ER-Expression 4-5 Jahre früher erkrankten, als Patientinnen mit ER-positiven Tumoren. Unter Kovarianz des Allelstatus konnte bei Tumoren ohne ER-Expression zusätzlich ein früheres Erkrankungsalter für Frauen mit dem selteneren-Allel ermittelt werden, gegenüber Frauen mit mindestens einem C-Allel (Kulkarni, et al. 2009). Ein ähnliches Ergebnis konnte in dieser Arbeit auch anhand des SNP9518 und des SNP16620 gezeigt werden. Patientinnen mit Tumoren ohne ER-Expression erkrankten signifikant früher, als Frauen, deren Tumoren eine positive Östrogenrezeptorexpression aufwiesen (SNP16620: 5,7 Jahre; $p=0,022$; SNP9518: 10 Jahre; $p=0,046$). Untersuchungen ergaben, dass sich im Intron 1 des MDMX-Gens ein zusätzlicher P2-Promotor befindet, der die Transkription einer mRNA steuert, die für eine lange Proteinform kodiert (MDMX-L). Diese verfügt über eine geringere p53-Bindungskapazität und hemmt die p53-abhängige Transkription in einem kleineren Ausmaß (Phillips et al., 2010). Der SNP9518 befindet sich in dieser Region. Durch höhere Affinität zum P2-Promotor könnte das C-Allel verstärkt die Transkription der neuen mRNA induzieren und die Expression der langen Proteinform (MDMX-L) verstärken. Bereits Bond et al. identifizierten einen funktionellen SNP309 im Promotorbereich des MDM2-Gens und beschrieben dessen funktionelle Bedeutung für die Tumorentstehung (Bond, et al. 2004). Die Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass

der Transkriptionsfaktor SP1 mit einer stärkeren Affinität an den G/G-Genotyp des SNP309 bindet. Dies führt zu einer erhöhten MDM2-mRNA Expression und einer subsequenten Abschwächung des p53-Signalwegs (Bond et al., 2004). Im Gegensatz zum MDMX-Gen wurde für MDM2 beschrieben, dass ein intakter Östrogensignalweg notwendig ist, um die Tumorentstehung zu beschleunigen. Tatsächlich besitzt MDM2 im Promotorbereich eine Östrogenrezeptorbindungsstelle, sodass die Transkription der MDM2-mRNA und die Proteinexpression hormonabhängig moduliert werden kann (Liu et al., 2000, Kinyamu und Archer, 2003). Untersuchungen ergaben, dass das G-Allel des SNP309 bei B-Zell-Lymphomen und Weichteilsarkomen mit einem früheren Erkrankungsalter für Frauen, nicht aber für Männer, verbunden ist (Bond et al., 2006). Der humane Östrogenrezeptor aus der Familie der nukleären Rezeptoren ist ein Transkriptionsfaktor, deren Aktivität allosterisch nach Ligandenbindung reguliert wird. Nach Diffusion in die Zelle bindet Östradiol an den Östrogenrezeptor und es erfolgt anschließend die Dimerisierung zweier ligandengebundener Rezeptormoleküle. Erst durch diese Dimerbildung kann der Rezeptor-Hormon-Komplex an seine spezifische Ziel-DNA binden. Diese DNA-Sequenzen befinden sich in der Promotorregion der Zielgene (Kumar und Thompson, 1999). Im Folgenden gelang es, östrogenrezeptorassoziierte Proteine und Koaktivatoren zu ermitteln, die die östrogenrezeptorvermittelte Transkription weiter verstärken (Hanstein et al., 1996; Anzick et al., 1997). Die Arbeitsgruppe um Bond et. al postulierte weiterhin, dass Patientinnen mit einem homozygotem G-Allel im SNP309 und ER-positiven Mammakarzinomen ihren Tumor im Durchschnitt 7 Jahre früher entwickelten, als Patientinnen mit einem T/T-Genotyp. Demgegenüber konnte bei Patientinnen, deren Brusttumoren nur eine geringe ER-Expression aufwiesen, kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Auch für Ovarialkarzinompatientinnen konnte gezeigt werden, dass das G-Allel des SNP309 nur bei starker ER-Expression mit einem 8,5 Jahre früheren Diagnosealter verbunden ist ($p=0,048$), während für Ovarialkarzinome ohne ER-Expression kein Unterschied festgestellt werden konnte ($p=0,44$; Bartel et al., 2008). Auch Galic et al. analysierten den Status des SNP309 an 150 Ovarialkarzinompatientinnen. In dieser Studie zeigte sich keine Korrelation des G-Allels mit einem früheren Tumoraufreten. Jedoch wurde nicht untersucht, ob die ER-Expression als Kofaktor die Karzinominzidenz der Patientinnen beeinflusst (Galic et al., 2007). Für SNPs im MDMX-Gen konnten bisher keine genauen Mechanismen identifiziert werden, die die hormonabhängige Proteinexpression modulieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit geben jedoch Hinweise, dass bestimmte Allele nur bei Tumoren ohne ER-Expression mit einem früheren Tumoraufreten korrelieren. Ein

weiterer SNP (rs1380576) im Intron 1 des MDMX-Gens wurde durch die Arbeitsgruppe um Sun et al. beschrieben. Sie untersuchten den Einfluss des SNP an Patienten mit einem Prostatakarzinom. Dabei wurde keine Assoziation zwischen dem Allelstatus und einem früheren Erkrankungsalter festgestellt. Jedoch wiesen Patienten mit einem G/G-Genotyp ein 1,5fach erhöhtes Risiko auf, das sich ihr Tumor zum Diagnosezeitpunkt in einem höheren Gleason-Score und damit in einem fortgeschritteneren Tumorstadium befindet. Zusätzlich besteht ein höheres Risiko für die Entwicklung eines intermediate-risk oder high-risk Prostatakarzinoms bei Männern mit einem G/G- oder C/G-Genotyp (Sun, et al. 2010). Zusammengenommen kann festgestellt werden, dass genetische Veränderungen im MDMX-Gens einen Einfluss auf die Tumorentstehung besitzen und das Erkrankungsalter der Patienten beeinflussen. Natürlich sind weiterführende Arbeiten notwendig, um die SNPs im MDMX-Gen an weiteren Patientenkollektiven zu untersuchen und weitere Einflussfaktoren zu identifizieren.

5.2 Einfluss der SNPs im MDMX-Gen auf das Gesamtüberleben

Neben dem Erkrankungsalter wurde in dieser Arbeit auch der Einfluss der SNPs auf das Gesamtüberleben der Ovarialkarzinompatientinnen untersucht. In unserem Kollektiv zeigte sich anhand des SNP16620, dass Frauen mit homozygotem Wildtyp-Allel, bei denen ein signifikant früheres Erkrankungsalter nachgewiesen wurde, paradoxerweise auch signifikant länger überlebten, als Frauen mit mindestens einem selteneren Allel (70,5 Monate versus 48 Monate; $p=0,03$). Ebenfalls zeigte sich für den SNP31826, dass Patientinnen, die früher erkrankten, deutlich länger überlebten (74,4 Monate), als Patientinnen, die den Tumor später entwickelten (50,5 Monate). Auch dieser Unterschied ist statistisch signifikant ($p=0,05$). Eine mögliche Ursache könnte im unterschiedlichen Wachstumsverhalten der Tumoren liegen. Demnach würden Patientinnen mit einem weniger aggressiven Ovarialkarzinom (zum Beispiel low-grade Karzinom) länger überleben. Eine weitere Erklärung könnte das klinische Stadium sein, in dem sich die Patientinnen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung befinden. Patientinnen mit Ovarialtumoren in frühen Stadien (FIGO I-II) weisen eine deutlich bessere Überlebenszeit auf, als Patientinnen in einem fortgeschrittenen Stadium (FIGO III-IV). In diesem Zusammenhang wären weiterführende Arbeiten wünschenswert, um mögliche Kofaktoren, die einen Einfluss auf die mittlere Überlebenszeit der Patientinnen besitzen, zu identifizieren. Die Analyse des SNP9518 konnte keinen Unterschied im Gesamtüberleben der Ovarialkarzinompatientinnen nachweisen. Jedoch ergab die Auswertung des p53-Mutationsstatus und der p53-Proteinexpression, dass Frauen, die homozygot für das seltenere Allel sind, signifikant länger überlebten,

wenn der Tumor ein Wildtyp-Gen ohne Proteinexpression aufwies (103 Monate), gegenüber Tumoren mit Wildtyp-Gen und Überexpression (23 Monate; $p=0,004$). Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich auch für die anderen SNPs, die in dieser Arbeit untersucht wurden. Dabei korrelierte jeweils das homozygote Wildtyp-Allel bei Tumoren mit intaktem p53 mit einer signifikant längeren Überlebenszeit gegenüber Tumoren mit Wildtyp-Gen und Überexpression (SNP31826: 93,5 Monate versus 34,7 Monate; $p=0,03$; SNP16620: 76,9 Monate versus 52,8 Monate; $p=0,05$). In der Literatur gibt es widersprüchliche Hinweise zur prognostischen Relevanz des p53-Mutationsstatus und der p53-Proteinexpression bezüglich der Überlebenszeit der Ovarialkarzinompatientinnen. Analog zu unseren Ergebnissen zeigten andere Arbeiten, dass eine p53-Proteinüberexpression mit einer kürzeren Überlebenszeit assoziiert ist (Röhlke et al., 1997; Ozalp et al., 2000; Schildkraut et al., 2000). Demgegenüber konnten andere Arbeitsgruppen keinen Zusammenhang herstellen (Kohler et al., 1993; Eltabbakh et al., 1997; Darcy et al., 2008). Eine mögliche Ursache für die unterschiedlichen Studienergebnisse könnte das jeweilige Verfahren zur Bestimmung der Proteinexpression sein. Die einzelnen Arbeiten verwenden unterschiedliche Antikörper und die Auswertung der Farbmuster erfolgt subjektiv. Zusätzlich werden in den Studien unterschiedliche cut-off-Werte festgelegt, um eine Proteinüberexpression zu definieren. Ein weiterer Faktor liegt im unterschiedlichen Studiendesign der Arbeiten. Das Patientenkollektiv unterscheidet sich zum Teil erheblich und lässt einen Vergleich der Studien nur bedingt zu.

5.3 Einfluss der SNPs im MDMX-Gen auf das rezidivfreie Überleben

Derzeit ist eine Kombinationschemotherapie mit Cisplatin/Carboplatin und Paclitaxel die Standardbehandlung nach zytoreduktiver Chirurgie. Über 80% der Frauen sprechen initial gut auf eine Chemotherapie an und nur ein geringer Anteil ist primär resistent gegenüber Chemotherapeutika (Agarwal und Kaye, 2003). Jedoch entwickelt eine Vielzahl von Patientinnen während der Behandlung eine Chemoresistenz. Ergebnisse aus Zellkulturen geben Hinweise, dass verschiedene Chemotherapeutika ein funktionsfähiges p53 benötigen, damit Zellen die Apoptose einleiten können (Lowe et al., 1993; Hagopian et al., 1999). Das Tumorsuppressorgen besitzt demnach eine Schlüsselrolle in der chemotherapeutisch-induzierten Apoptose. Mutationen des p53-Gens oder Veränderungen im p53-Signalweg könnten eine Chemoresistenz fördern. Demzufolge sollte in dieser Arbeit auch untersucht werden, ob der Allelstatus einen Einfluss auf das rezidivfreie Intervall der Ovarialkarzinompatientinnen besitzt. Der Vergleich der molekularbiologischen Ergebnisse mit den klinischen Daten zeigte

jedoch für die in dieser Arbeit untersuchten SNPs keinen Zusammenhang. Auch unter Kovarianz des Östrogenrezeptorstatus konnte kein Unterschied im rezidivfreien Überleben ermittelt werden (Daten in dieser Arbeit nicht gezeigt). Demgegenüber konnte in einer Arbeit von Wynendaele et al., 2010 jedoch beschrieben werden, dass ein SNP (rs4245739) im MDMX-Gen bei Ovarialkarzinompatientinnen mit einem signifikant schlechteren rezidivfreien Intervall assoziiert war. Die Arbeitsgruppe untersuchte erstmals einen SNP (rs4245739) im 3'-untranslatierten Bereich des MDMX-Gens, der zur Bildung einer neuen Bindungsstelle für die microRNA hsa-miR-191 führt. Diese microRNA wurde in hohen Konzentrationen in zahlreichen normalen und karzinomatös veränderten menschlichen Geweben gefunden (Peltier und Latham, 2008) und ist auch in Ovarialkarzinomen exprimiert (Wynendaele, et al. 2010). In biologischen Prozessen nehmen miRNAs eine wichtige Stellung in der Entwicklung, Differenzierung und Proliferation von Zellen ein und sind wesentlich an der Regulierung von zahlreichen Genen (Tumorsuppressorgene und Onkogene) beteiligt (Erson und Petty, 2009). Bereits Chen et al. beschrieben einen potentiellen Einfluss für SNPs in der 3'-UTR Region auf die miRNA-vermittelte Genregulierung durch Veränderung der mRNA-Stabilität und/oder der Translationseffizienz (Chen, et al. 2008). Dabei werden die durch miRNAs gebundenen Ziel-mRNAs entweder direkt in ihrer Translation gehemmt oder es erfolgt eine Markierung der mRNAs zum proteasomalen Abbau (Bartel, 2004). Tatsächlich konnten Wynendaele et al. zeigen, dass das MDMX-C-Allel die Translationseffizienz und/oder die Stabilität der MDMX-mRNA durch Entwicklung einer neuen hsa-miR-191 Bindungsstelle herabsetzt (Wynendaele, et al. 2010). Entsprechend dieser Beobachtung war die MDMX-Proteinexpression in homozygoten C/C-Ovarialkarzinomen niedrig, während der A/A-Genotyp mit einer erhöhten Expression der MDMX-mRNA korrelierte (Wynendaele, et al. 2010). Die Analyse ergab, dass Ovarialkarzinompatientinnen mit A/A-Status und ohne ER-Expression signifikant kürzer lebten (52 Monate versus 82 Monate) als Patientinnen mit mindestens einem C-Allel ($p=0,042$). Zusätzlich war das rezidivfreie Intervall nach adäquater Chemotherapie bei Patientinnen mit einem A-Allel und ER-negativen Tumoren signifikant kürzer (18,7 Monate versus 50,6 Monate; $p=0,012$) und das Risiko ein Tumorrezidiv zu erleiden, im Vergleich zu Patientinnen mit ER-positiven Tumoren und mindestens einem C-Allel, 4,1fach erhöht ($p=0,02$). Demgegenüber korrelierten ER-positive Tumoren bei A-Allelträgern nicht mit einem höheren Rezidivrisiko (Wynendaele, et al. 2010). In der Literatur gibt es leider keine weiteren Untersuchungen, die den Einfluss von SNPs im MDMX-Gen auf das rezidivfreie Intervall untersuchten, um die derzeitigen Ergebnisse an weiteren Patientenkollektiven

zu bestätigen. Darüber hinaus existieren bekanntermaßen weitere Mechanismen, die zu einer Chemoresistenz führen können. Reles et al. beschrieben, dass eine p53-Überexpression bei Ovarialkarzinompatientinnen signifikant häufiger mit einer Chemoresistenz assoziiert war, verglichen mit Patientinnen ohne p53-überexprimierenden Tumor ($p=0,001$; Reles et al., 2001). Auf der anderen Seite verursachen viele Chemotherapeutika DNA-Schäden, die in Zellen mit intaktem p53 eher repariert werden, als das eine Apoptoseeinleitung erfolgt. Daher müssten Tumoren mit p53-Mutation besser auf eine Chemotherapie ansprechen. Tatsächlich beschrieben Lavarino et al., dass Patientinnen mit p53-mutiertem Ovarialtumor eine höhere Ansprechrate auf chemotherapeutische Maßnahmen besitzen (86%) als Patientinnen mit einem Wildtyp-Gen (47%) (Lavarino et al., 2000). Im Gegensatz dazu zeigte Reles et al., dass Tumoren mit mutiertem p53 häufiger resistent gegenüber einer platinhaltigen Chemotherapie sind, verglichen mit Tumoren, die über ein Wildtyp p53-Gen verfügen. Zusätzlich korrelierte das verändertes p53-Gen mit einem signifikant kürzeren progressionsfreien Intervall ($p=0,037$; Reles et al., 2001). Polymorphismen können in Abhängigkeit von der Genlokalisierung die Proteinexpression oder Proteinsequenz verändern. Demnach könnten SNPs im p53-Gen auch die Sensibilität der Tumorzelle auf ein Chemotherapeutikum beeinflussen. Verschiedene Arbeiten untersuchten den Einfluss des Arg72Pro-Polymorphismus auf das Tumoransprechen nach Chemotherapie. Die Arbeitsgruppe um Sullivan et al. beschrieb eine höhere Apoptoseaktivität in Zellen mit homozygotem Arginin-Status und konnte bei Plattenepithelkarzinomen eine höhere Ansprechrate auf eine Chemotherapie feststellen (Sullivan et al., 2004). Demgegenüber ermittelten andere Studien, dass die Arg72-Variante geringer auf Chemotherapeutika anspricht, als die Pro72-Variante (Bergamaschi et al., 2003; Vikhanskaya et al., 2005). Zusammenfassend geben die Ergebnisse dieser Arbeit deutliche Hinweise, dass SNPs im MDMX-Gen einen Einfluss auf die Entstehung und Progression von Ovarialkarzinomen besitzen.

6. Zusammenfassung

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Analyse von SNPs im MDMX-Gen, um zu untersuchen, ob diese einen Einfluss auf die Entstehung und den Krankheitsverlauf bei Ovarialkarzinompatientinnen besitzen. Die Auswertung des SNP9518 ergab, dass Patientinnen mit homozygotem C-Allel und Tumoren ohne ER-Expression signifikant 10 Jahre früher erkrankten (58,7 Jahre versus 68,2 Jahre) als Patientinnen mit einem ER-exprimierenden Tumor ($p=0,046$). Bei Patientinnen mit SNP31826 und mindestens einem Minor-Allel wurde der Tumor 8 Jahre früher diagnostiziert, wenn keine ER-Expression nachgewiesen wurde (59,4 Jahre versus 67,7 Jahre; $p=0,005$). Ein ähnliches Ergebnis konnte auch für den SNP16620 ermittelt werden. Patientinnen mit Tumoren ohne ER-Expression erkrankten signifikant 6 Jahre früher (60,4 Jahre) verglichen mit Frauen, deren Tumoren einen Östrogenrezeptor exprimierten (66,1 Jahre; $p=0,022$). Des Weiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die SNPs maßgeblich die durchschnittliche Überlebenszeit der Ovarialkarzinompatientinnen beeinflussen, jedoch nur bei Tumoren ohne ER-Expression. Frauen mit Wildtyp-Genotyp und SNP31826 lebten signifikant kürzer (50,5 Monate) als Frauen mit mindestens einem A-Allel (74,4 Monate; $p=0,05$). Patientinnen mit SNP16620 und homozygotem Wildtyp-Allel wiesen ebenfalls eine signifikant längere Überlebenszeit auf bei Tumoren ohne ER-Expression (60,4 Monate versus 66,1 Monate; $p=0,022$). Demgegenüber konnte für Ovarialtumoren mit positiver ER-Expression kein Unterschied im Erkrankungsalter oder der Überlebenszeit nachgewiesen werden. Insgesamt geben die Daten Hinweise, dass die Tumorentstehung in Abhängigkeit von der Östrogenrezeptorexpression moduliert wird. Ein interessantes Ergebnis zeigte sich ausserdem bei der Analyse des p53-Mutations- und Proteinexpressionsstatus. Patientinnen mit Tumoren, die über ein intaktes p53-Gen verfügen, wiesen eine signifikant längere Überlebenszeit auf, als Patientinnen mit Tumoren mit p53-Wildtyp und Überexpression. Zusammengefasst unterstreicht die Arbeit, dass Veränderungen im p53-MDMX-Signalweg die Tumorentstehung und den Krankheitsverlauf der Ovarialkarzinompatientinnen beeinflussen. Weiterführende Studien an neuen Patientenkollektiven sind notwendig, um die vorhandenen Ergebnisse zu bestätigen und weitere Mechanismen zu identifizieren. In Zukunft könnten SNPs im p53-Signalweg eine Bedeutung für die Diagnostik erlangen oder zur Therapieoptimierung beitragen.

Literaturverzeichnis

- 1 Agarwal R, Kaye SB (2003) Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 3:502-516.
- 2 Amos CI, Struwing JP (1993) Genetic epidemiology of epithelial ovarian cancer. *Cancer* 71:566-572.
- 3 Anzick SL, Kononen J, Walker RL, Azorsa DO, Tanner MM, Guan XY, Sauter G, Kallioniemi OP, Trent JM, Meltzer PS (1997) AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science* 277:965-968.
- 4 Atwal GS, Kirchoff T, Bond EE, Montagna M, Menin C, Bertorelle R, Scaini MC, Bartel F, Böhnke A, Pempe C, Gradhand E, Hauptmann S, Offit K, Levine AJ, Bond GL (2009) Altered tumor formation and evolutionary selection of genetics variants in the human MDM4 oncogene. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:10236-10241.
- 5 Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116:281-297.
- 6 Bartel F, Meye, A, Würfl P, Kappler M, Bache M, Lautenschläger C, Grünbaum U, Schmidt H, Taubert, H (2001) Amplification of the *mdm2* gene, but not expression of splice variants of *mdm2* mRNA, is associated with Prognosis in soft tissue sarkoma. *Int J cancer* 95:168-175.
- 7 Bartel F, Schulz J, Böhnke A, Blümke K, Kappler M, Bache M, Schmidt H, Würfl P, Taubert H, Hauptmann S (2005) Significance of HDMX-S (or MDM4) mRNA splice variant overexpression and HDMX gene amplification on primary soft tissue sarcoma prognosis. *Int J Cancer* 117:469-475.
- 8 Bartel F, Jung J, Böhnke A, Gradhand E, Zeng K, Thomssen C, Hauptmann S (2008) Both germ line and somatic genetics of the p53 pathway affect ovarian cancer incidence and survival. *Clin Cancer Res* 14:89-96.
- 9 Bast RC Jr, Klug TL, St John E, Jenison E, Niloff JM, Lazarus H, Berkowitz RS, Leavitt T, Griffiths CT, Parker L, Zurawski VR Jr, Knapp RC (1983) A Radioimmunoassay Using a Monoclonal Antibody to Monitor the Course of Epithelial Ovarian Cancer. *N Engl J Med* 15:883-887.
- 10 Bast RC Jr (2003) Status of tumor markers in ovarian cancer screening. *J Clin Oncol* 21:200-205.
- 11 Beckman G, Birgander R, Sjölander A, Saha N, Holmberg PA, Kivelä A, Beckman L (1994) Is p53 polymorphism maintained by natural selection? *Hum Hered* 44:266-270.
- 12 Bergamaschi D, Gasco M, Hiller L, Sullivan A, Syed N, Trigiane G, Yulug I, Merlano M, Numico G, Comino A, Attard M, Reelfs O, Gusterson B, Bell AK, Health V, Tavassoli M, Farrell PJ, Smith P, Lu X, Crook T (2003) p53 polymorphism influences response in cancer chemotherapy via modulation of p73-dependent apoptosis. *Cancer Cell* 2003 3:387-402.

- 13 Bergamaschi D, Samuels Y, Sullivan A, Zvelebil M, Breysens H, Bisso A, Del Sal G, Syed N, Smith P, Gasco M, Crook T, Lu X (2006) iASPP preferentially binds p53 proline rich region and modulates apoptotic function of codon 72-polymorphic p53." *nature genetics* 38:1133-1141.
- 14 Bertelsen K (1990) Tumor reduction surgery and long-term survival in advanced ovarian cancer: A DACOVA study. *Gyn Onc* 38:203-209.
- 15 Böcker W, Denk H, Heitz P: Repetitorium Pathologie. 2.Aufl. Urban&Fischer, München, 2008, S. 378
- 16 Bolis G, Villa A, Guarnerio P, Ferraris C, Gavoni N, Giardina G, Melpignano M, Scarfone G, Zanaboni F, Parazzini F (1996) Survival of women with advanced ovarian cancer and complete pathologic response at second-look laparotomy. *Cancer* 77:128-131.
- 17 Bond GL, Hu W, Bond EE, Robins H, Lutzker SG, Arva NC, Bargonetti J, Bartel F, Taubert H, Wuerl P, Onel K, Yip L, Hwang SJ, Strong LC, Lozano G, Levine AJ (2004) A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell* 119:591-602.
- 18 Bond GL, Hirshfield KM, Kirchhoff T, Alexe G, Bond EE, Robins H, Bartel F, Taubert H, Wuerl P, Hait W, Toppmeyer D, Offit K, Levine AJ (2006) MDM2 SNP309 accelerates tumor formation in a gender-specific and hormone-dependent manner." *Cancer Res* 66:5104-5110.
- 19 Bougeard G, Baert-Desurmont S, Tournier I, Vasseur S, Martin C, Brugieres L, Chompret A, Bressac-de Paillerets B, Stoppa-Lyonnet D, Bonaiti-Pellie C, Frebourg T (2006) Impact of the MDM2 SNP309 and p53 Arg72Pro polymorphism on age of tumour onset in Li-Fraumeni syndrome. *J Med Genet* 43:531-533.
- 20 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 metaanalysis. *J Clin Oncol* 20:1248-1259.
- 21 Brun JL, Feyler A, Chene G, Saurel J, Brun G, Hocké C (2000) Long-term results and prognostic factors in patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 8:21-27.
- 22 Cahilly-Snyder L, Yang-Feng T, Francke U, George DL (1987) Molecular analysis and chromosomal mapping of amplified genes isolated from a transformed mouse 3T3 cell line. *Somat Cell Mol Genet* 13:235-244.
- 23 Chen J, Wu X, Lin J, Levine AJ (1996) mdm-2 inhibits the G1 Arrest and Apoptosis Functions of the p53 Tumor Suppressor Protein. *Mol Cell Biol* 16:2445-2452.
- 24 Chen K, Song F, Calin GA, Wei Q, Hao X, Zhang W (2008) Polymorphisms in microRNA targets: a gold mine for molecular epidemiology. *Carcinogenesis* 29:1306-1311.

- 25 Chen S, Parmigiani G (2007) Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. *J Clin Oncol* 25:1329-1333.
- 26 Chung HH, Hwang SY, Jung KW, Won YJ, Shin HR, Kim JW, Lee HP (2007) Ovarian cancer incidence and survival in Korea: 1993-2002. *Int J Gynecol Cancer* 17:595-600.
- 27 Cramer DW, Welch WR (1983) Determinants of ovarian cancer risk. II. Inferences regarding pathogenesis. *J Natl Cancer Inst* 71:717-721.
- 28 Danovi D, Meulmeester E, Pasini D, Migliorini D, Capra M, Frenk R, de Graaf P, Francoz S, Gasparini P, Gobbi A, Helin K, Pelicci PG, Jochemsen AG, Marine JC (2004) Amplification of Mdmx (or Mdm4) directly contributes to tumor formation by inhibiting p53 tumor suppressor activity. *Mol and Cell Biol* 24:5835-43.
- 29 Darcy KM, Brady WE, McBroom JW, Bell JG, Young RC, McGuire WP, Linnoila RI, Hendricks D, Bonome T, Farley JH, Gynecologic Oncology Group (2008) Associations between p53 overexpression and multiple measures of clinical outcome in high-risk, early stage or suboptimally-resected, advanced stage epithelial ovarian cancers A Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 111:487-495.
- 30 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* 278:38315-38324.
- 31 Dembo AJ, Davy M, Stenwig AE, Berle EJ, Bush RS, Kjorstad K (1990) Prognostic factors in patients with stage I epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 75:263-273.
- 32 Deutsche Krebsgesellschaft e.V. und Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (2007) Interdisziplinäre Leitlinie: Diagnostik und Therapie maligner Ovarialtumoren, unter: http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-035.pdf [abgerufen am: 24.02.2012] S. 4-5
- 33 Die Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V. (2010) Leitlinie: Diagnostik und Therapie maligner Ovarialtumoren, unter: http://www.dggg.de/fileadmin/public_docs/Leitlinien/1-2-5-ovarialkarzinom-stat-2010.pdf [abgerufen am: 24.02.2012] S.1-4
- 34 Du Bois A, Quinn M, Thigpen T, Vermorken J, Avall-Lundqvist E, Bookman M, Bowtell D, Brady M, Casado A, Cervantes A, Eisenhauer E, Friedlaender M, Fujiwara K, Grenman S, Guastalla JP, Harper P, Hogberg T, Kaye S, Kitchener H, Kristensen G, Mannel R, Meier W, Miller B, Neijt JP, Oza A, Ozols R, Parmar M, Pecorelli S, Pfisterer J, Poveda A, Provencher D, Pujade-Lauraine E, Randall M, Rochon J, Rustin G, Sagae S, Stehman F, Stuart G, Trimble E, Vasey P, Vergote I, Verheijen R, Wagner U, Gynecologic Cancer Intergroup, AGO-OVAR, ANZGOG, EORTC, GEICO, GINECO, GOG, JGOG, MRC/NCRI, NCIC-CTG, NCI-US, NSGO, RTOG, SGCTG, IGCS, Organizational team of the two prior International OCCC (2005) 2004 Consensus statements on the

- management of ovarian cancer - final document of the 3rd International Gynecologic Cancer Intergroup Ovarian Cancer Consensus Conference (GCIG OCCC 2004). *Ann Oncol* 16:viii7-viii12.
- 35 Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC 3rd, George DL, Murphy M (2003) The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nature Genet* 33:357-365.
- 36 Eltabbakh GH, Belinson JL, Kennedy AW, Biscotti CV, Casey G, Tubbs RR, Blumenson LE (1997) p53 overexpression is not an independent prognostic factor for patients with primary ovarian epithelial cancer. *Cancer* 80:892-898.
- 37 Erson AE, Petty EM (2009) miRNAs and cancer, New research developments and potential clinical applications. *Cancer Biol Ther* 8:2317-2322.
- 38 Fakhrazadeh S, Trusko SP, George DL (1991) Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumor cell line. *EMBO J* 10:1565-1569.
- 39 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.
- 40 Fathalla MF (1971) Incessant ovulation - a factor in ovarian neoplasia? *Lancet* 2:163.
- 41 Fields MM, Chevlen E (2006) Ovarian cancer screening: a look at the evidence. *Clin J Oncol Nurs* 10:77-81.
- 42 Finch RA, Donoviel DB, Potter D, Shi M, Fan A, Freed DD, Wang CY, 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.
- 43 Francoz S, Froment P, Bogaerts S, De Clercq S, Maetens M, Doumont G, Bellefroid E, Marine JC (2006) Mdm4 and Mdm2 cooperate to inhibit p53 activity in proliferating and quiescent cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:3232-3237.
- 44 Friedl W, Propping P: Disposition für erbliche Krebserkrankungen. In: Hiddemann W, Bartram C (Hrsg.): *Die Onkologie Teil 1*. 2. Aufl. Springer, Heidelberg, 2010, S. 134.
- 45 Galic V, Willner J, Wollan M, Garg R, Garcia R, Goff BA, Gray HJ, Swisher EM (2007) Common polymorphisms in TP53 and MDM2 and the relationship to TP53 mutations and clinical outcomes in women with ovarian and peritoneal carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 46:239-247.
- 46 Gallion HH, Powell DE, Smith LW, Morrow JK, Martin AW, van Nagell JR, Donaldson ES (1990) Chromosome abnormalities in human epithelial ovarian malignancies. *Gynecol Oncol* 38: 473-477.
- 47 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* 65:9687-9694.
- 48 Gilkes DM, Chen L, Chen J (2006) MDMX regulation of p53 response to ribosomal stress. *EMBO J* 25:5614-5625.
- 49 Goff BA, Sainz de la Cuesta R, Muntz HG, Fleischhacker D, Ek M, Rice LW, Nikrui N, Tamimi HK, Cain JM, Greer BE, Fuller AF Jr (1996) Clear cell carcinoma of the ovary: a distinct histologic type with poor prognosis and resistance to platinum-based chemotherapy in stage III disease. *Gynecol Oncol* 60:412-417.
- 50 Griffiths GT (1975) Surgical resection of tumor bulk in the primary treatment of ovarian carcinoma. *Natl Cancer Inst Monogr* 42:101-104.
- 51 Grimm T: Kopplungsanalyse und Genkartierung. In: Murken J, Grimm T, Holinski-Feder E (Hrsg): Taschenlehrbuch Humangenetik, Thieme, Stuttgart, 2006, S. 355-366.
- 52 Grochola LF, Zeron-Medina J, Meriaux S, Bond GL (2010) Single-nucleotide Polymorphism in the p53 Signaling Pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a001032
- 53 Hagopian GS, Mills GB, Khokhar AR, Bast RC Jr, Siddik ZH (1999) Expression of p53 in cisplatin-resistant ovarian cancer cell lines: modulation with the novel platinum analogue (1R, 2R-diaminocyclohexane)(trans-diacetato)(dichloro)-platinum(IV). *Clin Cancer Res* 5:655-663.
- 54 Hanstein B, Eckner R, DiRenzo J, Halachmi S, Liu H, Searcy B, Kurokawa R, Brown M (1996) p300 is a component of an estrogen receptor coactivator complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:1540-1555.
- 55 Harris N, Brill E, Shohat O, Prokocimer M, Wolf D, Arai N, Rotter V (1986) Molecular basis for heterogeneity of the human p53 protein. *Mol Cell Biol* 6:4650-4656.
- 56 Harris R, Whittemore AS, Itnyre J (1992) Characteristics relating to ovarian cancer risk: collaborative analysis of 12 US case-control studies. III. Epithelial tumors of low malignant potential in white women. Collaborative Ovarian Cancer Group. *Am J Epidemiol* 136:1204-1211.
- 57 Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M (1997) Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387:296-299.
- 58 Helland A, Langerød A, Johnsen H, Olsen AO, Skovlund E, Børresen-Dale AL (1998) p53 polymorphism and risk of cervical cancer. *Nature* 396:530-531.
- 59 Helzlsouer KJ, Bush TL, Alberg AJ, Bass KM, Zacur H, Comstock GW (1993) Prospective study of serum CA-125 levels as markers of ovarian cancer. *JAMA* 269:1123-1126.
- 60 Herzog TJ, Pothuri B (2006) Ovarian cancer: a focus on management of recurrent disease. *Nature* 3:604-611.

- 61 Hess V, A'Hern R, Nasiri N, King DM, Blake PR, Barton DP, Shepherd JH, Ind T, Bridges J, Harrington K, Kayw SB, Gore ME (2004) Mucinous epithelial ovarian cancer: a separate entity requiring specific treatment. *J Clin Oncol* 22:1040-1044.
- 62 Hildesheim A, Schiffman M, Brinton LA, Fraumeni JF Jr, Herrero R, Bratti MC, Schwartz P, Mortel R, Barnes W, Greenberg M, McGowan L, Scott DR, Martin M, Herrera JE, Carrington M (1998) p53 polymorphism and risk of cervical cancer." *Nature* 396:531-532.
- 63 Högberg T, Carstensen J, Simonsen E (1993) Treatment Results and Prognostic Factors in a Population-Based Study of Epithelial Ovarian Cancer. *Gynecol Oncol* 48:38-49.
- 64 Hollstein M, Hainaut P (2010) Massively regulated genes: the example of TP53. *J Pathol* 220:164-173.
- 65 Hornung R, Urs E, Serenella E, Edward W, Ursula S, Urs H, Daniel F (2004) Analysis of potential prognostic factors in 111 patients with ovarian cancer. *Cancer Lett* 206:97-106.
- 66 Hoskins WJ, McGuire WP, Brady MF, Homesley HD, Creasman WT, Berman M, Ball H, Berek JS (1994) The effect of diameter of largest residual disease on survival after primary cytoreductive surgery in patients with suboptimal residual epithelial ovarian carcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 170:974-989.
- 67 Hu W, Feng Z, Ma L, Wagner J, Rice JJ, Stolovitzky G, Levine AJ (2007a) A single nucleotide polymorphism in the MDM2 gene disrupts the oscillation of p53 and MDM2 levels in cells. *Cancer Res* 67:2757-2765.
- 68 Hu W, Feng Z, Teresky AK, Levine AJ (2007b) p53 regulates maternal reproduction through LIF. *Nature* 450:721-724.
- 69 Iwakuma T, Lozano G (2003) MDM2, an introduction. *Mol Cancer Research* 1:993-1000.
- 70 Jackson MW, Berberich SJ (2000) MdmX protects p53 from Mdm2-mediated degradation. *Mol Cell Biol* 20:1001-1007.
- 71 Jänicke F, Hölscher M, Kuhn W, von Hugo R, Pache L, Siewert JR, Graeff H (1992) Radical surgical procedure improves survival time in patients with recurrent ovarian cancer. *Cancer* 70:2129-2136.
- 72 Jones JS, Chi X, Gu X, Lynch PM, Amos CI, Frazier ML (2004) p53 polymorphism and age of onset of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in a Caucasian population. *Clin Cancer Res* 10:5845-5849.
- 73 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.
- 74 Kang HJ, Feng Z, Sun Y, Atwal G, Murphy ME, Rebbeck TR, Rosenwaks Z, Levine AJ, Hu W (2009) Single-nucleotide polymorphism in the p53 pathway regulate fertility in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:9761-9766.

- 75 Khatri RG, Navaratne K, Weil RJ (2008) The role of a single nucleotide polymorphism of MDM2 in glioblastoma multiforme. *J Neurosurg* 109:842-848.
- 76 Kinyamu HK, Archer TK (2003) Estrogen receptor-dependent proteasomal degradation of the glucocorticoid receptor is coupled to an increase in mdm2 protein expression. *Mol Cell Biol* 23:5867-5881.
- 77 Kohler MF, Kerns BJ, Humphrey PA, Marks JR, Bast RC Jr, Berchuck A (1993) Mutation and overexpression of p53 in early-stage epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 81:643-650.
- 78 Kraus A, Neff F, Behn M, Schuermann M, Muenkel K, Schlegel J (1999) Expression of alternatively spliced mdm2 transcripts correlates with stabilized wild-type p53 protein in human glioblastoma cells. *Int J Cancer* 80:930-934.
- 79 Kreienberg R: Klinik. In: Kreienberg R, Bois A, Pfisterer J, Schindelmann S, Schmalfeldt B (Hrsg): Management des Ovarialkarzinoms: Interdisziplinäres Vorgehen. Springer, Heidelberg, 2009, S 72.
- 80 Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH (1997) Regulation of p53 stability by mdm2. *Nature* 387:299-303.
- 81 Kulkarni DA, Vazquez A, Haffty BG, Bandera EV, Hu W, Sun YY, Toppmeyer DL, Levine AJ, Hirshfield KM (2009) A polymorphic variant in human MDM4 associated with accelerated age of onset of estrogen receptor negative breast cancer. *Carcinogenesis* 30:1910-1915.
- 82 Kumar R, Thompson EB (1999) The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids* 64:310-319.
- 83 Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA (1999) Cancer statistics, 1999. *Cancer J Clin* 49:8-31.
- 84 Lane DP (1992) Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358:15-16.
- 85 Lavarino C, Pilotti S, Oggionni M, Gatti L, Perego P, Bresciani G, Pierotto MA, Scambia G, Ferrandina G, Fagotti A, Mangioni C, Lucchini V, Vecchioni F, Bolis G, Scarfone G, Zunino F (2000) p53 gene status and response to platinum/paclitaxel-based chemotherapy in advanced ovarian carcinoma. *J Clin Oncol* 18:3936-3945.
- 86 Le T, Krepart GV, Lotocki RJ, Heywood MS (1997) Does debulking surgery improve survival in biologically aggressive ovarian carcinoma? *Gynecol Oncol* 67:208-214.
- 87 Lee JM, Bernstein A (1993) p53 mutations increase resistance to ionizing radiation." *Proc Natl Acad Sci USA* 90:5742-5746.
- 88 Li C, Chen L, Chen J (2002) DNA damage induces MDMX nuclear translocation by p53-dependent and -independent mechanisms. *Mol Cell Biol* 22:7562-7571.
- 89 Li M, Brooks CL, Wu-Baer F, Chen D, Baer R, Gu W (2003) Mono- versus Polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. *Science* 302:1972-1975.

- 90 Linares LK, Hengstermann A, Ciechanover A, Müller S, Scheffner M (2003) HdmX stimulates Hdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:12009-12014.
- 91 Liu G, Schwartz JA, Brooks SC (2000) Estrogen receptor protects p53 from deactivation by human double minute-2. *Cancer Res* 60:1810-1814.
- 92 Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE (1993) p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 74: 957-967.
- 93 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* 61:3212-3219.
- 94 Malkasian GD Jr, Melton LJ 3rd, O'Brien PC, Greene MH (1984) Prognostic significance of histologic classification and grading of epithelial malignancies of the ovary. *Am J Obstet Gynecol* 149:274-284.
- 95 Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF Jr, Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA (1990) Germ line p53 Mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasm. *Science* 250:1233-1238.
- 96 Mancini F, Di Conza G, Moretti F (2009) MDM4 (MDMX) and its Transcript Variants. *Curr Genomics* 10:42-50.
- 97 Marine JC, Jochemsen AG (2004) Mdmx and Mdm2 Brothers in arms? *Cell Cycle* 3:900-904.
- 98 Marine JC, Dyer MA, Jochemsen AG (2006) MDMX: from bench to bedside. *Journal of J Cell Sci* 120:371-378.
- 99 Markman M, Bookman MA (2000) Second-Line Treatment of Ovarian Cancer. *The Oncologist* 5:26-35.
- 100 Markman M, Rothman R, Hakes T, Reichman B, Hoskins W, Rubin S, Jones W, Almadrones L, Lewis JL Jr. (1991) Second-line platinum therapy in patients with ovarian cancer previously treated with cisplatin. *J Clin Oncol* 9:389-393.
- 101 Matsomoto 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.
- 102 Mendrysa SM, O'Leary KA, McElwee MK, Michalowski J, Eisenman RN, Powell DA, Perry ME (2006) Tumor suppression and normal aging in mice with constitutively high p53 activity. *Genes Dev* 20:16-21.
- 103 Menin C, Scaini MC, De Salvo GL, Biscuola M, Quaggio M, Esposito G, Belluco C, Montagna M, Agata S, D'Andrea E, Nitti D, Amadori A, Bertorelle R (2006) Association between MDM2-SNP309 and age at colorectal cancer diagnosis according to p53 mutation status. *J Natl Cancer Inst* 98:285-288.

- 104 Migliorini D, Danovi D, Colombo E, Carbone R, Pelicci PG, Marine JC (2002a) Hdmx recruitment into the nucleus by Hdm2 is essential for its ability to regulate p53 stability and transactivation. *J Biol Chem* 277:7318-7323.
- 105 Migliorini D, Lazzarini Denchi E, Danovi D, Jochemsen A, Capillo M, Gobbi A, Helin K, Pelicci PG, Marine JC (2002b) Mdm4 (Mdmx) regulates p53-induced growth arrest and neuronal cell death during early embryonic mouse development. *Mol Cell Biol* 22:5527-5538.
- 106 Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ (1992) The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53 mediated transactivation. *Cell* 69:1237-1245.
- 107 Momand J, Jung D, Wilczynski S, Niland J (1998) The mdm2 gene amplification database. *Nucleic Acids Res* 26:3453-3459.
- 108 Moss EL, Hollingworth J, Reynolds TM (2005) The role of CA125 in clinical practice. *J Clin Pathol* 58:308-312.
- 109 Mueller H, Eppenberger U (1996) The dual role of mutant p53 protein in chemosensitivity of human cancers. *Anticancer Res* 3845-3848.
- 110 NCBI Datenbank: SNP short genetic variations (o.J.) unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp> [abgerufen am 24.02.2012].
- 111 Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B (1992) Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* 358:80-83.
- 112 Onel K, Cordon-Cardo C (2004) MDM2 and Prognosis. *Mol Cancer Res* 2:1-8.
- 113 Ozalp SS, Yalcin OT, Basaran GN, Artan S, Kabukcuoglu S, Minsin TH (2000) Prognostic significance of deletion an over-expression of the p53 gene in epithelial ovarian cancer. *Eur J Gynaecol Oncol* 21:282-286.
- 114 Pan Y, Chen J (2003) Mdm2 promotes ubiquitination and degradation of MDMX. *Mol Cell Biol* 23:5113-5121.
- 115 Parant J, Chavez-Reyes A, Little NA, Yan W, Reinke V, Jochemsen AG, Lozano G (2001) Rescue of embryonic lethality in Mdm4-null mice by loss of Trp53 suggests a nonoverlapping pathway with MDM2 to regulate p53. *Nat Genet* 29:92-95.
- 116 Peiretti M, Zanagnolo V, Aletti GD, Bocciolone L, Colombo N, Landoni F, Minig L, Biffi R, Radice D, Maggioni A (2010) Role of maximal primary cytoreductive surgery in patients with advanced epithelial ovarian and tubal cancer: Surgical and oncological outcomes. Single institution experience. *Gynecol Oncol* 119:259-264.
- 117 Peltier HJ, Latham GJ (2008) Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA* 14:844-852.

- 118 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, Böhnke 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* 285:29111-29127.
- 119 Pim D, Banks L (2004) p53 polymorphic variants at codon 72 exert different effects on cell cycle progression. *Int J Cancer* 108:196-199.
- 120 Pisani P, Bray F, Parkin DM (2002) Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. *Int J Cancer* 97:72-81.
- 121 Poyurovsky MV, Prives C (2006) Unleashing the power of p53: lessons from mice and men. *Genes Dev* 20:125-131.
- 122 Prat J: Pathology of the ovary. Saunders, Philadelphia, 2004, p 84.
- 123 Press JZ, De Luca A, Boyd N, Young S, Troussard A, Ridge Y, Kaurah P, Kalloger SE, Blood KA, Smith M, Spellman PT, Wang Y, Miller DM, Horsman D, Faham M, Gilks CB, Gray J, Huntsman DG (2008) Ovarian carcinomas with genetic and epigenetic BRCA1 loss have distinct molecular abnormalities. *BMC Cancer* 8:17.
- 124 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* 86:585-596.
- 125 Rallapalli R, Strachan G, Cho B, Mercer WE, 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.
- 126 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* 61:1839-1842.
- 127 Reles A, Wen WH, Schmider A, Gee C, Runnebaum IB, Kilian U, Jones LA, El-Naggar A, Minguillon C, Schönborn I, Reich O, Kreienberg R, Lichtenegger W, Press MF (2001) Correlation of p53 mutations with resistance to platinum-based chemotherapy and shortened survival in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 7:2984-2997.
- 128 Remmele W, Stegner HE (1987) Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathologie* 8:138-140.
- 129 Ried T, Just KE, Holtgreve-Grez H, du Manoir S, Speicher MR, Schröck E, Latham C, Blegen H, Zetterberg A, Cremer T (1995) Comparative genomic hybridization of formalin-fixed, paraffin-embedded breast tumors reveals different patterns of chromosomal gains and losses in fibroadenomas and diploid and aneuploid carcinomas. *Cancer Res* 55:5415-5423.

- 130 Riedinger JM, Eche N, Basuyau JP, Dalifard I, Hacene K, Pichon MF (2008) Prognostic value of serum CA 125 bi-exponential decrease during first line paclitaxel/platinum chemotherapy: a French multicentric study. *Gynecol Oncol* 109:194-198.
- 131 Riemenschneider MJ, Büschges R, Wolter M, Reifenberger J, Boström J, Kraus JA, Schlegel U, Reifenberger G (1999) Amplification and overexpression of the MDM4 (MDMX) gene from 1q32 in a subset of malignant gliomas without TP53 mutation or MDM2 amplification. *Cancer Res* 59:6091-6096.
- 132 Riman T, Nilsson S, Persson IR (2004) Review of epidemiological evidence for reproductive and hormonal factors in relation to the risk of epithelial ovarian malignancies. *Acta Obstet Gynecol Scand* 83:783-795.
- 133 Robert Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.) (2008) Krebs in Deutschland 2003 – 2004. Häufigkeiten und Trends. 6.Aufl., Berlin, S.12.
- 134 Robinson MJ, Cobb MH (1997) Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 9:180-186.
- 135 Röhlike P, Milde-Langosch K, Weyland C, Pichlmeier U, Jonat W, Löning T (1997) P53 is a persistent and predictive marker in advanced ovarian carcinomas: multivariate analysis including comparison with Ki67 immunoreactivity. *J Cancer Res Clin Oncol* 123:496-501.
- 136 Rosen DG, Yang G, Liu G, Mercado-Uribe I, Chang B, Xiao XS, Zheng J, Xue FX, Liu J (2009) Ovarian cancer: pathology, biology, and disease models. *Front Biosci* 14:2089-2102.
- 137 Ruijs MW, Schmid MK, Nevanlinna H, Tommiska J, Aittomäki K, Prunel R, Verhoef S, Van't LJ (2007) The single-nucleotide polymorphism 309 in the MDM2 gene contributes to the Li-Fraumeni syndrome and related phenotypes. *Eur J Hum Genet* 15:110-114.
- 138 Sanchez-Carbayo M, Socci ND, Kirchoff T, Erill N, Offit K, Bochner BH, Cordon-Cardo C (2007) A polymorphism in HDM2 (SNP309) associates with early onset in superficial tumors, TP53 mutations, and poor outcome in invasive bladder cancer. *Clin Cancer Res* 13:3215-3220.
- 139 Schaaf CP, Zschocke J: Basiswissen Humangenetik. 1. Aufl. Springer, Heidelberg, 2008, S.41-42.
- 140 Schildkraut JM, Halabi S, Bastos E, Marchbanks PA, McDonald JA, Berchuck A (2000) Prognostic factors in early-onset epithelial ovarian cancer: a population based study. *Obstet Gynecol* 95:119-127.
- 141 Schmalfeldt B: Operative Therapie. In: Kreienberg R, Bois A, Pfisterer J, Schindelmann S, Schmalfeldt B (Hrsg): Management des Ovarialkarzinoms: Interdisziplinäres Vorgehen. Springer, Heidelberg, 2009, S. 181.
- 142 Schueler JA, Trimpos JB, Hermans J (1998) The yield of surgical staging in presumed early stage ovarian cancer: Benefits or doubts? *Int J Gynecol Cancer* 8:95-102.

- 143 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.
- 144 Shaw PA, McLaughlin JR, Zweemer RP, Narod SA, Risch H, Verheijen RH, Ryan A, Menko FH, Kenemans P, Jacobs IJ (2002) Histopathologic features of genetically determined ovarian cancer. *Int J Gynecol Pathol* 21:407-411.
- 145 Shen H, Zheng Y, Sturgis EM, Spitz MR, Wei Q (2002) P53 codon 72 polymorphism and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a case control study. *Cancer Lett* 183:123-130.
- 146 Shih IeM, Kurman RJ (2004) Ovarian Tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol* 164:1511-1518.
- 147 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* 15:5349-5357.
- 148 Shvarts A, Bazuine M, Dekker P, Ramos YF, Steegenga WT, Merckx G, van Ham RC, van der Houven van Oordt W, van der Eb AJ, Jochemsen AG (1997) Isolation and identification of the human homolog of a new p53-binding protein, Mdmx. *Genomics* 43:34-42.
- 149 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.
- 150 Silverberg SG (2000) Histopathologic grading of ovarian carcinoma: A review and proposal. *Int J Gynecol Pathol* 19:7-15.
- 151 Singer G, Stöhr R, Cope L, Dehari R, Hartmann A, Cao DF, Wang TL, Kurman RJ, Shih IeM (2005) Patterns of p53 mutations separate ovarian serous borderline tumors and low- and high-grade carcinomas and provide support for a new model of ovarian carcinogenesis: a mutational analysis with immunohistochemical correlation. *Am J Surg Pathol* 29:218-224.
- 152 Sjövall K, Nilsson B, Einhorn N (2002) The significance of serum CA 125 elevation in malignant and nonmalignant diseases. *Gynecol Oncol* 85:175-178.
- 153 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.
- 154 Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Köntgen F, Abbondanzo SJ (1992) Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature*, 359:76-79.
- 155 Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, Breuer J, Leigh IM, Matlashewski G, Banks L (1998) Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* 393:229-234.

- 156 Stalsberg H, Abeler V, Blom GP, Bostad L, Skarland E, Westgaard G (1988) Observer variation in histologic classification of malignant and borderline ovarian tumors. *Hum Pathol* 19:1030-1035.
- 157 Sullivan A, Syed N, Gasco M, Bergamaschi D, Trigiante G, Attard M, Hiller L, Farrell PJ, Smith P, Lu X, Crook T (2004) Polymorphism in wild-type p53 modulates response to chemotherapy in vitro and in vivo. *Oncogene* 23:3328-3337.
- 158 Sun T, Lee GS, Oh WK, Pomerantz M, Yang M, Xie W, Freedman ML, Kantoff PW (2010) Single-nucleotide polymorphism in p53 pathway and aggressiveness of prostate cancer in a Caucasian population. *Clin Cancer Res* 16:5244-5251.
- 159 Swenerton KD, Hislop TG, Spinelli J, LeRiche JC, Yang N, Boyes DA (1985) Ovarian carcinoma: a multivariate analysis of prognostic factors. *Obstet Gynecol* 65:264-270.
- 160 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.
- 161 Tao W, Levine AJ (1999) Nucleocytoplasmic shuttling of oncoprotein Hdm2 is required for Hdm2-mediated degradation of p53. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:3077-3080.
- 162 Tavassoli FA, Devilee P: World Health Organization Classification of Tumours. Pathology & Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. IARC Press, Lyon, 2003, pp 113-176.
- 163 Thigpen T, Brady MF, Omura GA, Creasman WT, McGuire WP, Hoskins WJ, Williams S (1993) Age as a prognostic factor in ovarian carcinoma. The Gynecologic Oncology Group experience. *Cancer* 71:606-614.
- 164 Thomas M, Kalita A, Labrecque S, Pim D, Banks L, Matlashewski G (1999) Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Mol Cell Biol* 19:1092-1100.
- 165 Tirkkonen M, Tanner M, Karhu R, Kallioniemi A, Isola J, Kallioniemi OP (1998) Molecular cytogenetics of primary breast cancer by CGH. *Genes Chromosomes Cancer* 21:177-184.
- 166 Toledo F, Wahl GM (2006) Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer* 12:909-923.
- 167 Tumorregister München 2011 Überleben C56, D39.1:Ovarialtumor (2011) unter: http://www.tumorregister-muenchen.de/facts/surv/surv_C56D_G.pdf [abgerufen am: 24.02.2012] S. 1-6
- 168 van Nagell JR Jr, DePriest PD, Ueland FR, DeSimone CP, Cooper AL, McDonald JM, Pavlik EJ, Kryscio RJ (2007) Ovarian cancer screening with annual transvaginal sonography: findings of 25,000 women screened. *Cancer* 109:1887-1896.

- 169 Venot C, Maratrat M, Dureuil C, Conseiller E, Bracco L, Debussche L (1998) The requirement for the p53 proline-rich functional domain for mediation of apoptosis is correlated with specific PIG3 gene transactivation and with transcriptional repression. *The EMBO Journal* 17:4668-4679.
- 170 Vikhanskaya F, Siddique MM, Kei Lee M, Broggin M, Sabapathy K (2005) Evaluation of the combined effect of p53 codon 72 polymorphism and hotspot mutations in response to anticancer drugs. *Clin Cancer Res* 11:4348-4356.
- 171 Villa A, Parazzini F, Acerboni S, Guarnerio P, Bolis G (1998) Survival and prognostic factors of early ovarian cancer. *Br J Cancer* 77:123-124.
- 172 Vogelstein B, Lane D, Levine AJ (2000) Surfing the p53 network. *Nature* 408:307-310.
- 173 Walker KK, Levine AJ (1996) Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:15335-15340.
- 174 Weiß C: Basiswissen Medizinische Statistik. 5. Aufl. Springer, Berlin, 2010, S. 319.
- 175 Welcsh PL, King MC (2001) BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Hum Mol Genet* 10:705-713.
- 176 Wimberger P, Wehling M, Lehmann N, Kimmig R, Schmalfeldt B, Burges A, Harter P, Pfisterer J, du Bois A (2010) Influence of residual tumor on outcome in ovarian cancer patients with FIGO Stage IV disease: an exploratory analysis of the AGO-OVAR (Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Ovarian Cancer Study Group). *Ann Surg Oncol* 17:1642-1648.
- 177 Wu X, Bayle JH, Olson D, Levine AJ (1993) The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev* 7:1126-1132.
- 178 Wynendaele J, Böhnke A, Leucci E, Nielsen SJ, Lambertz I, Hammer S, Sbrzesny N, Kubitza D, Wolf A, Gradhand E, Balschun K, Braicu I, Sehouli J, Darb-Esfahani S, Denkert C, Thomssen C, Hauptmann S, Lund A, Marine JC, Bartel F (2010) An illegitimate microRNA target site within the 3'UTR of MDM4 affects ovarian cancer progression and chemosensitivity. *Cancer Res* 70:9641-9649.
- 179 Yamashita T, Yaginuma Y, Saitoh Y, Kawai K, Kurakane T, Hayashi H, Ishikawa M (1999) Codon 72 polymorphism of p53 as a risk factor for patients with human papillomavirus-associated squamous intraepithelial lesions and invasive cancer of the uterine cervix. *Carcinogenesis* 20:1733-1736.
- 180 Yoon YJ, Chang HY, Ahn SH, Kim JK, Park YK, Kang DR, Park JY, Myoung SM, Kim do Y, Chon CY, Han KH (2008) MDM2 and p53 polymorphisms are associated with the development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Carcinogenesis* 29:1192-1196.
- 181 Young RC, Decker DG, Wharton JT, Piver MS, Sindelar WF, Edwards BK, Smith JP (1983) Staging laparotomy in early ovarian cancer. *JAMA*. 250:3072-3076.

- 182 Zehbe I, Voglino G, Wilander E, Genta F, Tommasino M (1999) Codon 72 polymorphism of p53 and its association with cervical cancer. *The Lancet* 354:218-219.

Tabellenanhang

Tab. 13: Stadieneinteilung des Ovarialkarzinoms (TNM- und FIGO-Klassifikation) (Deutsche Krebsgesellschaft e.V., deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, 2007)

TNM		FIGO		Befundsituation
T1		I		Tumor begrenzt auf Ovarien
	T1a		IA	Tumor auf ein Ovar begrenzt; Kapsel intakt; kein Tumor auf der Oberfläche des Ovars
	T1b		IB	Tumor auf beide Ovarien begrenzt; Kapsel intakt; kein Tumor auf der Oberfläche beider Ovarien
	T1c		IC	Tumor begrenzt auf ein oder beide Ovarien mit Kapselruptur; Tumor an Ovaroberfläche oder maligne Zellen im Aszites oder bei Peritonealspülung
T2		II		Tumor befällt ein oder beide Ovarien und breitet sich im Becken aus
	T2a		IIA	Ausbreitung auf und/oder Implantate an Uterus und/oder Tube(n)
	T2b		IIB	Ausbreitung auf andere Beckengewebe
	T2c		IIC	Ausbreitung im Becken und maligne Zellen im Aszites oder bei Peritonealspülung
T3+/- N1		III		Tumor befällt ein oder beide Ovarien, mit histologisch nachgewiesenen Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens und/oder regionären Lymphknotenmetastasen
	T3a		IIIA	Mikroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens
	T3b		IIIB	Makroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens, größte Ausdehnung ≤ 2 cm
	T3c +/- N1		IIIC	Peritonealmetastasen jenseits des Beckens, größte Ausdehnung > 2 cm, und/oder regionäre Lymphknotenmetastasen
	NX			Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
	N0			Keine regionären Lymphknotenmetastasen
	N1			Regionäre Lymphknotenmetastasen
M1		IV		Fernmetastasen (ausschließlich Peritonealmetastasen)

Thesen

1. Trotz verbesserter Therapien ist das Ovarialkarzinom auch heute noch mit einer hohen Mortalitätsrate und Rezidivneigung assoziiert.
2. Der p53-Signalweg hat einen Einfluss auf die Entstehung und Progression von Ovarialkarzinomen.
3. Der SNP9518 im MDMX-Gen (rs3789052) beeinflusst das Erkrankungsalter von Ovarialkarzinompatientinnen signifikant. Patientinnen mit homozygotem C-Allel und Ovarialtumoren ohne ER-Expression erkrankten 10 Jahre früher, gegenüber Patientinnen mit einem ER-positiven Tumor ($p=0,046$).
4. Ovarialkarzinompatientinnen mit SNP31826 (rs1563828) und mindestens einem Minor-Allel erkrankten signifikant früher, wenn keine ER-Expression nachgewiesen wurde, verglichen mit Patientinnen mit ER-positiven Tumoren ($p=0,005$).
5. Der SNP31826 besitzt eine Auswirkung auf die durchschnittliche Überlebenszeit der Ovarialkarzinompatientinnen bei Tumoren ohne ER-Expression. Frauen mit mindestens einem mutiertem Allel überlebten signifikant länger als Frauen, die homozygot für das Wildtyp-Allel sind ($p=0,005$).
6. Der SNP16620 (rs4252697) hat eine Auswirkung auf das Erkrankungsalter der Patientinnen mit homozygotem Wildtyp-Allel und Tumoren ohne ER-Expression. Sie erkrankten signifikant 6 Jahre früher als Patientinnen mit ER-exprimierenden Tumoren ($p=0,022$).
7. Der SNP16620 beeinflusst das Überleben der Ovarialkarzinompatientinnen. Patientinnen mit homozygotem Wildtyp-Allel wiesen eine signifikant längere Überlebenszeit auf, als Patientinnen mit mindestens einem mutierten Allel ($p=0,03$).
8. Die Entstehung der Ovarialkarzinome wird in Abhängigkeit von der ER-Expression moduliert

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Christina Pempe
Geburtsdatum/-ort 26.01.1982 in Halle (Saale)
Familienstand ledig
Staatsangehörigkeit Deutsch
Wohnort Max-Planck-Str. 16, 04105 Leipzig
Christina.Pempe@web.de
Tel.: 0176/62048053

Schulausbildung

1988-1993 Grundschule „Wolfgang-Borchert“ Halle
1993-2000 Gymnasium im Bildungszentrum Halle
Abschluss Allgemeine Hochschulreife, Note 1,6

Studium

2000-2004 Studium der Betriebswirtschaft an der Martin-Luther
Universität Halle-Wittenberg, Abschluss Vordiplom
2004-2010 Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther Universität
Halle-Wittenberg
09/2006 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note „gut“
10/2010 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note „sehr gut“

Beruflicher Werdegang

seit 02/2011 Assistenzärztin in der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie
am Carl-von-Basedow-Klinikum Merseburg

Leipzig, den 27.02.2012

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Leipzig, den 27.02.2012

Erklärung über frühere Promotionsversuche

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

Leipzig, den 27.02.2012

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn PD Dr. Frank Bartel für die Überlassung des Themas, für die hervorragende Betreuung und die gute Zusammenarbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Pathologie für die Unterstützung bei der Durchführung der Versuche und die vielen Hilfestellungen bedanken.

Abschließend danke ich meiner Familie, meinem Freund und meinen Freunden für die moralische Unterstützung und die stetige Motivation bei der Erstellung dieser Arbeit.