

Universität Ulm

*Abteilung für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. R. Kreienberg*

**Ein Polymorphismus im
Intron 3 des p53-Gens und
erhöhtes Risiko für Ovarialkarzinom**

*Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm*

vorgelegt von

**Raimund Ingo Herzog,
geboren in Bad Godesberg**

Ulm 1998

Amtierender Dekan: Prof. Dr. P. Gierschik
1. Berichterstatter: Prof. Dr. I. Runnebaum
2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Adler
Tag der Promotion: 13.4.2000

Inhaltsverzeichnis

1. <i>Abkürzungsverzeichnis</i>	4
2. <i>Einleitung</i>	6
2.1. <i>Das Ovarialkarzinom</i>	6
2.2. <i>Das Tumorsuppressorgen p53</i>	9
2.3. <i>Polymorphismus im Intron 3 des p53-Gens</i>	14
2.4. <i>Die Fragestellung</i>	15
3. <i>Material und Methoden</i>	16
3.1. <i>Material</i>	16
3.2. <i>Molekularbiologische Methoden</i>	19
3.3. <i>Statistische Methoden</i>	25
3.4. <i>Charakteristika der Studie</i>	26
4. <i>Ergebnisse</i>	27
4.1. <i>Darstellung des Polymorphismus im Intron 3 auf einem Agarosegel</i>	27
4.2. <i>Verteilung des p53PIN3 bei Ovarialkarzinompatientinnen und gesunden Individuen</i>	28
4.3. <i>p53PIN3 und die klinisch-pathologischen Parameter</i>	29
5. <i>Diskussion</i>	33
6. <i>Zusammenfassung</i>	40
7. <i>Literaturverzeichnis</i>	41
8. <i>Danksagungen</i>	56
9. <i>Lebenslauf</i>	57

1. *Abkürzungsverzeichnis*

χ^2 -HW	Chi-Quadrat-Test, angewandt auf das Hardy-Weinberg-Gesetz
χ^2	Chi-Quadrat
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
17p	kurzer Arm des Chromosoms 17
6q	langer Arm des Chromosoms 6
A1	Allel 1
A2	Allel 2
AF	Allelfrequenz
am.	amerikanisch
bp	Basenpaar
brit.	britisch
CA 125	Cancer antigen 125
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	2'-Nucleosid-5'-Triphosphat
EDTA	Etylendiamintetraacetat
G	Grading
H ₂ O	Wasser
HCl	Hydrogeniumchlorid
HW	Hardy-Weinberg-Gesetz
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
Konz.	Konzentration
LOH	Verlust der Heterozygotie
M	molar / Metastasenstatus
MgCl ₂	Magnesiumchlorid

ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	Messenger Ribonucleic acid
N	Lymphknotenstatus
n	Stückzahl
Na	Natrium
nm	Nanometer
O-297	Oligopeptid-297
OD	optische Dichte
OR	odds ratio
OV. Ca	Ovarialkarzinom
p-Wert	Irrtumswahrscheinlichkeit
p53	Tumorsuppressorgen p53
p53PIN3	Polymorphismus im Intron 3 des p53-Gens
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	pondus Hydrogenii (-log[H ⁺])
pTNM	von der Pathologie durchgeführtes Staging
T	Tumorgröße
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
Tris	Tris(Hydroxymethyl)Aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan Monolaurat
U/min	Umdrehungen pro Minute
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
UV	Ultraviolett
w/v	Gewicht pro Volumen
WAF1	Wild-type p53-activated factor

2. Einleitung

2.1. Das Ovarialkarzinom

2.1.1. Inzidenz und klinische Merkmale

Bei etwa einem Viertel aller weiblichen Genitaltumoren handelt es sich um einen malignen Ovarialtumor. 90% davon sind epithelialen Ursprungs. Das Ovarialkarzinom ist die viert häufigste Todesursache bei Frauen in westlichen Ländern und mit 40% Anteil die häufigste unter den malignen Tumoren des weiblichen Genitale. Der größte Teil der Ovarialkarzinome manifestiert sich vor allem zwischen der 5. und 7. Lebensdekade. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt stadienabhängig 25-35% [78].

Die Tatsache, daß über 70% der Patientinnen mit Ovarialkarzinom zum Zeitpunkt der Operation bereits Metastasen im Mittel- und Oberbauch haben (FIGO Stadium III) ist darauf zurückzuführen, daß oft Wochen oder Monate vergehen, bis bei derart uncharakteristischen Beschwerden wie Bauchschmerzen, Fieber oder Darmverschuß an ein Ovarialkarzinom gedacht wird [29].

2.1.2. Die verschiedenen pathologisch-morphologischen Typen

Die epithelialen Tumoren des Ovars, machen zwei Drittel aller Ovarialkarzinome aus. Sie sind meist serös oder muzinös differenziert. Als weitere Formen gibt es solche, die das endozervikale Epithel und das des Endometriums imitieren [7].

Man unterscheidet bei den malignen Epitheltumoren hoch- und niedrigmaligne Formen. Die niedrigmalignen Karzinome, die sogenannten Borderlinetumoren, weisen zwar eine charakteristische Gewebe und Zellatypie auf, es kann bei ihnen jedoch kein invasives Tumorwachstum nachgewiesen werden.

Diese Tumoren wurden in der Studie nicht berücksichtigt. Gegenstand der Betrachtung sind allein die hochmalignen Karzinome, von denen es fünf verschiedene Ausprägungsformen gibt: das Seröse Zystadenokarzinom, das Muzinöse Zystadenokarzinom, das Endometrioides Karzinom, das Klarzellige Karzinom und das nicht näher einzuordnende undifferenzierte Ovarialkarzinom [67]. Diese alle werden in der hier vorgelegten Studie betrachtet.

Die für die Auswertung der Studie notwendige Einteilung in unterschiedliche Tumorgrade erfolgt anhand der üblichen TNM und G Einteilung, wie sie von der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) herausgegeben wurde [7].

Es besteht eine direkte Beziehung zwischen der Einteilung in ein bestimmtes Tumorstadium und der 5-Jahres-Überlebenszeit der Patientinnen. Sie beträgt im Stadium T1 ungefähr 70%, im Stadium T2 35%, im Stadium T3 15% und im Stadium T4 weniger als 5% [7]. In die Gesamtprognose gehen darüber hinaus das Ausmaß der chirurgischen Tumorreduktion und die anderen der bisher genannten Parameter ein.

2.1.4. Molekulargenetische Grundlagen des Ovarialkarzinoms

Schon lange nahm man an, daß es sich beim Ovarialkarzinom um eine Erkrankung handelt, bei der genetische Veränderungen eine Rolle spielen [43]. Beobachtungen an Familien, bei denen die Krankheit über mehrere Generationen hinweg auftrat, belegten diesen Sachverhalt [42, 46, 48, 55, 60, 72]. In manchen Fällen traten neben dem Ovarialkarzinom auch an anderen Lokalisationen Tumoren auf, was auf einen grundlegenden Defekt bei der Zellproliferationskontrolle hindeutete [84].

Chromosomenanalysen bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom ergaben, daß Erbgutveränderungen bei Tumoren auch ohne eine familiäre Häufung vorkommen können [91]. In diesen Fällen spricht man vom sporadischen Ovarialkarzinom [20]. Man fand bei 44 von 72 Patientinnen eine Deletion vom Chromosomenarm 6q, die jedoch nicht hinreichend statistisch belegt werden konnte. Um eine Region auf 6q zu bestimmen, die ein vermutetes Tumorsuppressorgen für Ovarialkarzinome enthält, untersuchte man an 70 Ovarialkarzinomen den Verlust des jeweils zugehörigen zweiten, entweder väterlichen oder mütterlichen Allels, den sogenannten Verlust der Heterozygotie, Englisch: **loss of heterozygosity (LOH)** [69]. Es wurde beim epithelialen Ovarialkarzinom LOH sowohl auf 17q, als auch auf 17p beschrieben [17]. Der jedoch weitaus größte Teil der bisher veröffentlichten molekularen Veränderungen bei Ovarialkarzinomen [18, 39, 62, 71] variiert zwischen 46% und 80%

und ist in dem Bereich von 17p13 zu finden. Auf diesem kurzen Abschnitt des Chromosoms 17 ist, wie in der Abbildung dargestellt, das Tumorsuppressorgen p53 lokalisiert [26, 53, 57].

Heute teilt man die familiären Ovarialkarzinome ein in das Brust- und Ovarialkarzinom-Syndrom [59, 28], das meistens mit Mutationen im 1992 entdeckten BRCA1 oder BRCA2 Gen einhergehen, das Hereditäre nicht Polyposis Coli assoziierte Ovarialkarzinom mit Mutationen in mehreren Genen [47] und die sporadischen Ovarialkarzinome ein. Bei der Entstehung der letzteren, die mit 95% den größten Anteil ausmachen, können Keimbahnveränderungen bei Genen, die die verschiedensten Mechanismen regulieren, eine Rolle spielen. So zum Beispiel bei Genen der Zellproliferation, Apoptose, der DNA-Reparatur, dem Stoffwechsel von Karzinogenen, bei Abwehrreaktionen, einschließlich der Immunantwort [14].

Ein Gen, das gleich an mehreren solcher Schlüsselstellen eine Rolle spielt, ist das bereits erwähnte p53 Tumorsuppressorgen.

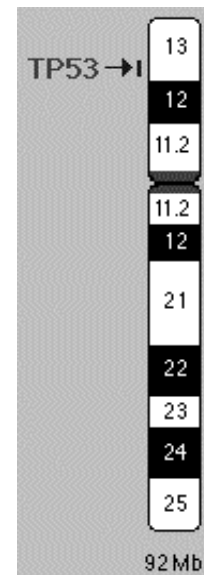


Abb. 1:
Chromosom 17 mit dem p53-Genlocus

2.2. Das Tumorsuppressorgen p53

2.2.1. Das p53-Gen und sein Genprodukt

Das humane p53-Gen umfaßt 20kb DNA und enthält 11 Exons, wobei das erste Exon nicht kodierend [4] und das erste Intron sehr groß ist (10kb) [35]. Das p53-Gen kodiert beim Menschen für eine mRNA von 2,8kb Größe [51].

Mit Hilfe eines Chloramphenicol-Acetyltransferaseassays [66] konnten die regulatorischen Regionen des p53-Gens charakterisiert werden. Es wurden zwei verschiedene Regionen ausgemacht, in denen Promotoren vorlagen. Die erste ist 100 bis 250 Basenpaare 5', das heißt vor dem ersten nichtkodierenden Exon zu finden. Die zweite ist innerhalb des ersten Introns des wesentlich stärkeren zweiten Promotors lokalisiert.

Wie beschrieben wurde, kann eine Inaktivierung des p53-Gens sowohl durch Mutation als auch durch die Interaktion mit onkogenen Produkten von DNA-Tumoviren zu der Entstehung von Krebs führen [40].

Bei diesen Mutationen handelt es sich um die häufigste in menschlichen Tumoren auftretende genetische Veränderung überhaupt. Sie finden sich in fünf Regionen des Proteins, die innerhalb mehrerer unterschiedlicher Spezies stark konserviert sind. Es gibt mindestens drei Orte, die besonders häufig von Mutationen betroffen sind, nämlich die Aminosäuren 175, 248 und 273. Der höchste prozentuale Anteil der Mutationen ist an Position 273 zu finden [61].

Das p53-Genprodukt umfaßt insgesamt 393 Aminosäuren, mit einer zentralen Region von Aminosäure 100 bis 300, die die DNA-Bindungsdomäne beinhaltet. Dieser proteolyseresistente Kernbereich grenzt an einen carboxyterminalen Abschnitt, der die drei nukleären Lokalisationssignale enthält, die die Einschleusung des Proteins in den Zellkern regulieren [74]. Weiterhin ist dieser Abschnitt für die Oligomerisation zuständig.

Der aminoterminaler Anteil, der eine stark transkriptionsaktivierende Domäne enthält [86], ist der dritte funktionell unterscheidbare Bereich.

Es gelang, die zentrale Region gemeinsam mit gebundener DNA auszukristallisieren [11]. Aus der Röntgenstrukturanalyse ergab sich, daß das p53-Protein aus einer großen

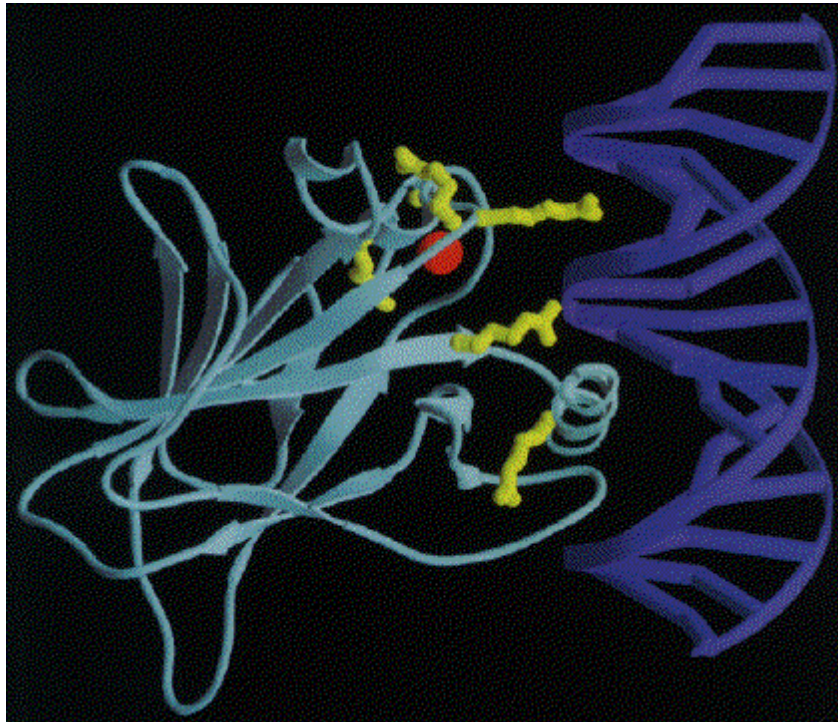


Abb. 2: Dreidimensionale Struktur des p53-Genproduktes mit gebundener DNA

doppellagigen Struktur, die das Gerüst für einen aus drei Schleifen bestehenden Abschnitt bildet, besteht. Diese doppellagige Struktur ist aus zwei antiparallel gelegenen beta-Faltblattabschnitten aufgebaut, die jeweils vier und fünf beta-Bereiche enthalten. Die erste Schleife bindet die DNA in der großen und die zweite in der kleinen Rinne. Die dritte Schleife wiederum faltet sich so, daß sie die zweite Schleife mitsamt der DNA stabilisiert. Eine der bemerkenswertesten und für die funktionelle Bedeutung dieser Abschnitte sprechende Tatsache ist die Korrelation mit der Lokalisation der Mutationen. Die in den Tumoren auftretenden Mutationen sind alle in der Nähe und meistens sogar direkt in dem Bereich der Protein-DNA Interaktion zu finden. Darüber hinaus liegen über zwei Drittel der Missense-Mutationen in einer der drei DNA Schleifen [74].

Weitere Mutationen des Gens sind in den Introns zu finden. Man vermutet, daß beispielsweise das Intron 4 die Effizienz der Expression reguliert [32, 33, 73]. 1990 wurde gezeigt [83], daß Punktmutationen in Introns die tumorsupprimierende Wirkung des Proteins unterbinden können.

Punktmutationen an den sogenannten 'splice acceptor sites' des dritten Introns und an den 'splice donor sites' des siebten Introns stören die normale mRNA-Transkription.

2.2.2. Die Funktion von p53

In Experimenten, bei denen Zellenkulturen mit γ -Strahlen bestrahlt wurden, zeigte sich, daß p53 bestimmte Gene aktiviert, die einen größeren Zellschaden verhindern. Dadurch wurde die zuvor vermutete Rolle von p53 als ein Tumorsuppressorgen bestätigt [38].

Die folgende Reihe von Schritten, trägt zu der tumorsupprimierenden Funktion von p53 bei [19]: Die Expression von p53 wird unter bestimmten Bedingungen, wie zum Beispiel bei DNA-Beschädigung oder zellulärem Streß stimuliert.

Daraufhin bindet es an regulatorische Abschnitte des WAF1 Gens, welches dann exprimiert wird. WAF1 wiederum bindet an eine cyclinabhängige Kinase CDK2, deren phosphorylierende Aktivität dadurch blockiert und der Zellzyklus in seiner Abfolge unterbrochen wird. Auch an anderen Stellen greift p53 in die Steuerung des Zellwachstums ein: Bei der Zellzyklusregulation [15, 30, 44, 50, 82, 87, 94], der DNA-Replikation [93], dem Nukleotidstoffwechsel [76] und bei der Zelldifferenzierung [75].

In der folgenden Abbildung sind die grundlegenden Funktionen von p53 beschrieben:

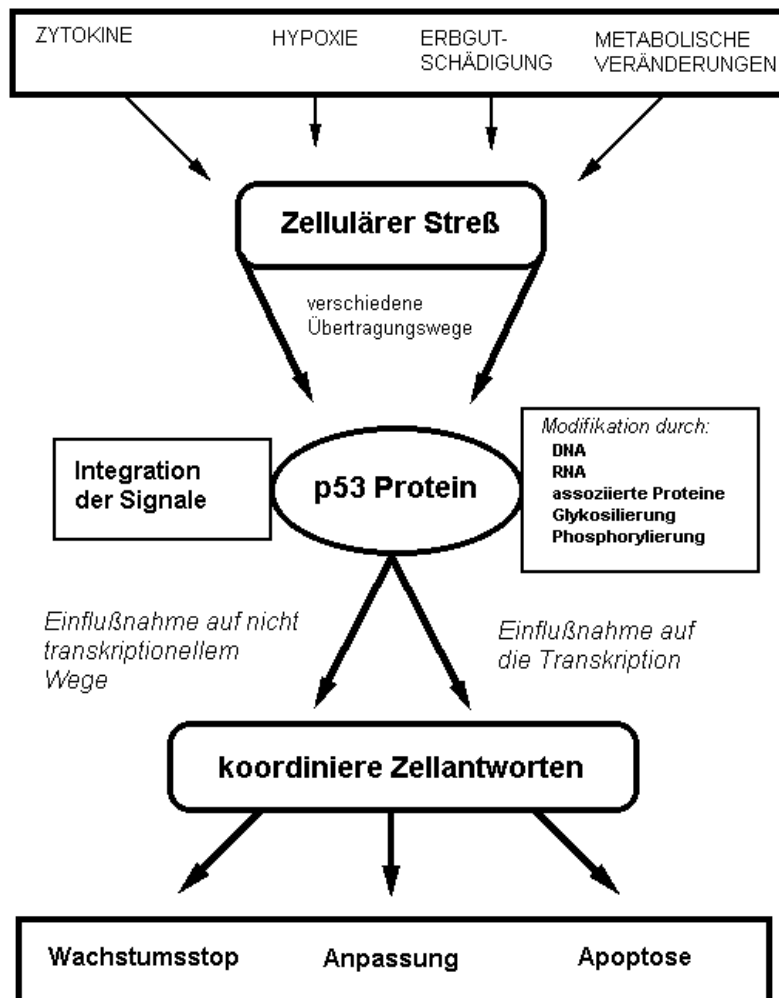


Abb. 3: Regelung von Zellabläufen durch p53

In der initialen Phase der Zellproliferation ist die Expression von p53 physiologisch [13, 56, 63, 77, 81], da hierbei seine Funktion bei der Anpassung an metabolische Veränderungen notwendig ist. Es hat sich jedoch gezeigt, daß dafür eine ganz bestimmte Konformation des Proteins vorliegen muß, die sich von der negativ regulatorischen, tumorsupprimierenden Funktion deutlich unterscheidet [58]. Oft liegt p53 in Tumoren in

einer irreversibel positiv regulierenden Form vor, so daß es zu einem Dauerwachstum kommt. Gemäß der 'Knudson'schen zwei Treffer-Hypothese' sind zwei Ereignisse notwendig, um einen Tumor entstehen zu lassen [31]. Zuerst liegt eine Mutation in dem Wildtypgen vor, die aber noch von dem gesunden zweiten Allel, kompensiert werden kann. Geht dann jedoch in der Folge dieses zweite Allel verloren, ist es dazu nicht mehr in der Lage - ein Tumor kann entstehen.

In Zellen, die das Protein exprimieren, konnte durch eine Temperaturveränderung Apoptose eingeleitet werden. Das Ausmaß der apoptosebedingten DNA-Zerstückelung war direkt proportional zu der Zeit, die das p53 Gen aktiv war.

Dieser Effekt ist unabhängig von neuer RNA- oder Proteinsynthese. Daraus wurde gefolgert, daß p53 nicht die Apoptose einleitenden Gene aktiviert, sondern, daß es entweder Gene, die für das Zellüberleben wichtig sind, ausschaltet oder aber selber ein Teil der enzymatischen Maschinerie ist, mit deren Hilfe die DNA zertrennt wird [9].

Bei den familiären Ovarialkarzinomsyndromen konnte keine Assoziation mit p53 Keimbahnmutationen gefunden werden, wie dies beim Li-Fraumeni-Syndrom im Bereich von 5' und 3' Splicing-Sites der Introns der Fall war [1, 21, 28, 49, 85, 89].

Es bestehen deutliche Hinweise dafür, daß Keimbahnpolymorphismen innerhalb der Introns des p53 Gens eine wichtige Rolle bei der Entstehung des Ovarialkarzinoms spielen [5, 6, 8, 24, 64, 68, 79, 80, 90].

Die derzeitige Meinung ist, daß Intronveränderungen des p53-Gens einen Einfluß auf die Expressionsstärke haben, indem sie Bindungsstellen für Modifikatoren der Genexpression, sogenannte Enhancer- oder Silencerproteine, verändern und mit anderen Proteinen interagieren [1, 3, 25, 45, 73].

Eine dieser Intronveränderungen ist der Polymorphismus im Intron 3 des humanen p53-Gens.

2.3. Polymorphismus im Intron 3 des p53-Gens

Eine sechzehn Basenpaare umfassende Insertion in dem Intron drei des p53 Gens wurde 1993 erstmals beschrieben [37]. Die 16bp Insertion beginnt genau an der Position 11951 der p53-Sequenz und entspricht in seiner Nukleotidabfolge den sich anschließenden sechzehn Basenpaaren.

Es folgen die beiden kodierenden Stränge, einmal der des Wildtyp-Gens, dem Allel 1 (A1) und einmal der mit der 16bp Insertion, dem Allel 2 (A2), die auch als **p53-Polymorphismus im Intron 3** bezeichnet und mit p53PIN3 abgekürzt wird:

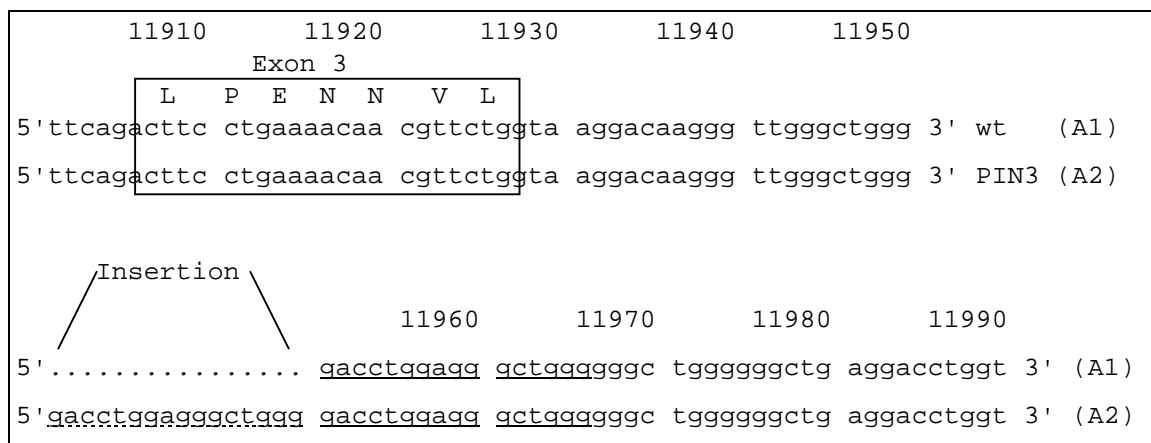


Abb. 4: Der Polymorphismus PIN3 im Kontext der p53-Sequenz

Man vermutet, daß es, da die wiederholte Sequenz von zwei kurzen, acht Basenpaare umfassenden 5' -gggctggg-3' Motiven eingeschlossen wird, bei der DNA-Synthese zu einem Fehler in der komplementären Paarung der Stränge kommt, und dadurch die vorhandene Verdopplung auftritt [12].

2.4. Die Fragestellung

Untersucht man ein Kollektiv von Personen, die an einer Krankheit leiden, bei deren Entstehung das p53-Gen eine wichtige Rolle spielt, so kann man möglicherweise bei Trägern unterschiedlicher Allelausprägungen eines Polymorphismus dieses Gens, über die Veränderung des Risikos, an dieser Krankheit zu erkranken, eine Aussage treffen.

Dazu wird in der hier durchgeführten Studie der Polymorphismus p53PIN3 mit seinen Allelen A1 und A2 herangezogen.

Es soll hier geklärt werden, ob im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe eine unterschiedliche Verteilung der p53PIN3 Allele bei Ovarialkarzinompatientinnen besteht.

Ein weiteres Ziel dieser Untersuchung ist es festzustellen, ob zwischen den unterschiedlichen Tumorstadien TNM und G bei Diagnosestellung und dem Vorliegen vom Allel 1 oder 2 eine Assoziation besteht.

Um dies zu klären sollen retrospektiv in einer Fallkontrollstudie die Allelausprägungen von Ovarialkarzinompatientinnen mit denen einer Kontrollgruppe von Blutspenderinnen verglichen werden.

3. *Material und Methoden*

3.1. *Material*

3.1.1. *Chemikalien und biochemische Reagenzien*

NUSieve® Agarose	FMC Bioproducts, Rockland, USA
Aqua bidest	Universität Ulm, Deutschland
Borsäure	Baker, Deventer, Holland
EDTA (Dinatrium-Dihydrat)	USB, Cleveland, USA
Essigsäure 100%	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Ethanol (absolut)	Baker, Deventer, Holland
Ethanol (vergällt)	Riedel-de-Haen, Seelze, Deutschland
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Mineralöl	Sigma, St. Louis, USA
Natriumacetat	Sigma, St. Louis, USA
PCR-Puffer	Perkin Elmer, Weiterstadt, Deutschland
Sucrose	C. Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Tris	ICN-Biomedicals, Aurora, USA
Tween 20	Merck, Darmstadt, Deutschland
Xylen-Cyanol FF	Merck, Darmstadt, Deutschland
Xylol	Riedel-de-Haen, Seelze, Deutschland

3.1.2. *Längenstandard*

pUC 18 DNA Hae III Digest (Fragmentgrößen (bp): 587, 458, 434, 298, 267, 257, 174, 102, 80, 18, 11)	Sigma, St. Louis, USA
---	-----------------------

3.1.3. Enzyme und Nukleotide

Proteinase K	Sigma, St. Louis, USA
Taq-Polymerase	Perkin-Elmer, Weiterstadt, Deutschland
dNTP	Perkin-Elmer, Weiterstadt, Deutschland

3.1.4. Primer für Polymerase Kettenreaktion

O-297: sense primer:	5' -CTGAAAACAACGTTCTGGTA-3'
O-298: antisense primer:	5' -AAGGGGGACTGTAGATGGGTG-3'

3.1.5. Verwendete Puffer

3.1.5.1. Digestionspuffer

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

3.1.5.2. Laufpuffer

0,25%	Bromphenol Blau
0,25%	Xylen-Cyanol FF
40%	Sucrose

3.1.5.3. Längenstandard

7µl	pUC Hae III-Verdau
28µl	Laufpuffer
105µl	H ₂ O

3.1.5.4. 10x PCR-Puffer

100mM Tris-HCl (pH 8,8)
25mM MgCl₂
500mM KCl

3.1.5.5. 5x TBE-Tankpuffer

5g Tris-Base
27,5g Borsäure
20ml 0,5M EDTA (pH 8,0)

3.2. Molekularbiologische Methoden

3.2.1. Herstellen von Paraffin-Dünnschnitten

Im Pathologischen Institut der Universität Ulm werden Gewebeproben in Form von Paraffinblöcken archiviert. Für die Lichtmikroskopie sind Schnitte von 3µm bis 20µm Stärke erforderlich. Um eine für die DNA-Präparation ausreichende Menge an Normalgewebe von Patientinnen mit Ovarialkarzinom zu gewinnen, sind diese Schnitte ebenfalls geeignet. Mit einem Leitz Schlittenmikrotom, wurden Schnitte einer Dicke von 10 µm erstellt. Um eine Kontamination mit Fremd-DNA zu minimieren, wurden die Schnitte mit einem zuvor autoklavierten Zahnstocher vom Messer in ein beschriftetes Pergamintütchen überführt.

3.2.2. Entparaffinierung

Ein bis zwei Paraffinschnitte wurden in ein Eppendorfröhrchen gegeben. Daraufhin wurden 1000µl Xylol, welches das Paraffin löst, hinzupipettiert und das verschlossene Röhrchen auf einem Rotor, der das Eppendorfröhrchen in der Vertikalen langsam rotieren läßt, für fünfzehn Minuten bei 37°C inkubiert. In einer Eppendorf Tischzentrifuge wurde das Gewebe fünf Minuten lang pelletiert und der Überstand anschließend verworfen. Diese bisherigen Schritte wurden zweimal wiederholt. Des weiteren wurde mit einer absteigenden Alkoholreihe der Alkoholanteil der Lösung verringert. Es wurden 500µl 100%igen vergällten Ethanol zugegeben, und der Röhrcheninhalt gemischt. Erneut wurde fünf Minuten lang zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Auch dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt. Im folgenden wurde dies mit 70%igem und daraufhin noch einmal mit 50%igem vergälltem Ethanol durchgeführt. Das bei dem letzten Schritt noch verbleibende paraffinfreie Pellet wird anschließend unter Vakuum in einer Zentrifuge schnell getrocknet.

3.2.3. Gewebeverdau mit Proteinase K

Kurz vor Beginn des Verdaus hat man zu dem schon zuvor angesetzten Digestionspuffer die erforderliche Menge Proteinase K pipettiert. Die Gewebepellets wurden nach Zugabe von 500µl Digestionspuffer und ausreichender Resuspension in einem 1,5ml Eppendorfröhrchen über Nacht auf einem vertikal rotierenden Rotor bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen waren die Gewebeschnitte vollständig verdaut. Es bestanden keine zusammenhängenden Gewebeverbände mehr. In einer Tischzentrifuge wurden die Gewebebruchstücke zehn Sekunden lang pelletiert. Der Inhalt der Zellkerne, die nukleäre DNA, befand sich im Überstand, der in ein neues beschriftetes Eppendorfröhrchen überführt wurde. Diese wurden dann zehn Minuten lang bei 95°C auf einem Heizblock inkubiert, um die Proteine und hierbei speziell die Proteinase K zu denaturieren und dadurch zu inaktivieren. Um einen höheren Reinheitsgrad der DNA zu erzielen, mußte man sie im Anschluß an diese Prozedur ausfällen.

3.2.4. NaAcetat-Ethanol-fällung von DNA

DNA in wäßriger Lösung konnte unter Zuhilfenahme von Natriumacetat und absolutem Ethanol gefällt werden.

In ein Eppendorfröhrchen, das die DNA in Lösung enthält, wurden ein Zehntel dieses Volumens an NaAcetat hinzupipettiert. Dazu wurde wiederum das zweieinhalbfache des dabei entstandenen Volumens von absolutem Ethanol hinzugegeben. Diese Lösung wurde anschließend bei -80°C über Nacht inkubiert. Nach mindestens 24h wurde das Röhrchen in einer Eppendorf Tischzentrifuge bei 13000 U/min eine halbe Stunde lang bei 4°C zentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen und das Pellet einmal gewaschen, indem man es in 70%igem Ethanol resuspendierte und der Zentrifugationsschritt noch einmal für zehn Minuten wiederholt wurde.

Das dann entstandene Pellet wurde bei Raumtemperatur luftgetrocknet und anschließend in 20µl H₂O aufgenommen. Damit die DNA genügend Zeit hatte, in diesem Volumen in Lösung zu gehen, wurde das Eppendorfröhrchen für eine halbe Stunde bei 4°C inkubiert.

3.2.5. Spektrometrische Messung der DNA-Konzentration

Die Quantifizierung der DNA wurde mit der Hilfe eines Beckman DU 640 Spektrometers durchgeführt. DNA absorbiert Licht von einer Wellenlänge von 260nm. Die Reinheit der DNA-Präparation wurde durch die Messung der Proteinabsorption bei 280nm kontrolliert. Die Proben wurden 1:100 in sterilem Wasser verdünnt und ihre Absorption in Quarzküvetten gemessen.

Die Berechnung der DNA Konzentration wurde folgendermaßen durchgeführt:

$$\frac{OD_{260} \times 50\mu\text{g} \times 100}{1000\mu\text{l}} = \text{DNA Konz. } [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$$

Die optische Dichte (OD) von 1 entsprach dabei 50µg DNA/1000µl H₂O, und 100 stellt den Verdünnungsfaktor dar.

Anschließend wurde das Verhältnis der Absorptionen bei 260/280nm berechnet, welches normalerweise zwischen den Werten 1,8 und 2,0 lag. Höhere Werte hätten darauf hin gedeutet, daß ein zu hoher Anteil an verunreinigendem Protein enthalten gewesen wäre.

3.2.6. Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) ist eine schnelle Methode zur in vitro Amplifikation spezifischer DNA Abschnitte.

Mit Hilfe zweier Primer, die außerhalb der Region des zu untersuchenden Polymorphismus liegen, wurde der Bereich vor und nach der Insertionsstelle amplifiziert.

Lag die Insertion der sechzehn Basenpaare auf dem als Template verwendeten DNA-Strang vor, wurde auch diese mit abgelesen und dementsprechend vermehrt.

Man erhielt ein PCR-Produkt von 119 Basenpaaren Länge ohne, beziehungsweise 135 Basenpaaren mit der Insertion. Diese konnte man anschließend auf einem Agarosegel darstellen und voneinander unterscheiden.

Von einer französischen Gruppe sind, wie bereits in der Einleitung beschrieben, die unterschiedlichen Ausprägungen dieses Genlocus als Allel A1, beziehungsweise mit der Insertion als A2 bezeichnet worden [37].

Das Protokoll für den PCR-Ansatz aller Proben sah folgendermaßen aus:

H ₂ O	13,72	μl
10x Puffer	2,0	μl
10x dNTP	2,0	μl
5'-Primer	0,6	μl
3'-Primer	0,6	μl
<u>Taq-Polymerase</u>	<u>0,08</u>	<u>μl</u>
Mix	19,0	μl
+ <u>DNA</u>	<u>1,0</u>	<u>μl</u>
= <u>Ansatz</u>	<u>20,0</u>	<u>μl</u>

Nachdem alle 0,5ml Eppendorf-PCR-Röhrchen gemäß der Archivnummer beschriftet worden waren, wurde in jedes dieser sterilen Röhrchen 1μl der isolierten DNA vorgelegt. Anschließend wurde der PCR-Mix auf Eis hinzupipettiert, um eine frühzeitige thermische Inaktivierung der Taq-Polymerase zu vermeiden. Der gesamte Ansatz wurde mit zwei bis drei Tropfen Mineralöl überschichtet. In einem Thermozykler der Firma MJ Research, USA, wurde die Template DNA zunächst zwei Minuten lang bei 94°C denaturiert.

Die weiteren Schritte der 30 mal wiederholten Zyklen waren:

30sec bei 94°C Denaturierung
30sec bei 60°C Reassoziaton
60sec bei 72°C Extension
30 Zyklen
5min bei 72°C finale Extension

Bis zur Agarosegeldarstellung wurden die Proben bei 4°C aufbewahrt.

3.2.7. Agarose-Gelelektrophorese

Die Trennung und Identifikation von DNA-Banden wurde mit Hilfe einer Agarosegel Elektrophorese durchgeführt. Die DNA konnte mit Ethidiumbromid, das in das Gel mit eingeschlossen wurde und dann in die DNA interkalierte, auf einem UV-Schirm sichtbar gemacht werden. Das interkalierte Ethidiumbromid fluoresziert rotorange (560nm), wenn es von Licht der Wellenlänge 260nm bis 360nm angeregt wird.

Die Konzentration der Agarose in dem Gel wurde gemäß des Gewichtes der erwarteten Bande von 119bp mit 3% (w/v) gewählt, um eine gute Auftrennung der Banden zu erreichen. Aus dem gleichen Grund wurde in diesen Experimenten auf eine besonders hochwertige Agarose zurückgegriffen.

Für 200ml Volumen eines 3%igen Gels wurden 6g NUSieve[®] Agarose in 200ml 1xTBE Puffer eingerührt und anschließend durch dreiminütiges Kochen in der Mikrowelle aufgelöst. War dies der Fall und die Agarose hatte sich wieder auf etwa 55°C abgekühlt, wurden 8µl Ethidiumbromid hinzupipettiert und das Gemisch in die Gelkammer gegossen, damit es dort auspolymerisieren konnte.

Die Proben wurden, bevor sie in die dafür vorgesehenen Taschen des Gels aufgetragen wurden, mit dem Laufpuffer im Verhältnis 15µl PCR-Ansatz / 3µl Laufpuffer vermischt. Gleichzeitig wurde in einer Bahn der Längenstandard aufgetragen, um anschließend die Größe der dargestellten Banden bestimmen zu können.

3.3. *Statistische Methoden*

3.3.1. χ^2 -Test

Um zu ermitteln, ob ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Allelverteilung zweier Gruppen besteht, wurde der χ^2 -Test im Vierfelder-Schema angewandt

$$\chi^2 = \sum \frac{(A - T)^2}{T}$$

3.3.2. *Fisher's exact test*

Fisher's exact test wurde im Vierfelder-Schema für jede Zelle der Matrix angewandt, deren Wert kleiner als 5 war.

$$p = \frac{(a+b)!(c+d)!(a+c)!(b+d)!}{a!b!c!d!}$$

3.3.3. *Hardy-Weinberg-Gleichgewicht*

Die Formel des Hardy-Weinberg-Gleichgewicht wurde angewandt, um die Allelfrequenzen zu bestimmen.

$$(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

Alle Berechnungen wurden mit Hilfe des Programmes SAS durchgeführt.

3.4. Charakteristika der Studie

3.4.1. Studienart

Es handelt sich um eine auf klinischen Daten basierende retrospektive Fallkontrollstudie.

Erhobene Parameter sind: die Ausprägung des Polymorphismus der Sechzehn-Basenpaarverdopplung im Intron 3, das Tumorstaging und das Grading.

3.4.2. Proben

Das Material der Studie, die DNA aus Normalgewebe, wurde aus histologischen Schnitten von Operationspräparaten gewonnen, die in der Universitätsfrauenklinik Ulm im Zeitraum von 1988-1995 bei Erstoperationen an 155 süddeutschen Ovarialkarzinompatientinnen entnommen wurden. Dadurch wurde gewährleistet, daß sich alle Patientinnen innerhalb der Zeitspanne von Diagnosestellung, Operation und weiterer ärztlicher Betreuung zum Zeitpunkt der Probenentnahme in einem vergleichbaren Stadium befanden.

3.4.3. Kontrolle

Als normale Kontrollgruppe dienten 305 süddeutsche Blutspenderinnen. Zelluläre Abfallprodukte wurden uns vom Deutschen Roten Kreuz in Ulm ohne personenbezogene Daten überlassen.

3.4.4. Ziel der Studie

Das Ziel der Studie war es festzustellen, ob eine bestimmte Ausprägung des Polymorphismus im Intron 3 mit einem erhöhten Risiko für Ovarialkarzinom einhergeht und ob es bestimmte Staging- und Gradingklassen gibt, die mit einem bestimmten Genotyp assoziiert sind.

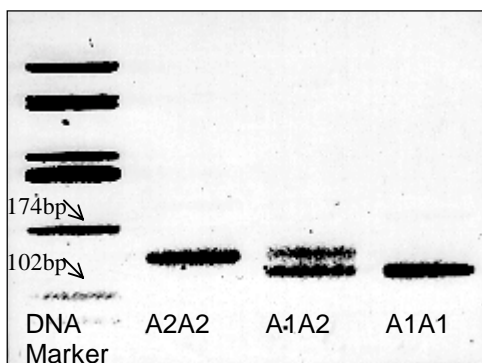
4. Ergebnisse

4.1. Darstellung des Polymorphismus im Intron 3 auf einem Agarosegel

Je nachdem, ob ein Individuum homozygot für das A1 oder das A2 Allel der Sechzehn-Basenpaarverdopplung oder an diesem Locus heterozygot ist, trifft man unterschiedlich große PCR-Produkte an.

Die Form des Polymorphismus ohne die Insertion der sechzehn Basenpaare umfaßt 119, die Form mit dem doppelt auftretenden Abschnitt, 135 Basenpaare von dem p53-Gen.

Wurden die PCR-Produkte gemeinsam mit dem Längenstandard auf ein Agarosegel aufgetragen, konnte man leicht bestimmen, welche der möglichen Allelkombinationen, A1A1, A1A2 oder A2A2, bei einem Individuum vorlagen.



Das längere DNA-Fragment läuft auf dem Agarosegel weniger weit, und ist deshalb oberhalb des schneller laufenden leichteren Fragmentes zu finden.

Abb. 5: Gel mit p53 PIN3

4.2. Verteilung des p53PIN3 bei Ovarialkarzinompatientinnen und gesunden Individuen

Nachdem von jeder der Patientinnen der Genotyp an dem relevanten Locus untersucht wurde, konnte man folgende Verteilung beobachten:

Tab. 1: Allelverteilung in der Gesamtgruppe der Ovarialkarzinome und der Kontrolle
[Fälle vs. Kontrollen: χ^2 -Test, Freiheitsgrad: 1; p-Wert: 0,016]

Gruppe	Anzahl der Genotypen			Allelfrequenz		n	χ^2 -HW
	A1A1	A1A2	A2A2	A1	A2		
Ov.-Ca	102 (66%)	50 (32%)	3 (2%)	0,82	0,18	155	1,25
Kontrolle	234 (77%)	68 (22%)	3 (2%)	0,88	0,12	305	0,64

Man kann erkennen, daß das A2 Allel der Sechzehn-Basenpaarverdopplung in der Gruppe der Ovarialkarzinome häufiger (AF: 0,18) vertreten war, als bei den gesunden Individuen (AF: 0,12). Die Heterozygoten waren um 10% häufiger in der Gruppe der Ovarialkarzinome vertreten.

Die Verteilung der Allele in der normalen Kontrolle entsprach mit χ^2 -HW = 0,64, der normalen Hardy-Weinberg-Verteilung.

Mit einem p-Wert von 0,016 davon signifikant verschieden war die Allelverteilung in der Ovarialkarzinomgruppe, die in sich selber ebenfalls eine Übereinstimmung mit dem Hardy-Weinberg-Gesetz zeigt χ^2 -HW = 1,25.

Das relative approximierte Risiko (odds ratio) für eine A2 Allelträgerin, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, betrug 1,6 (95%-Konfidenzintervall: 1,00 -2,50).

4.3. *p53PIN3 und die klinisch-pathologischen Parameter*

Von allen untersuchten Ovarialkarzinompatientinnen wurden, soweit es die histopathologischen Verhältnisse zuließen, von den Pathologen der Sektion für Gynäkologische Onkologie, die Tumorgroße, der Lymphknotenstatus, die Metastasen und der Differenzierungsgrad der Tumoren erhoben.

4.3.1. *p53PIN3 und die Größe des Tumors*

Tab. 2: Allelverteilung in Bezug auf die Tumorgroße T. [*p-Wert = Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen und der normalen Kontrollgruppe (χ^2 -Test, Freiheitsgrad: 1)]

T	Anzahl der Genotypen			Allelfrequenz		n	*p-Wert
	A1A1	A1A2	A2A2	A1	A2		
T1	22 (76%)	6 (21%)	1 (3%)	0,86	0,14	29	0,677
T2	13 (87%)	2 (13%)	0 (0%)	0,93	0,07	15	0,563
T3	59 (60%)	38 (38%)	2 (2%)	0,79	0,21	99	0,002
Tx	8 (67%)	4 (33%)	0 (0%)	0,82	0,18	12	-

In dieser Tabelle kann man die Verteilung der Genotypen auf die unterschiedlichen Tumorgroßen ablesen. Aufgrund der ausreichenden Untersuchungszahlen in den Gruppen T1, T2 und T3 mit jeweils 29, 15 und 99 Individuen, ließ sich eine statistisch zulässige Analyse durchführen. Bei 12 Patientinnen konnte keine Aussage über das Ausmaß des Tumors gemacht werden.

Die Allelfrequenzen der A1 und A2 Allele betragen in der Gruppe der Tumoren der

Größe T1 mit 0,86 und 0,14 annähernd soviel, wie in der Kontrollgruppe (AF: 0,88 bzw. 0,12).

In der Gruppe der T2-Tumoren war es so, daß das A1 Allel mit einer Frequenz von 0,93 und A2 mit 0,07 zu finden war. Häufiger, als in der Gesamtgruppe der Ovarialkarzinome (AF: 0,18) war das A2 Allel in der Gruppe T3 anzutreffen (AF: 0,21). Das A1 Allel fand sich mit einer Frequenz von 0,79. Das Ergebnis der Gruppe Tx (AF: 0,82 und 0,18) kann aufgrund der geringen Zahl der Individuen nicht berücksichtigt werden.

Bei einem mit 0,05 veranschlagten Signifikanzniveau zeigte sich in der Gruppe von T3 mit einem p-Wert von 0,002 ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe.

4.3.2. *p53PIN3 und der Lymphknotenbefall*

Tab. 3: Allelverteilung in Bezug auf den Lymphknotenbefall N

N	Anzahl der Genotypen			Allelfrequenz		n
	A1A1	A1A2	A2A2	A1	A2	
N0	20 (57%)	14 (40%)	1 (3%)	0,77	0,23	35
N1	21 (75%)	7 (25%)	0 (0%)	0,88	0,13	28
Nx	61 (66%)	29 (32%)	2 (2%)	0,82	0,18	92

Da bei über der Hälfte der untersuchten Patientinnen keine Angaben über ihren Lymphknotenstatus vorlagen, konnte man nur eingeschränkt eine Aussage treffen. Aus den verfügbaren Daten geht jedoch hervor, daß knapp die Hälfte der Patientinnen einen Befall der regionären Lymphknoten aufwies.

Die Allelfrequenz von A1 ist bei Patientinnen ohne Lymphknotenbefall mit 0,77 geringer, als in der Gesamtovarialkarzinomgruppe (AF: 0,82) und sogar noch kleiner, als in der Kontrollgruppe (AF: 0,88). Das A2 Allel war in dem Kollektiv ohne Lymphknotenmetastasen mit 0,23 deutlich häufiger vertreten, als in der Kontrollgruppe (AF: 0,12) und der Gesamtovarialkarzinomgruppe (AF: 0,18). Gemeinsam mit Lymphknotenmetastasen (AF: 0,13) kam es praktisch genauso selten vor, wie in der Kontrollgruppe.

4.3.3. *p53PIN3* und Fernmetastasierung des Tumors

Tab. 4: Allelverteilung in Bezug auf die Fernmetastasierung M

M	Anzahl der Genotypen			Allelfrequenz		n
	A1A1	A1A2	A2A2	A1	A2	
M0	34 (54%)	29 (46%)	0 (0%)	0,77	0,23	63
M1	6 (40%)	8 (53%)	1 (7%)	0,67	0,33	15
Mx	62 (80%)	13 (17%)	2 (3%)	0,89	0,11	77

Auch bei der Betrachtung des Metastasierungsverhaltens ließ sich nur eingeschränkt eine Aussage treffen, da nur bei der Hälfte der Patientinnen eine Zuordnung zu einer der Gruppen vorlag und dies oft nicht diejenigen waren, von denen man den Lymphknotenstatus kannte. Der größte Teil (n= 63) war in der Gruppe ohne und nur fünfzehn Individuen bei dem Kollektiv mit Fernmetastasen zu finden. Es ist die Allelfrequenz des A1 Allels mit 0,77 bei den Patientinnen ohne Metastasen geringer, als bei dem Gesamtkollektiv aller Ovarialkarzinompatientinnen (AF: 0,82) und geringer als in der Kontrollgruppe (AF: 0,88).

Ohne Fernmetastasen fand sich das A2 Allel mit einer Frequenz von 0,23. Im Vergleich zur Kontrolle (AF: 0,12) war es doppelt so häufig. Bei Individuen mit Fernmetastasen kam es noch häufiger vor (AF: 0,33).

4.3.4. p53PIN3 und das Grading des Tumors

Tab. 5: Allelverteilung in Bezug auf den Differenzierungsgrad G [*p-Wert= Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen und der normalen Kontrollgruppe (χ^2 -Test, Freiheitsgrad: 1)]

G	Anzahl der Genotypen			Allelfrequenz		n	χ^2 -HW	*p-Wert
	A1A1	A1A2	A2A2	A1	A2			
G1	14 (74%)	5 (26%)	0 (0%)	0,87	0,13	19	0,44	0,797
G2	29 (64%)	15 (33%)	1 (2%)	0,81	0,19	45	0,35	0,089
G3	45 (64%)	24 (34%)	1 (1%)	0,81	0,19	70	1,25	0,027
Gx	14 (67%)	6 (29%)	1 (5%)	0,81	0,19	21	0,11	0,221

In der Erhebung der Daten zum Grading der Tumoren konnte bei 21 Patientinnen keine Aussage über den Differenzierungsgrad des Tumors getroffen werden. Deshalb wurden hier, so wie schon bei der Tumorgröße T weitere statistische Untersuchungen durchgeführt. In der Gruppe der gut differenzierten Tumoren, G1, war die Frequenz von A1 (AF: 0,87) und A2 (AF: 0,13) annähernd so hoch, wie in der normalen Kontrollgruppe (AF: 0,88) bzw. (AF: 0,12).

Die Allelfrequenzen der Gruppen G2, G3 und Gx entsprachen einander und lagen für A1 bei 0,81 und für A2 bei 0,19. Sie unterschieden sich nicht von den Werten der Gesamtovarialkarzinomgruppe (AF: 0,82 bzw. 0,18). Ein signifikanter Unterschied zur normalen Kontrolle fand sich bei der Gruppe G3 (p-Wert = 0,027)

5. *Diskussion*

Das Ovarialkarzinom epithelialen Ursprungs ist die Krankheit unter den malignen gynäkologischen Tumoren, die mit der höchsten Sterblichkeitsrate einhergeht. Da sich zu einem frühen Zeitpunkt keinerlei Symptome einstellen, kommt es leider meist erst viel zu spät zur Diagnosestellung. Bei der serösen Form des Ovarialkarzinoms dauern die Symptome im Durchschnitt bereits zwölf Wochen an, bis ein Arzt konsultiert wird. Bei allen anderen Formen sind es etwa sieben Wochen. Daraufhin kommt es in 56% der Fälle innerhalb von vier Wochen zur Diagnosestellung [92]. Während der Erstoperation wird bei 75% der Patientinnen ein schon ausgedehntes Tumorgeschehen beobachtet. Trotz der Fortschritte sowohl bei den invasiven als auch bei den nichtinvasiven konservativen Heilmethoden liegt die Gesamtüberlebensrate nur bei 5-15% [65].

In dem Bereich der konservativen Therapie hat sich in den letzten Jahren trotz der Entdeckung neuer Chemotherapeutika, wie zum Beispiel des Taxols nur sehr wenig an der Überlebenszeit der Patienten verändert. Auch in der nächsten Zeit sind wahrscheinlich, da dieses Gebiet bereits seit langem intensiv beforscht wird, keine wesentlichen Veränderungen zu erwarten [2, 52]. Daher gibt es, um einem genetisch bedingten hohen Risiko zu entgehen, den Ansatz, nach Erfüllung des Kinderwunsches die Ovarien prophylaktisch zu entfernen [70].

Durch die Fortschritte in der Molekularbiologie, Immunologie und der Virologie sind neue Konzepte für eine mögliche Therapie aufgezeigt worden. Man versucht mittels genetischer Werkzeuge direkt am Tumor anzusetzen, um dadurch die Überlebenszeit der Patientinnen wesentlich verbessern können [2, 65].

Dennoch sollten die Bemühungen dahingehend gerichtet sein, die Tumoren so früh wie möglich zu erkennen, da dann die therapeutischen Möglichkeiten noch erheblich besser wären [16], denn trotz der erfolgversprechenden Ansätze der Gentherapie wird es noch eine Weile dauern, bis diese einer breiten Zahl von Patientinnen angeboten werden können [92].

Die bisherigen Versuche, rechtzeitig eine Erkrankung festzustellen, haben sich auf die Suche nach einzelnen Tumormarkern beschränkt. Man hat zum Beispiel gute Ergebnisse mit dem Marker CA125 erzielt [27]. Ein anderes Ergebnis wiederum deutet darauf hin, daß mittels transvaginalen Ultraschalls wesentlich mehr Karzinome entdeckt werden können, als nur mit CA125 [16]. Die Sensitivität beider Methoden ist vergleichsweise gering, so daß nach wie vor Bedarf an einer guten Früherkennungsmethode besteht.

Hierfür bieten sich in besonderem Maße genetische Polymorphismen an, da diese als genetische Marker schon von Geburt an vorhanden und noch vor dem Ausbruch eventueller Erkrankungen einer Untersuchung zugänglich wären [41].

Eines der wichtigsten regulatorischen Gene, die an Tumorentstehungen beteiligt sind, ist das Tumorsuppressorgen p53. Die abnormale Funktion des p53-Gens ist tatsächlich auch eine der häufigsten Veränderungen, die mit maligner Entartung beim Menschen einhergeht [22, 23, 61].

Da beim Ovarialkarzinom relativ oft sowohl somatische Veränderungen, als auch Keimbahnmutationen des p53-Gens zu finden sind und dieses Gen vermutlich eine wichtige Rolle in dessen Karzinogenese spielt, wurde in der hier durchgeführten Studie der sechzehn Basenpaare umfassende Polymorphismus im Intron 3 (p53PIN3), näher betrachtet. Er ist schon 1993 von einer französischen Gruppe beschrieben worden, die ihn beim Mammakarzinom untersucht hat. Es wurde berichtet, daß in einem Kollektiv von 17 Patientinnen sechs mit der Allelverteilung A1A2 und drei mit A2A2 zu finden waren. Bei drei Personen konnte der Verlust der Heterozygotie an diesem Locus nachgewiesen werden [37].

Bei den hier vorgelegten Untersuchungen hat sich ergeben, daß eine Keimbahnveränderung des p53-Gens im Intron 3 mit einer Erhöhung des Risikos, an einem schnell wachsenden und niedrig differenzierten Ovarialkarzinom zu erkranken einhergeht.

Bevor die Gruppe der Patientinnen mit der normalen Kontrolle verglichen werden konnte, mußte mit Hilfe des χ^2 -Tests untersucht werden, ob die Verteilung der Allele in beiden Gruppen mit der im Hardy-Weinberg-Gesetz formulierten normalen Verteilung übereinstimmt.

Dies ist in beiden Gruppen der Fall gewesen, was bedeutet, daß die beiden Allele unabhängig voneinander vererbt werden.

Bei dem Vergleich der Ovarialkarzinomgruppe von 155 Individuen mit einer Kontrollgruppe von 305 Blutspenderinnen hat sich gezeigt, daß das A2 Allel mit Allelfrequenzen von 0,18 bzw. 0,12 bei einem p-Wert von 0,016 und einem Signifikanzniveau von 0,05 signifikant häufiger in der Gruppe der Ovarialkarzinome zu finden ist. Das heißt, daß man von einer Assoziation vom Vorhandensein des p53PIN3 A2 Allels und dem Risiko, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, mit großer Wahrscheinlichkeit ausgehen kann.

Das A2 Allel geht bei süddeutschen Frauen, die ethnisch der weißen kaukasischen Volksguppe zugeordnet werden, mit einer 1,6fachen Erhöhung des Risikos (approximiertes relatives Risiko, odds ratio), an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, einher. Dies gilt bei einem 95% Konfidenzintervall von 1,00 bis 2,50.

Es gibt in der Literatur bereits zwei Angaben über ähnliche Untersuchungen im Ausland: Vergleicht man die Allelverteilung innerhalb der Kontrollgruppen miteinander, ergibt sich folgendes.

Tab. 6: Allelverteilung innerhalb der Kontrollgruppen

Studie\Genotyp	A1A1	A1A2	A2A2	A1	A2
Nordamerika	77 (77%)	21 (21%)	2 (2%)	0,87	0,13
England	82 (73%)	28 (25%)	3 (3%)	0,85	0,15
Süddeutschland	234 (77%)	68 (22%)	3 (1%)	0,88	0,12

In der von einer amerikanischen Forschergruppe veröffentlichten Arbeit über die p53PIN3 Verteilung beim Ovarialkarzinom hat sich praktisch die gleiche Allelverteilung bei der normalen Kontrolle gezeigt, wie sie bei dieser Untersuchung in Ulm gefunden wurde. Ähnliches trifft für die Veröffentlichung einer britischen Gruppe zu [10, 36]. Vor diesem Hintergrund kann man die Ergebnisse der drei Studien gut miteinander vergleichen.

Bei der Gegenüberstellung der Ergebnisse der untersuchten Ovarialkarzinompatientinnen finden sich folgende Anzahlen:

Tab. 7: Allelverteilung innerhalb der Ovarialkarzinomgruppen

Studie\Genotyp	A1A1	A1A2	A2A2	A1	A2
am.	68 (70%)	13 (28%)	1 (2%)	0,91	0,09
brit.	151 (83%)	61 (16%)	4 (1%)	0,84	0,16
Ulm	102 (66%)	50 (32%)	3 (2%)	0,82	0,18

Man sieht, daß sich die Prozentsätze der für A2A2 homozygoten Individuen in allen drei Gruppen mit einem, beziehungsweise zwei Prozent annähernd entsprechen. Deutlich voneinander unterscheiden sich die prozentualen Anteile der Patientinnen mit A1A2 und mit A1A1.

In der hier durchgeführten Studie ist mit 32% ein deutlich höherer Anteil an heterozygoten Individuen gefunden worden, als dies in Amerika und besonders in Großbritannien der Fall gewesen ist.

Dieser Unterschied ist eine Bestätigung der bereits zuvor schon einmal bei süddeutschen Ovarialkarzinompatientinnen beobachteten Erhöhung der Zahl der für A2 heterozygoten Individuen [68].

Nachdem in der hier vorgelegten Studie festgestellt werden konnte, daß das A2 Allel dasjenige ist, das für ein Ovarialkarzinom prädisponiert, wurde in weiteren Analysen versucht einzugrenzen, ob dies auch tatsächlich für alle unterschiedlichen Gruppen der pathologischen Einteilungen im Rahmen des Staging und Grading (TNM, bzw. G) gilt.

Es ist dies die erste derartige Beschreibung. Bisher wurden verschiedene Gradinggruppen nur beim Mammakarzinom mit den unterschiedlichen p53PIN3-Ausprägungen in Verbindung gebracht [80].

Zuerst wurde der Zusammenhang zwischen der TumorgroÙe und dem Vorliegen der beiden Allele untersucht.

Ob die Verteilung der Allele bei den verschiedenen TumorgroÙen der in der Kontrollgruppe entspricht, wurde mit Hilfe von Fisher's exact test bestimmt. Es ergab sich dabei, daÙ bei den Gruppen T1 und T2 mit p-Werten von 0,677 bzw. 0,563 keine signifikant andere Verteilung der Allele vorliegt, als in der normalen Kontrolle. Anders jedoch in der Gruppe der Tumoren der GröÙe T3 (n=99), wo die Allele bezogen auf die normale Kontrollgruppe, signifikant anders verteilt waren (p=0,002).

Durch den hohen Anteil der für A2 hetero- und homozygoten Individuen in dieser Gruppe kommt zum Ausdruck, daÙ bei einer Person das Vorliegen eines A2 Allels deutlich mit einem zum Zeitpunkt der Diagnose wesentlich gröÙeren Tumor einhergeht, als nur das A1 Allel.

Betrachtet man die Ovarialkarzinome unter dem Gesichtspunkt der Lymphknotenmetastasierung, so stellt sich, wegen der geringen Zahl der Daten zwar nicht weiter statistisch belegbar, doch aber als Trend heraus, daÙ das Vorliegen des A2 Allels nicht mit einer erhöhten Metastasierung in die regionären Lymphknoten einhergeht.

Das A2 Allel war in der Gruppe mit Lymphknotenbefall genauso selten anzutreffen, wie in der gesunden Kontrollgruppe (AF: 0,13, bzw. 0,12).

Es schien dieses Allel eher bei der Pathogenese von Ovarialkarzinomen, die nicht in die Lymphknoten metastasieren, eine Rolle zu spielen (AF: 0,23).

Auch beim Fernmetastasierungsverhalten der Karzinome ist aufgrund der geringen Zahlen nur eine Beschreibung eines Trends möglich, der einer weiteren statistischen Untersuchung bedarf. Bei den Karzinomen, die keine Fernmetastasen verursachen, läÙt sich die gleiche Allelfrequenz von 0,23 feststellen, wie schon bei den Tumoren, die nicht in die regionären Lymphknoten metastasieren (AF N0: 0,23).

Darüber hinaus zeigt sich, daß bei den wenigen Fällen der fernmetastasierenden Karzinome, die zur Auswertung standen, eine höhere Frequenz von A2 vorliegt, als bei der Gesamtovarialkarzinomgruppe (AF: 0,33 bzw. 0,18).

Die Betrachtung der Patientengruppen unter dem Gesichtspunkt der Verteilung des p53PIN3 auf die unterschiedlichen Gradingeinteilungen ergab, daß eine deutliche Assoziation ($p=0,027$) zwischen dem Vorliegen des A2 Allels und der Einteilung in die Gruppe der geringsten Differenzierung G3 besteht. Bei den weniger stark entdifferenzierten Tumorformen der Gruppen G1 und G2 konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zu dem Vorliegen des A2 Allels hergestellt werden.

Auch bei Studien an anderen Karzinomen ist bereits eine risikomodifizierende Wirkung der unterschiedlichen Allele des Polymorphismus p53PIN3 festgestellt worden. So ist eine Verbindung zwischen dem Auftreten des A2 Allels und dem Nasopharynxkarzinom gefunden worden [6]. Beim Colorektalen Karzinom und beim Lungenkarzinom hat sich im Rahmen einer Haplotypanalyse, die noch zwei weitere p53- Polymorphismen einschloß, eine Assoziation mit einem verringerten Risiko, an dieser Krankheit zu erkranken herausgestellt [5, 79].

Betrachtet man die Gesamtergebnisse dieser Studie, so muß man bedenken, daß sie mit vielen für eine retrospektive Studie typischen Problemen behaftet ist. Durch einen unverhältnismäßig hohen Anteil eher großer Tumoren (T3) in pathologischen Archiven, im Vergleich zu ihrem Vorkommen im klinischen Alltag, kommt es meist zu einer leichten Verzerrung der tatsächlichen Verhältnisse [54]. Darüber hinaus stand von einigen Ovarialkarzinompatientinnen kein Normalgewebe für eine Untersuchung zur Verfügung, wodurch die Verallgemeinerung der Ergebnisse auf alle Patientinnen oder womöglich auf die Gesamtbevölkerung, nur in bedingtem Maße möglich ist.

Die geringen Zahlen in den Subgruppen lassen manchmal keine oder nur eingeschränkt eine statistische Auswertung zu.

Es sollte sich deshalb an diese Arbeit eine prospektive Studie anschließen, in der man durch geeignet große Subgruppen, eine aus der Normalbevölkerung stammende Kontrollgruppe und ein entsprechendes Protokoll die hier gefundenen Zusammenhänge bestätigen könnte.

Weitere Experimente sind darüber hinaus erforderlich, um eine mögliche funktionelle Rolle des p53 PIN3 als Bindungsstelle für Enhancer- und Silencerproteine der Expressionsregulation aufzuklären [3, 25, 45, 73]. In einer vergleichbaren Studie an 630 Mammakarzinompatientinnen konnte gezeigt werden, daß ein Polymorphismus im Intron fünf des p53-Gens zu einer Auslassung des folgenden Exons bei der Transskription und durch einen Frameshift auf mRNA-Ebene zu einer unvollständigen p53-Proteinsynthese führte [88].

Es hat sich in der hier durchgeführten Studie gezeigt, daß das Allel A2 des p53PIN3 mit einer Erhöhung des Risikos, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, einhergeht. Es scheint mit einer schwereren Verlaufsform der Erkrankung assoziiert zu sein, was darin zum Ausdruck kommt, daß es signifikant häufiger bei Tumoren der Größe (T3) und den Tumoren niedrigen Differenzierungsgrades (G3) zu finden ist.

Der untersuchte Polymorphismus p53PIN3 könnte sich in Zukunft neben den heute bereits verwendeten Tumormarkern [34] und gemeinsam mit anderen Polymorphismen im Rahmen einer Haplotypanalyse, zu einem Risikomarker für das Ovarialkarzinom und einem weiteren Entscheidungskriterium für die verschiedenen Therapievarianten entwickeln.

6. Zusammenfassung

Jeder vierte gynäkologische Tumor ist ein Ovarialkarzinom. Das Ovarialkarzinom stellt die häufigste Todesursache bei Tumorerkrankungen des weiblichen Genitale dar. Frauen mit einem erhöhten Risiko für ein Ovarialkarzinom, werden von der Diagnostik bisher nur in unzureichender Weise vor dem Ausbruch der Erkrankung erfaßt.

In der hier vorgelegten Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen dem polymorphen Auftreten eines sechzehn Basenpaare umfassenden Sequenzabschnittes im Introns 3 des Tumorsuppressorgens p53 und dem Risiko an einem Ovarialkarzinom zu erkranken untersucht. Dadurch sollte ein möglicher molekularen Marker für die Risikoabschätzung auf seine Aussagekraft getestet werden.

Bei dem Vergleich der Häufigkeiten der beiden Allele des Polymorphismus p53PIN3, A1, dem Wildtypallel und A2, dem Allel mit der Insertion von sechzehn Basenpaaren, bei 305 gesunden Blutspenderinnen und 155 Ovarialkarzinompatientinnen fand man folgende Ergebnisse.

Das A2 Allel ist in der Gruppe der Ovarialkarzinompatientinnen signifikant häufiger vertreten, als in der Kontrollgruppe ($p = 0,016$). Es ist das A2 Allel mit einer Erhöhung des Risikos an dieser Krankheit zu erkranken assoziiert ($OR = 1,6$; $95\%KI = 1,0-2,5$).

Des weiteren hat sich gezeigt, daß das A2 Allel häufiger in den höheren Staging- und Gradingklassen zu finden ist. Hier im besonderen bei den großen T3 Tumoren ($p=0,002$), und solchen niedrigen Differenzierungsgrades [G3 ($p=0,027$)].

Es könnte sich demnach der Polymorphismus p53PIN3, nach einer weiteren Prüfung im Rahmen einer bevölkerungsbezogenen, prospektiv angelegten Studie, durchaus als ein sinnvoller Risikomarker für das Ovarialkarzinom erweisen.

7. *Literaturverzeichnis*

1. **Avigad S**, Barel D, Blau O, Malka A, Zoldan M, Mor C, Fogel M, Cohen I J, Stark B, Goshen Y, Stein J, Zaizov R:
A novel germ line p53 mutation in intron 6 in diverse childhood malignancies.
Oncogene 14: 1541-1545 (1997)
2. **Barnes M N**, Deshane J S, Rosenfeld M, Siegal G P, Curiel D T, Alvarez R D:
Gene therapy and ovarian cancer: a review.
Obstet. Gynecol. 89: 145-55 (1997)
3. **Beenken S W**, Karsenty G, Raycroft L, Lozano G:
An intron binding protein is required for transformation ability of p53.
Nucleic Acids Res. 19: 4747- 4752 (1991)
4. **Bienz-Tadmor B**, Zakut-Houri R, Libresco S, Givol D, Oren M:
The 5' region of the p53 gene: evolutionary conservation and evidence for a negative regulatory element.
Eur. Mol. Biol. Organ. J. 4: 3209-3215 (1985)
5. **Birgander R**, Sjalander A, Rannug A, Alexandrie A K, Sundberg M I, Seidegard J, Tornling G, Beckman G, Beckman L:
P53 polymorphisms and haplotypes in lung cancer.
Carcinogenesis 16: 2233- 2236 (1995)
6. **Birgander R**, Sjalander A, Zhou Z, Fan C, Beckman L, Beckman G:
P53 polymorphisms and haplotypes in nasopharyngeal cancer.
Hum. Hered. 46: 49-54 (1996)

7. **Breitenecker G**, in Blümke S:
Klassifikation der Ovarialkarzinome. In: Pathologie.
de Gruyter, Berlin, New York: 741-745 (1995)

8. **Buller R E**, Skilling J S, Kaliszewski S, Niemann T, Anderson B:
Absence of significant germ line p53 mutations in ovarian cancer patients.
Gynecol. Oncol. 58: 368-374 (1995)

9. **Caelles C**, Helmberg A, Karin M:
P53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target
genes.
Nature 370: 220-223 (1994)

10. **Campbell I G**, Eccles D M, Dunn B, Davis M, Leake V:
P53 Polymorphism in ovarian and breast cancer.
Lancet 347: 393-394 (1996)

11. **Cho Y**, Gorina S, Jeffrey P D, Pavletich N P:
Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding
tumorigenic mutations.
Science 265: 346-355 (1994)

12. **Cooper D N**, Krawczak M:
Mechanisms of insertional mutagenesis in human genes causing genetic disease..
Hum. Genet. 87: 409-415 (1991)

13. **Deppert W**, Buschhausen D G, Patschinsky T, Steinmeyer K:
Cell cycle control of p53 in normal (3T3) and chemically transformed (Meth A)
mouse cells. II. Requirement for cell cycle progression.
Oncogene 5: 1701-1706 (1990)

14. **Diebold J**, Baretton G, Felchner M, Meier W, Dopfer K, Schmidt M, Lohrs U:
Bcl-2 expression, p53 accumulation, and apoptosis in ovarian carcinomas.
Am. J. Clin. Pathol. 105: 341-349 (1996)

15. **Diller L**, Kassel J, Nelson C E, Gryka M A, Litwak G, Gebhardt M, Bressac B,
Ozturk M, Baker S J, Vogelstein B:
P53 functions as a cell cycle control protein in osteosarcomas.
Mol. Cell. Biol. 10: 5772-5781 (1990)

16. **Dorum A**, Kristensen G B, Abeler V M, Trope C G, Moller P:
Early detection of familial ovarian cancer.
Eur. J. Cancer. 32: 1645-1651 (1996)

17. **Eccles D M**, Cranston G, Steel C M, Nakamura Y, Leonard R C F:
Allele losses on chromosome 17 in human epithelial ovarian carcinoma.
Oncogene 5: 1599-1601 (1990)

18. **Eccles D M**, Brett L, Lessells A, Gruber L, Lane D, Steel C M, Leonard R C:
Overexpression of the p53 protein and allele loss at 17p13 in ovarian carcinoma.
Br. J. Cancer 65: 40-44 (1992)

19. **El-Deiry W S**, Tokino T, Velculescu V E, Levy D B, Parsons R, Trent J M, Lin D,
Mercer E, Kinzler K W, Vogelstein B:
WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression.
Cell 75: 817-825 (1993)

20. **Foulkes W**, Black D, Solomon E, Trowsdale J:
Allele loss on Chromosome 17q in sporadic ovarian cancer.
Lancet 338: 444-445 (1991)

21. **Frebourg T**, Barbier N, Yan Y X, Garber J E, Dreyfus M, Fraumeni J, Jr., Li F P, Friend S H:
Germ-line p53 mutations in 15 families with Li-Fraumeni syndrome.
Am. J. Hum Genet. 56: 608-615 (1995)

22. **Green M R**:
When the Products of oncogenes and anti-oncogenes meet.
Cell 56: 1-7 (1988)

23. **Greenblatt M S**, Bennet W P, Hollstein M, Harris C C:
Mutations in the p53 tumor suppressor gene: Clues to cancer ethiology and molecular pathogenesis.
Cancer Res. 54: 4855-4878 (1994)

24. **Hillebrandt S**, Streffer C, Demidchik E P, Biko J, Reiners C:
Polymorphisms in the p53 gene in thyroid tumours and blood samples of children from areas in Belarus.
Mutat. Res. 381: 201-207 (1997)

25. **Hinds P W**, Finlay CA, Quartin RS, Baker S J, Fearon ER, Vogelstein B, Levine AJ:
Mutant p53 DNA clones from human colon carcinomas cooperate with ras in transforming primary rat cells: a comparison of the "hot spot" mutant phenotypes.
Cell Growth Differ. 1: 571-580 (1990)

26. **Isobe M**, Emanuel B S, Givol D, Oren M, Croce C M:
Localisation of gene for human p53 tumor antigen to band 17p13.
Nature 320: 84-90 (1986)

27. **Jacobs I J**, Skates S, Davies A P, Woolas R P, Jeyerajah A, Weidemann P, Sibley K, Oram D H:
Risk of diagnosis of ovarian cancer after raised serum CA 125 concentration: a prospective cohort study.
Br. Med. J. 30: 1355-1358 (1996)
28. **Jolly K W**, Malkin D, Douglass E C, Brown T F, Sinclair A E, Look A T:
Splice-site mutation of the p53 gene in a family with hereditary breast-ovarian cancer.
Oncogene 9: 97-102 (1994)
29. **Kaiser R**, Pflleiderer A:
Ovarialtumoren.
In: Lehrbuch der Gynäkologie. 16. Aufl.
Thieme, Stuttgart, New York: 388 u. 406 (1989)
30. **Kastan M B**, Zhan Q, Deiry W, Carrier F, Jacks T, Walsh W V, Plunkett B S, Vogelstein B, Fornace A J J:
A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia.
Cell 71: 587-597 (1992)
31. **Knudson A G**:
Hereditary cancer: two hits revisited.
J. Cancer Res. Clin. Oncol. 122: 135-140 (1996)
32. **Kochbin S**, Lawrence J J:
An antisense RNA involved in p53 mRNA maturation in murine erythroleukemia cells induced to differentiate.
Eur. Mol. Biol. Organ. J. 8: 4107-4114 (1989)

33. **Kochbin S**, Principaud E, Chabanas A, Lawrence J J:
Early events in murine erythroleukemia cells induced to differentiate. Accumulation and gene expression of the transformation associated protein p53.
J. Mol. Biol. 200: 55-64 (1988)
34. **Kreienberg R**, Melchert F:
New developments in the area of markers in diagnosis and monitoring of ovarian cancer.
Onkologie 8: 253-259 (1985)
35. **Lamb P**, Crawford L:
Characterization of the human p53 gene.
Mol. Cell Biol. 6: 1379-1385 (1986)
36. **Lancaster J M**, Brownlee H A, Wiseman R W, Taylor J:
P53 polymorphism in ovarian and bladder cancer.
Lancet 346: 182 (1995)
37. **Lazar V**, Hazard F, Bertin F, Janin N, Bellet D, Bressac B:
Simple sequence repeat polymorphism within the p53 gene.
Oncogene 8: 1703-1705 (1993)
38. **Lee J M**, Bernstein A:
P53 mutations increase resistance to ionizing radiation.
Proc. Nat. Acad. Sci. 90: 5742-5746 (1993)
39. **Levesque M A**, Katsaros D, Yu H, Zola P, Sismondi P, Giardina G, Diamandis E:
Mutant p53 protein overexpression is associated with poor outcome in patients with well or moderately differentiated ovarian carcinoma.
Cancer 75: 1327-38 (1995)

40. **Levine A J, Momand J, Finlay C A:**
The p53 tumour suppressor gene.
Nature 351: 453-456 (1991)
41. **Levine A J, Perry M E, Chang A, Silver A, Dittmer D, Wu M, Welsh D:**
The 1993 Walter Hubert Lecture: The role of p53 tumor suppressor gene in tumorigenesis.
Br. J. Cancer 69: 409-416 (1994)
42. **Lewis A C W, Davison B C C:**
Familial ovarian cancer.
Lancet II: 235-237 (1969)
43. **Liber A F:**
Ovarian cancer in mother and five daughters.
Arch. Path. 49: 280-290 (1950)
44. **Livingstone L R, White A, Sprouse J, Livanos E, Jacks T, Tlsty T D:**
Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53.
Cell 70: 923-935 (1992)
45. **Lozano G, Levine A J:**
Tissue-specific expression of p53 in transgenic mice is regulated by intron sequences.
Mol. Carcinog. 4: 3-9 (1991)
46. **Lynch H T, Bewtra C, Lynch J F:**
Familial peritoneal ovarian carcinomatosis: a new clinical entity?
Med. Hypotheses 21: 171-177 (1986)

47. **Lynch H T**, Smyrk T C, Watson P, Lanspa S J, Lynch J F, Lynch P M, Cavalieri R J, Boland C R:
Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review.
Gastroenterology 104: 1535- 1541 (1993)
48. **Lynch H T**, Albano W, Black L, Lynch J F, Recabaren J, Pierson R:
Familial excess of cancer of the ovary and other anatomic sites.
J. Am. Med . Ass. 245: 261-264 (1981)
49. **Malkin D**:
P53 and the Li-Fraumeni syndrome.
Cancer Genet. Cytogenet. 66: 83-92 (1993)
50. **Martinez J**, Georgoff I, Levine A J:
Cellular localization and cell cycle regulation by a temperature sensitive p53 protein.
Genes. Dev. 5: 151-159 (1991)
51. **Matlashewski G**, Lamb P, Pim D, Peacock J, Crawford L, Benchimol S:
Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone: expression of the human p53 gene.
Eur. Mol. Biol. Organ. J. 3: 3257-3263 (1984)
52. **Mayerhofer K**, Kucera E, Zeisler H, Speiser P, Reinthaller A, Sevelde P:
Taxol as second-line treatment in patients with advanced ovarian cancer after platinum-based first-line chemotherapy.
Gynecol. Oncol. Jan 64: 109-113 (1997)

53. **McBride O W**, Merry D, Givol D:

The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm (17p13).

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 130-136 (1986)

54. **McGuire W L**:

Breast cancer prognostic factors: evaluation guidelines.

J. Natl. Cancer Inst 83: 154-155 (1991)

55. **Menczer J**, Ben-Baruch G:

Familial ovarian cancer in Israeli Jewish women.

Obstet. Gynec. 77: 276-277 (1991)

56. **Mercer W E**, Nelson D, Deleo A B, Old L J, Baserga R:

Microinjection of monoclonal antibody to protein p53 inhibits serum-induced DNA synthesis in 3T3 cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 6309-6315 (1982)

57. **Miller C**, Monhandas T, Wolf D, Prokocimer M, Rotter V, Koeffler H P:

Human p53 gene is located to short arm of chromosome 17.

Nature 319: 783-789 (1986)

58. **Milner J**, Watson J V:

Addition of fresh medium induces cell cycle and conformational changes in p53, a tumor suppressor protein.

Oncogene 5: 1683-1690 (1990)

59. **Narod S A**, Ford D, Devilee P, Barkardottir R B, Lynch H T, Smith S A, Ponder B A, Weber B L, Garber J E, Birch J M:
An evaluation of genetic heterogeneity in 145 breast-ovarian cancer families.
Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet* 56: 254-264 (1995)
60. **Nevo S**:
Familial ovarian carcinoma: a problem in genetic counselling.
Clin. Genet. 14: 219-222 (1978)
61. **Nigro J M**, Baker S J, Preisinger A C, Jessup J M, Hostetter R, Cleary K, Bigner S H, Davidson N, Baylin S, Devilee P, Glover T, Collins F S, Weston A, Modali R, Harris C C, Vogelstein B:
Mutations of the p53 occur in diverse human tumor types.
Nature 342: 705-708 (1989)
62. **Okamoto A**, Sameshima Y, Yokoyama S, Terashima Y, Sugimura T, Terada M, Yokota J:
Frequent allelic losses and mutations of the p53 gene in human ovarian cancer.
Cancer Res. 51: 5171-5176 (1991)
63. **Pardee A B**:
G1 events and regulation of cell proliferation.
Science 246: 603-606 (1989)
64. **Peller S**, Kopilova Y, Slutzki S, Halevy A, Kvitko K, Rotter V:
A novel polymorphism in intron 6 of the human p53 gene: a possible association with cancer predisposition and susceptibility.
DNA Cell Biol 14: 983-990 (1995)

65. **Rabinerson D**, Kaplan B, Levavi H, Neri A:
The biology of ovarian cancer of epithelial origin.
Isr. J. Med. Sci. 32: 1128-1133 (1996)
66. **Reisman D**, Greenberg M, Rotter V:
Human p53 oncogene contains one promoter upstream of exon 1 and a second,
stronger promoter within intron 1.
Proc. Nat. Acad. Sci. 85: 5146-5150 (1988)
67. **Riede U-N**, Schaefer H-E:
Tumoren des weiblichen Genitale.
In: Allg. u. spez. Pathologie. 4. Aufl.
Thieme, Stuttgart, New York: 850-851 (1995)
68. **Runnebaum I B**, Tong X W, König R, Hong Z, Körner K, Atkinson E N,
Kreienberg R, Kieback D G:
P53 -based blood test for p53PIN3 and risk for sporadic ovarian cancer.
Lancet 345: 994 (1995)
69. **Saito S**, Saito H, Koi S, Sagae S, Kudo R, Saito J, Noda K, Nakamura Y:
Fine-scale deletion mapping of the distal long arm of chromosome 6 in 70 human
ovarian cancers.
Cancer Res. 52: 5815-5817 (1992)
70. **Salazar H**, Godwin A K, Daly M B, Laub P B, Hogan W M, Rosenblum N, Boente
M P, Lynch H T, Hamilton T C:
Microscopic benign and invasive malignant neoplasms and a cancer-prone
phenotype in prophylactic oophorectomies. Comment in:
J. Natl. Cancer Inst. 18, 88:1790-1791 (1996)

71. **Sato T**, Saito H, Morita R, Koi S, Lee J H, Nakamura Y:
Allelotype of human ovarian cancer.
Cancer Res. 51: 5118-5122 (1991)
72. **Schildkraut J M**, Thompson W D:
Familial ovarian cancer: a population-based case-control study.
Am. J. Epidemiol. 128: 456-466 (1988)
73. **Shamsher M**, Montano X:
Analysis of intron 4 of the p53 gene in human cutaneous melanoma.
Gene 176: 259-262 (1996)
74. **Shaulsky G**, Goldfinger N, Ben Z A, Rotter V:
Nuclear accumulation of p53 protein is mediated by several nuclear localization signals and plays a role in tumorigenesis.
Mol. Cell. Biol. 10: 6565-6577 (1990)
75. **Shaulsky G**, Goldfinger N, Peled A, Rotter V:
Involvement of wild type p53 protein in the cell cycle requires nuclear localization.
Cell. Growth Differ. 2: 661-667 (1991)
76. **Sherley J L**:
Guanine nucleotide biosynthesis is required by the cellular p53 concentration.
J. Biol. Chem. 266: 24815-24828 (1991)
77. **Shoat O**, Greenberg M, Reisman D, Oren M, Rotter V:
Inhibition of cell growth mediated by plasmids encoding p53 anti-sense.
Oncogene 1: 277-283 (1987)

78. **Silverberg E**, Inbera J:
Cancer statistics.
Cancer 37: 2-19 (1987)
79. **Sjalander A**, Birgander R, Athlin L, Stenling R, Rutegard J, Beckman L, Beckman G:
P53 germ line haplotypes associated with increased risk for colorectal cancer.
Carcinogenesis 16: 1461-1464 (1995)
80. **Sjalander A**, Birgander R, Hallmans G, Cajander S, Lenner P, Athlin L, Beckman G, Beckman L:
P53 polymorphisms and haplotypes in breast cancer.
Carcinogenesis 17: 1313-1316 (1996)
81. **Steinmeyer K**, Maake H, Deppert W:
Cell cycle control by normal (3T3) and chemically transformed (Meth A) mouse cells. I. Regulation of p53 expression.
Oncogene 5: 1691-1699 (1990)
82. **Sturzbecher H W**, Maimets T, Chumakov P, Brain R, Addison C, Simanis V, Rudge K, Philp R, Grimaldi M, Court W:
P53 interacts with p34cdc2 in mammalian cells: implications for cell cycle control and oncogenesis.
Oncogene 5: 795-810 (1990)
83. **Takahashi T**, D'Amico D, Chiba I, Buchhagen D L, Minna J D:
Identification of intronic point mutations as an alternative mechanism for p53 inactivation in lung cancer.
J. Clin. Invest. 86: 363-369 (1990)

84. **Tobacman J K**, Greene M H, Tucker M A, Costa J, Kase R, Fraumeni J F Jr.:
Intra-abdominal carcinomatosis after prophylactic oophorectomy in ovarian-cancer-prone families.
Lancet II: 795-797 (1982)
85. **Varley J M**, McGown G, Thorncroft M, Santibanez Koref M F, Kelsey A M, Tricker K J, Evans D G, Birch J M:
Germ-line mutations of TP53 in Li-Fraumeni families: an extended study of 39 families.
Cancer Res. 57: 3245-3252 (1997)
86. **Vogelstein B**, Kinzler K W:
X-rays strike p53 again.
Nature 370: 174-175 (1994)
87. **Vogelstein B**, Kinzler K W:
P53 function and dysfunction.
Cell 70: 523-526 (1992)
88. **Voglino G**, Castello S, Silengo L, Stefanuto G, Friard O, Ferrara G, Fessia L:
An intronic deletion in TP53 gene causes exon 6 skipping in breast cancer.
Eur. J. Cancer 33: 1479-1483 (1997)
89. **Warneford S G**, Witton L J, Townsend M L, Rowe P B, Reddel R R, Dalla Pozza L, Symonds G:
Germ-line splicing mutation of the p53 gene in a cancer-prone family.
Cell Growth Differ. 3: 839-846 (1992)

90. **Weston A**, Pan C F, Ksieski H B, Wallenstein S, Berkowitz G S, Tartter P I, Bleiweiss I J, Brower S T, Senie R T, Wolff M S:
P53 haplotype determination in breast cancer.
Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev 6: 105-112 (1997)
91. **Whang-Peng J**, Knutsen T, Douglass E C, Chu E, Ozols R F, Young R:
Cytogenetic studies in ovarian cancer.
Cancer Genet. Cytogenet. 11: 91-106 (1984)
92. **Wikborn C**, Pettersson F, Moberg P J:
Delay in diagnosis of epithelial ovarian cancer.
Int. J. Gynaecol. Obstet 52: 263-267 (1996)
93. **Wilcock D**, Lane D P:
Localization of p53, retinoblastoma and host replication proteins at sites of viral replication in herpes-infected cells.
Nature 349: 429-431 (1991)
94. **Yin Y**, Tainsky M A, Bischoff F Z, Strong L C, Wahl G M:
Wild-type p53 restores cell cycle control and inhibits gene amplification in cells with mutant p53 alleles.
Cell 70: 937-948 (1992)

8. *Danksagungen*

Für die Überlassung des Dissertationsthemas danke ich Herrn PD Dr. med. I. Runnebaum, Leiter der Arbeitsgruppe Molekularbiologie und dem Leiter der Abteilung Herrn Prof. Dr. med. R. Kreienberg.

Herrn Prof. Dr. W. Böhm und seinen Mitarbeitern von der Sektion Gynäkologische Onkologie danke ich für die hilfreiche Unterstützung bei der Erstellung der histologischen Schnitte.

Frau Dr. Shan Wang-Gohrke und ihrem Mann Jens danke ich besonders herzlich für die gute Betreuung und ihre Freundschaft.

Tanja Köhler und Sabine Hees danke ich für ihre große Hilfe bei allen Arbeiten im Labor.

Mein Dank gilt auch meinen Eltern und meiner Großmutter, die mich immer unterstützt und neu motiviert haben.

Ebenso möchte ich mich bei Ulla Folger bedanken, die mir während der ganzen Zeit zur Seite gestanden hat.

9. *Lebenslauf*

Name: Herzog, Raimund Ingo
 Geburtsdatum: 22.10.1972
 Geburtsort: Bonn-Bad Godesberg

Anschrift: 406, Prospect St
 New Haven, CT 06511, US

Telefon: ++1-203-777-6507
 Email: raimund.herzog@yale.edu

Eltern: Ingo Herzog, Ingenieur; Brigitte Herzog, geb. Gesche, Hausfrau

Schulbesuch:	1978 - 1982	Grundschule
	1982 - 1983	Emil-Fischer-Gymnasium in Euskirchen
	1983 - 1991	Justinus- Kerner-Gymnasium in Heilbronn
	1991, Jun.	Abitur

Medizinischer Werdegang:	1991, Sept.	Freiwilliges soziales Jahr an der chirurgischen Universitätsklinik in Heidelberg
	- 1991, Dez.	
	1991, Dez.	Beginn des Medizinstudiums an der Universität Ulm
	1994, Mär.	Laborpraktikum "Experimentelle Pharmakologie" in der Abteilung Pharmakologie und Toxikologie der Universität Ulm
	1994, Jul.	Forschungsaufenthalt in der Abteilung Pharmakologie und Toxikologie der Universität Ulm Betätigung auf dem Gebiet der Signaltransduktion Bereich: G-Proteine, PLC β_2
	- 1995, Mär.	
	1995, Mär.	Klinikpraktikum in der Innere Medizin (Gastroenterologie) an dem akademischen Lehrkrankenhaus der Universität Heidelberg in Heilbronn
	1995, Aug. -1995, Okt.	Zwei Monate Praktikum in der Abteilung für Abdominalchirurgie der Tongji Medical University in Wuhan, Provinz Hubei, im Rahmen eines dreimonatigen Studienaufenthaltes in China
1996, Feb.	Beginn einer Dissertation in der Frauenklinik der Universität Ulm; Bereich: p53, Ovarial-Ca	

1997, Okt. - 1998, Feb.	Erstes Tertial des praktischen Jahres als Unterassistent in der Klinik für Allgemein- und Visceralchirurgie am Inselspital der Universität Bern
1998, Feb. - 1998, Mär.	Zweites Tertial in der internistischen Notaufnahme des Universitätsklinikums Ulm
1998, Apr. - 1998, Mai	Jeweils eine elective period in der Abteilung für Kardiologie und für Hämatologie des Yale New Haven Hospitals, der Yale University, USA
1998, Jun. - 1998, Sept.	Drittes Tertial in der Neurologischen Abteilung der Universität Ulm

Prüfungen:	1993, Aug.	Physikum (Ärztliche Vorprüfung)
	1994, Aug.	Erstes Staatsexamen (Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung)
	1997, Okt.	Zweites Staatsexamen (Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung)
	1998, Nov.	Drittes Staatsexamen (Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung)

Sprachen: Deutsch; Englisch; Französisch; Italienisch; Chinesisch (Grundlagen)

Raimund Herzog,

Ulm, im November 1998