

Aus dem Bereich Theoretische Medizin  
der medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Zur Bedeutung des SNP309 des Mdm2-Gens  
für die CVID und die rheumatoide Arthritis**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin*

**Der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2008

vorgelegt von: Monika Barbara Müller  
geb. am: 17.11.1977 in Augsburg

Tag des Kolloquiums: .....

Dekan: .....

Berichtersteller: .....

Die Experimente zu der vorliegenden Arbeit wurden am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Abteilung Virologie, am Lehrstuhl/Institut Innere Medizin I im José-Carreras-Zentrum der Universität des Saarlandes in Homburg/Saar durchgeführt.

Teile dieser Arbeit wurden bzw. werden veröffentlicht in:

Mdm2 gene SNP309 T/G and p53 SNP 72 G/C do not influence diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma onset or survival in central European Caucasians.

Bittenbring J, Parisot F, Wabo A, Mueller M, Kerschenmeyer L, Kreuz M; Truemper L, Landt O, Menzel A, Pfreunds Schuh M, Roemer K  
BMC Cancer (April 2008)

Association of Rheumatoid Arthritis with MDM2 SNP309 and genetic evidence for an allele-specific interaction between MDM2 and p53 P72R variants.

Assmann G, Vosswinkel J, Mueller M, Bittenbring J, Koenig J, Parisot F, Menzel A, Pfreunds Schuh M, Roemer K, Melchers I

Erstgutachter: Prof. Dr. Klaus Römer

Zweitgutachter: .....

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>11</b>
<hr/>		
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>14</b>
<hr/>		
<b>2.1</b>	<b>APOPTOSE UND TUMORENTSTEHUNG</b>	<b>14</b>
<b>2.2</b>	<b>DER P53- TUMORSUPPRESSOR</b>	<b>14</b>
2.2.1	FUNKTIONELLE DOMÄNEN UND STRUKTUR	15
2.2.2	KONTROLLE ZELLULÄRER FUNKTIONEN	16
<b>2.3</b>	<b>DIE MDM2- UBIQUITINLIGASE</b>	<b>17</b>
<b>2.4</b>	<b>DER REGULATORISCHE P53- MDM2-PFAD</b>	<b>18</b>
<b>2.5</b>	<b>DER MDM2-GEN-POLYMORPHISMUS SNP309</b>	<b>20</b>
<b>2.6</b>	<b>DER BOTENSTOFF TNFA</b>	<b>22</b>
2.6.1	BIOCHEMISCHER AUFBAU	23
2.6.2	DER TNFA- NFkB-PFAD	23
<b>2.7</b>	<b>DIE REGULATION VON ENTZÜNDUNGSREAKTIONEN DURCH P53 UND NFkB</b>	<b>25</b>
<b>2.8</b>	<b>RHEUMATOIDE ARTHRITIS</b>	<b>27</b>
<b>2.9</b>	<b>COMMON VARIABLE IMMUNODEFICIENCY (CVID)</b>	<b>31</b>
<b>2.10</b>	<b>ZIELSETZUNG DER ARBEIT</b>	<b>34</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>37</b>
<hr/>		
<b>3.1</b>	<b>CHEMIKALIEN</b>	<b>37</b>
<b>3.2</b>	<b>PUFFER</b>	<b>37</b>
<b>3.3</b>	<b>ENZYME</b>	<b>37</b>
<b>3.4</b>	<b>DNA-GRÖßEN- UND MOLEKULARGEWICHTSMARKER</b>	<b>38</b>
<b>3.5</b>	<b>ZELLINIEN</b>	<b>39</b>
3.5.1	T-47D-ZELLEN	39
3.5.2	SAOS-2-ZELLEN	39
<b>3.6</b>	<b>MEDIEN UND LÖSUNGEN FÜR DIE ZELLKULTUR</b>	<b>39</b>
<b>3.7</b>	<b>EDTA- BLUTPROBEN</b>	<b>40</b>
<b>3.8</b>	<b>DNA-PROBEN</b>	<b>40</b>
<b>3.9</b>	<b>LÖSUNGEN ZUR DNA- ISOLIERUNG AUS EDTA-BLUT UND ZELLEN</b>	<b>41</b>
<b>3.10</b>	<b>LÖSUNGEN FÜR DIE SDS- POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)</b>	<b>41</b>
<b>3.11</b>	<b>SYNTHETISCHE OLIGONUKLEOTIDE („PRIMER“)</b>	<b>42</b>
<b>3.12</b>	<b>ELUTIONSPUFFER FÜR DNA AUS ACRYLAMIDGELEN</b>	<b>42</b>
<b>3.13</b>	<b>BAKTERIENSTÄMME</b>	<b>42</b>
<b>3.14</b>	<b>NÄHRMEDIEN ZUR KULTIVIERUNG VON DH5A-T1</b>	<b>43</b>
<b>3.15</b>	<b>VEKTOREN</b>	<b>43</b>
3.15.1	DER PCR 2.1-TOPO-VEKTOR	43
<b>3.16</b>	<b>LÖSUNGEN ZUR PRÄPARATIVEN PLASMID- DNA- ISOLIERUNG</b>	<b>44</b>
<b>3.17</b>	<b>MATERIALIEN FÜR DIE ZELLKULTUR</b>	<b>45</b>
<b>3.18</b>	<b>SONSTIGE MATERIALIEN</b>	<b>45</b>
<b>3.19</b>	<b>COMPUTERSOFTWARE</b>	<b>46</b>

<b>4</b>	<b><u>METHODEN</u></b>	<b>47</b>
<b>4.1</b>	<b>ZELLKULTURTECHNIKEN</b>	<b>47</b>
4.1.1	KULTIVIERUNG VON T-47-D-ZELLEN	47
4.1.2	KULTIVIERUNG VON SAOS-2-ZELLEN	47
<b>4.2</b>	<b>DNA-EXTRAKTION AUS EDTA-BLUT UND EUKARYOTISCHEN ZELLEN</b>	<b>48</b>
<b>4.3</b>	<b>DIE POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)</b>	<b>49</b>
<b>4.4</b>	<b>ELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG VON DNA</b>	<b>52</b>
<b>4.5</b>	<b>AGAROSEGELELEKTROPHORESE DOPPELSTRÄNGIGER DNA</b>	<b>52</b>
4.5.1	HERSTELLUNG VON AGAROSEGELEN	52
4.5.2	AGAROSEGELELEKTROPHORESE	53
<b>4.6</b>	<b>SPALTUNG VON DNA DURCH RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN</b>	<b>53</b>
<b>4.7</b>	<b>SDS-POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)</b>	<b>54</b>
<b>4.8</b>	<b>ISOLIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN AUS SDS-GELEN</b>	<b>55</b>
<b>4.9</b>	<b>LIGATION VON DNA-FRAGMENTEN</b>	<b>55</b>
<b>4.10</b>	<b>TRANSFORMATION KOMPETENTER BAKTERIEN</b>	<b>56</b>
<b>4.11</b>	<b>KULTIVIERUNG VON BAKTERIEN</b>	<b>57</b>
<b>4.12</b>	<b>ISOLIERUNG VON PLASMID-DNA AUS BAKTERIEN</b>	<b>57</b>
4.12.1	ANALYTISCHE PLASMID-DNA-ISOLIERUNG (MINIPRÄPARATIONEN)	57
4.12.2	PRÄPARATIVE PLASMID-DNA-ISOLIERUNG	58
<b>4.13</b>	<b>SPEKTROMETRISCHE KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREN</b>	<b>59</b>
<b>4.14</b>	<b>STATISTISCHE METHODIK</b>	<b>60</b>
<b>5</b>	<b><u>ERGEBNISSE</u></b>	<b>61</b>
<b>5.1</b>	<b>ZUSAMMENGEFASSTE ZIELSETZUNG DER ARBEIT</b>	<b>61</b>
<b>5.2</b>	<b>ETABLIERUNG DER METHODIK</b>	<b>61</b>
<b>5.3</b>	<b>VERTEILUNG DES MDM2-POLYMORPHISMUS SNP309 IN DER EUROPÄISCHEN BEVÖLKERUNG</b>	<b>64</b>
<b>5.4.1</b>	<b>VERGLEICH DER GENOTYPFREQUENZEN DER GESUNDEN POPULATION MIT DENEN EINER AN RHEUMATOIDER ARTHRITIS ERKRANKTER POPULATION</b>	<b>66</b>
<b>5.5</b>	<b>SNP309-GENOTYPVERTEILUNG INNERHALB EINER GRUPPE AN COVID-ERKRANKTER PATIENTEN</b>	<b>68</b>
<b>5.6</b>	<b>HÄUFIGKEIT DER GENOTYPFREQUENZ BEI COVID-PATIENTEN MIT LYMPHADENOPATHIE, SPLENOMEGALIE ODER GRANULOMEN IM VERGLEICH ZU DERJENIGEN BEI ANDEREN AN COVID-ERKRANKTEN</b>	<b>70</b>
<b>5.7</b>	<b>GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER GENOTYP-VERTEILUNG INNERHALB DER DREI UNTERSUCHTEN POPULATIONEN</b>	<b>73</b>
<b>5.8</b>	<b>DIE BLUTSPENDERPROBE 391</b>	<b>74</b>
<b>6</b>	<b><u>DISKUSSION</u></b>	<b>77</b>
<b>6.1</b>	<b>DER SNP309 IN DER EUROPÄISCHEN BEVÖLKERUNG</b>	<b>77</b>
<b>6.2</b>	<b>DER SNP309 IN DER LITERATUR DER LETZTEN JAHRE</b>	<b>77</b>
6.2.1	VERÄNDERUNG DES ZELLULÄREN MDM2-GEHALTES UND TUMORENTSTEHUNG	77
6.2.2	GESCHLECHTSABHÄNGIGE TUMORENTSTEHUNG	79
<b>6.3</b>	<b>DER SNP309 IM ZUSAMMENHANG MIT RHEUMATOIDER POLYARTHRITIS</b>	<b>89</b>
<b>6.4</b>	<b>DIE BEDEUTUNG DES SNP309 FÜR DEN VERLAUF DER COVID</b>	<b>92</b>

<b><u>7</u></b>	<b><u>LITERATURVERZEICHNIS</u></b>	<b><u>93</u></b>
<b><u>8</u></b>	<b><u>ANHANG</u></b>	<b><u>108</u></b>
<b>8.1</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>108</b>
<b>8.2</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>109</b>
<b><u>9</u></b>	<b><u>LEBENS LAUF</u></b>	<b><u>110</u></b>
<b><u>10</u></b>	<b><u>DANKSAGUNG</u></b>	<b><u>112</u></b>

**Abkürzungen**

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A	Adenosin
Abl	c-abl oncogene 1, receptor tyrosine kinase
Ak	Adenylate Kinase
Aqua dest.	destiliertes Wasser
Arg	Arginin
BiP	= glucose-regulated protein (grp78)
BRCA I/II	Homo sapiens breast cancer I/II
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CDA	Cytidine Deaminase
CREB	cAMP responsive element binding protein
CVID	common variable immunodeficiency
d.h.	das heißt
DLBCL	diffuses großzelliges B-Zell Lymphom
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphate
DRB	DR beta
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FADD	Fas-associated death domain protein
Fas	TNF receptor superfamily member 6
Fas L	Fas Ligand
FLIP	auch: CFLAR = CASP8 and FADD-like apoptosis regulator

---

for	forward
G	Guanin
gp39	Knorpel-Glycoprotein-39
h	Stunde
HCL	Salzsäure
HDM	human double minutes
HLA	major histocompatibility complex
HNPCC	hereditäres nicht-polypöses Kolonkarzinom
Ig	Immunglobulin
IκB	inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells
IKK	IκB-Kinase-Komplex
Kac	Kaliumacetat
kb	Kilobasen
kbp	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kDa	kilo Dalton
l	Liter
LB	„Luria broth“
log	Logarithmus
M	Molar
MAP	mitogen-activated protein
MAP3K	mitogen-activated protein kinase 3
Mdm 1-3	mouse double minutes 1-3
ME	Maine, USA
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	“messenger“- ribonucleic acid
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid

---

NEMO	auch IKBKG = inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase gamma
NFκB	nuclear factor κB
NIK	auch MAP3K14 = mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14
nm	Nanometer
OH	Hydroxid
ORI	bakterieller Replikationsursprung
p53	Tumorprotein p53
p300	E1A bindendes Protein p300
PAGE	Polyacrylamidelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PI3K	phosphoinositide-3-kinase, catalytic, gamma polypeptide
Pro	Prolin
PTEN	Phosphatase und Tensin Homolog
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RA	rheumatoide Arthritis
Raf	auch ZHX2 = zinc fingers and homeoboxes 2
rev	reverse
RIP	receptor interacting protein
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat
sec	Sekunde
SH3	Src-homology 3
SNP	single nucleotid polymorphism
SOC-Medium	Derivat von SOB(super optimal broth)-Medium
sog.	so genannt
Sp1	Sp1 Transkriptionsfaktor
Src	v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian)

---

s.u.	siehe unten
SUMO	SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 1
T	Thymidin
TAE	Tris- Acetat- EDTA
TE	Tris- EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNFR	Tumor Nekrose Faktor Rezeptor
TNM	Tumorgröße, befallene Lymphknotenstationen, Metastasen
TP53	Tumorprotein p53
TRADD	TNFR1-associated death domain protein
TRAF	TNF receptor associated factor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
UV	ultraviolett
V	Volt
v.a	vor allem
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
WHO	Weltgesundheitsorganisation
w/v	Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel

## 1 Zusammenfassung

Im Jahr 2004 wurde erstmals ein "single nucleotide" Polymorphismus (Austausch einer einzelnen Base) innerhalb der Promoterregion des Mdm2-Genes (SNP309) beschrieben. Es konnte nachgewiesen werden, dass der Austausch der Nukleotidbase Thymin zu Guanin in Position 309 innerhalb des ersten Introns des Mdm2-Genes die Bindungsaffinität der enthaltenen Promoterregion für den Transkriptionsfaktor Sp1 erhöht und auf diese Weise die Transkription des Mdm2-Genes steigert. Mdm2 ist als einer der wichtigsten Antagonisten des Tumorsuppressors p53 bekannt. Dementsprechend bedingt die forcierte Synthese von Mdm2 gleichzeitig eine verstärkte Suppression der p53-abhängigen zellulären Signalwege. Die Folge einer Suppression der p53-Signalwege ist, dass eine in ihrem Erbgut geschädigte Zelle nur noch bedingt repariert bzw. eliminiert werden kann und so die Entstehung von Tumoren gefördert wird. Zudem ist p53 ein negativer Regulator des für Entzündungsreaktion entscheidenden Transkriptionsfaktors NfκB. Eine verminderte p53-Aktivität verstärkt demzufolge die Reaktion auf Entzündungsreize. Es stellte sich die Frage, ob die durch den SNP309 verursachte Suppression von p53 mit der Entstehung von chronischen Entzündungen, die mit einer erhöhten NfκB-Aktivität in Verbindung gebracht werden, assoziiert sein könnte. Als Vertreter dieser Erkrankungen wurden die rheumatoide Arthritis und das Auftreten von Lymphadenopathie, Splenomegalie und Granulomen im Rahmen einer CVID (Common variable Immunodeficiency) ausgewählt.

In einem ersten Schritt wurden die Allelfrequenz des SNP309 und die Genotypverteilung innerhalb der europäischen Bevölkerung untersucht und mit den ab der nordamerikanischen Bevölkerung erhobenen Ergebnissen verglichen. Die Genotyp-Verteilungen entsprachen sich weitgehend ( $p = 0,299$ ). Im Weiteren wurde die Genotyp-Verteilung innerhalb einer 192 Patienten umfassenden Gruppe an rheumatoider Arthritis Erkrankter und einer 52 Patienten umfassenden Gruppe an CVID Erkrankter untersucht. Es ergaben sich in der Genotyp-Verteilung zwischen Kontrollgruppe und der Gruppe der an CVID Erkrankten keine Unterschiede ( $p = 0,743$ ). Auch konnte keine Assoziation des SNP309 mit dem Auftreten von Lymphadenopathie ( $p = 0,282$ ), Splenomegalie ( $p = 0,806$ ) und Granulomen ( $p = 0,422$ ) bei CVID nachgewiesen werden. Auffällig war jedoch, dass der SNP309 sowohl homozygot als auch heterozygot signifikant seltener bei an rheumatoider Arthritis Erkrankten, als bei Gesunden nachgewiesen werden konnte (Kontrollgruppe: G/T 49,3 %, G/G 14,2 %; Gruppe der Erkrankten G/T 42,2 %, G/G 10,9 %;  $p = 0,046$ ). Bei der weiteren geschlechtsspezifischen

Stratifizierung wurde deutlich, dass die unterschiedlichen Genotypfrequenzen auf Unterschieden in der weiblichen Subgruppe beruhen ( $p = 0,043$ ). Bei Männern traten keine Unterschiede in der Genotypverteilung zwischen Gesunden und Erkrankten auf ( $0,577$ ). Erhöhte Mdm2-Level könnten sich dementsprechend bei Frauen protektiv auswirken. Ob dies der Fall ist und welche molekularen Mechanismen wirken, bleibt weiter zu untersuchen.

## Abstract

A single nucleotide polymorphism (exchange of a single base) in the promoter region of the Mdm2 gene (SNP309) was first described in 2004. It was shown that the change from Thymine to Guanine at position 309 of the first intron caused a higher affinity of the Mdm2 promoter for transcription factor Sp1. Thus Mdm2 transcription is facilitated. Mdm2 is well known as one of the most important negative regulators of the tumor suppressor p53. Accordingly, an increased synthesis of Mdm2 suppresses cellular p53 signalling. The consequence is, that DNA-damaged cells are less efficiently repaired or eliminated and are thus more prone to tumor development. In addition p53 serves as an antagonist of NfκB, the transcription factor determining the course of inflammations. P53 suppression therefore causes a more sensitive reaction towards inflammatory reaction. We therefore asked whether p53 suppression caused by SNP309 could be associated with the development of chronic inflammations, especially of chronic inflammations linked with an increased activity of NfκB. Rheumatoid Arthritis and lymphadenopathy, splenomegaly and granulomatous disease in patients with CVID (common variable immunodeficiency) were chosen as examples for such inflammatory diseases.

First the SNP309 genotype distribution among Europeans was analysed. The results obtained, failed to differ from those in North Americans described by the group that discovered the polymorphism ( $p = 0,299$ ). The genotype distribution among 52 patients with CVID ( $p = 0,743$ ) showed also no difference compared with healthy Europeans. Similarly no association of lymphadenopathy ( $p = 0,282$ ), splenomegaly ( $p = 0,806$ ) and granulomatous disease ( $p = 0,422$ ) in CVID patients with the SNP309 was detectable. Interestingly, the SNP309 was less often detected in patients with Rheumatoid Arthritis as in healthy people (healthy people: G/T 49,3 %, G/G 14,2 %; patients with RA: G/T 42,2 %, G/G 10,9 %;  $p = 0,046$ ). Gender-dependent stratification showed that the differences were caused by the genotype distribution among female patients ( $p = 0,043$ ). No differences were detected between the genotype distributions in males ( $p = 0,577$ ). Increased Mdm2-levels might thus

act in a protective way in women with Rheumatoid Arthritis. The molecular mechanisms have to be examined.

## **2 Einleitung**

### **2.1 Apoptose und Tumorentstehung**

Der menschliche Organismus befindet sich in einem labilen Gleichgewicht aus Zellerneuerung durch Zellteilung und Zelltod. Dadurch ist er in der Lage seine Form zu erhalten, geschädigte Zellen zu ersetzen und sich den Bedingungen der Umwelt in einem begrenzten Maße anzupassen. Zelltod ist auf zweierlei Weise möglich: Nekrose oder Apoptose. Bei der Apoptose, dem so genannten programmierten Zelltod, lösen Signale aus anderen Zellen eine proteolytische Kaskade in der Zielzelle aus. Die Zelle beginnt zu schrumpfen, ihr Inneres verdichtet sich, die Kernhülle löst sich auf, die DNA fragmentiert und die Zelle verändert ihre Oberflächeneigenschaften. Als Folge der veränderten Zelloberfläche wird die Zelle von anderen Zellen - Nachbarzellen oder Makrophagen - phagozytiert. [Alberts et al., 1999, S 629f] Auf diese Weise wird unter anderem unkontrolliertes Wachstum im Rahmen einer Zellschädigung verhindert. Krebs entsteht durch eine Anhäufung von Mutationen, die diese Mechanismen umgehen. Man unterscheidet hierbei Mutationen in zwei großen Gengruppen:

- Onkogene - kodieren für Proteine, die die Zellteilung und das Wachstum fördern
- Tumorsuppressorgene - kodieren für Proteine die der Wachstumskontrolle dienen

[Alberts et al., 1999, S 630]

### **2.2 Der p53- Tumorsuppressor**

Das p53- Protein wurde im Jahr 1979 erstmals von Lane, Crawford, Linzer und Levine beschrieben. Es wurde als ein Protein entdeckt, das in von „simian virus 40“ infizierten Zellen an das „große T“ Antigen binden kann, welches die

Transformation der infizierten Zellen verursacht. Die ersten Jahre wurde p53 als Onkogen eingestuft. Erst später erkannte man, dass in maligne transformierten Zellen das p53- Gen häufig mutiert ist, und dass das Produkt eines intakten Genes das Zellwachstum hemmt. [reviewed by Steele, 1998] Heute weiß man, dass die meisten Tumorzellen entweder Mutationen des p53- Gens selbst oder innerhalb des pathways, der zur p53- Aktivierung führt, aufweisen [reviewed by Vogelstein et al., 2000]

### 2.2.1 Funktionelle Domänen und Struktur

Das humane p53- Gen kodiert für ein Protein aus 393 Aminosäuren, welches sich aus vier funktionellen Domänen zusammensetzt.

Die aminoterminal Domäne beinhaltet die Transkriptionsaktivierungsregion (Aminosäuren 1-42) und eine Prolin-reiche SH3-Zielregion (Aminosäuren 60-97). An letztere können Proteine mit einer SH3- Domäne binden, wie sie unter anderem im nicht katalytischen Teil von verschiedenen zytoplasmatischen Tyrosinkinasen wie Abl und Src gefunden wurden. Sie erhöhen die Substratspezifität der Tyrosinkinasen. Durch posttranslationale Modifizierung der aminoterminalen Domäne werden die Wechselwirkungen mit Proteinen, die die Transkriptionsaktivität und die Halbwertszeit von p53 regulieren, beeinflusst.

Die DNA- bindende Domäne oder auch Core-Domäne bildet den größten Teil des p53- Proteins. Sie ist entscheidend für die spezifische DNA-Bindung und umfasst die Aminosäuren 102-292. Innerhalb dieser Region befinden sich 90 % der nachgewiesenen tumorigenen Mutationen. Die Core-Domäne ist sehr resistent gegenüber proteolytischem Verdau und eine der stabilsten Regionen des Proteins.

Mit den Aminosäuren 323-365 schließt sich die Tetramerisierungsdomäne an. Sie ist bestimmend für die Quartärstruktur des Proteins, bestehend aus einem Dimer von Dimeren. Die Quartärstruktur verändert die Bindung von p53 an die Konsensus-DNA und die zugehörige Bindungsaffinität.

Als letztes folgt die carboxyterminale Regulierungsdomäne (Aminosäuren 360-393). Sie ist mit der Tetramerisierungsdomäne über eine basische Linker-Region, die eine Kernlokalisierungssequenz für p53 beinhaltet, verbunden. Die Domäne scheint die spezifische DNA-Bindung des gesamten Proteins negativ zu beeinflussen. Auf welche Art und Weise der Einfluss zustande kommt ist noch ungeklärt. Weiterhin kann das Protein mit dieser Region unspezifisch an DNA binden, und die posttranslationale Modifizierung dieses Bereiches stabilisiert und aktiviert p53.

[reviewed by Römer et al., 2006]

### 2.2.2 Kontrolle zellulärer Funktionen

In erster Linie ist p53 ein Transkriptionsfaktor. Die Proteine, deren Transkription p53 einleitet, sind in vielerlei Weise mitverantwortlich für die Effekte der p53-Aktivierung.

Grob vereinfacht führt die Aktivierung von p53 im Rahmen einer Vielzahl an Zellschäden – direkte DNA-Schädigung, chromosomale Aberrationen, Hypoxie, Telomerverkürzung und andere – entweder zu einem Zellzyklusarrest, der das Einsetzen von Reparaturmechanismen ermöglicht, oder zum programmierten Zelltod. Welcher der beiden Wege eingeschlagen wird ist unter anderem abhängig von intra- und extrazellulären Signalen, in Form von sezernierten Molekülen wie zum Beispiel Hormonen und Zell-Zell bzw. Zell-Matrix Interaktionen. Zudem spielen der Genotyp der betroffenen Zelle und natürlich auch das Ausmaß der Zellschädigung eine Rolle.

Relativ neu ist die Bedeutung von p53 für die replikative Seneszens und das Altern. Transgene Mäuse mit einer erhöhten Aktivität von p53 sind zwar relativ resistent gegenüber spontanen Tumoren, ihre Lebenszeit ist jedoch signifikant kürzer als die der normalen Tiere. Auch zeigten die transgenen Mäuse Zeichen vorzeitigen Alterns. P53 scheint also dazu in der Lage zu sein neben einem transienten Zellzyklusarrest auch einen irreversiblen Zellzyklusarrest hervorzurufen, der typisch für einen seneszenten Zellphänotyp ist.

Die Hauptfunktion von p53 als Transkriptionsfaktor bedingt seine Lokalisation im Zellkern. Das p53-Protein enthält jedoch auch zwei Kernexportsequenzen. Der Kernexport wird von Mdm2 gefördert (s.u.), ist aber von diesem nicht vollständig abhängig. Er ist wichtig für den Abbau des p53-Proteins, spielt jedoch zusätzlich eine Rolle für transkriptionsunabhängige Apoptosewege. P53 kann an Mitochondrien lokalisiert sein und dort direkt mit antiapoptotischen Proteinen in Wechselwirkung treten, was schließlich die Freisetzung von Cytochrom c und damit die Einleitung der Apoptose bedingt.

[reviewed by Römer et al., 2006; Oren, 2003]

### **2.3 Die Mdm2- Ubiquitinligase**

Entdeckt wurde das Mdm2- Gen als eines von 3 Genen (Mdm 1-3), die in spontan veränderten Mäuse 3T3 Fibrinoblasten, so genannten BALB/c Zelllinien, mehr als 50-fach überexprimiert wurden. Das Gen befand sich auf kleinen, acentromerischen Kernkörperchen, die man als „double minutes“ bezeichnet. Man findet sie nur in Zellen, wenn sie für diese einen Wachstumsvorteil bedeuten. [reviewed by Iwakuma et Lozano, 2003]. Das menschliche Analogon – auch Hdm2 – liegt auf Chromosom 12q13-14. Es ist ungefähr 33 kb lang und enthält mindestens 12 Exons. Die Größe der Exons schwankt zwischen 50 und  $\geq 1161$  bp, die der Introns zwischen 121 und 7000 bp. Sein Genprodukt besteht aus 491 Aminosäuren und enthält eine p53-Bindungsdomäne (Kodon 19-102), ein putatives Kernlokalisierungssignal (Kodon 181-185), eine saure Domäne (Kodon 223-274), ein zentrales Zinkfingermotiv (Kodon 305-332), sowie ein „ring- finger“ Motiv im carboxyterminalen Bereich des Proteins (Kodon 438-478). [Liang et al., 2004] Die „ring- finger“ Domäne ist von entscheidender Bedeutung für die Ubiquitin-Ligase-Aktivität des gesamten Moleküls. Ist sie mutiert, kann Mdm2 nur in eingeschränktem Maß p53 oder sich selbst ubiquitinylieren. [Honda, 2000] Zusätzlich ist die „ring- finger“ Domäne dafür

nötig, dass p53 aus dem Kern ins Zytoplasma transportiert werden kann. [Geyer et al., 2000]

In beim Menschen auftretenden Sarkomen ist Mdm2 zu 30 % der Fälle verändert. Es ist ein pluripotentes Onkoprotein, das auf verschiedene Art und Weise Einfluss auf den Zellzyklus nimmt. Der wohl bedeutendste und am besten untersuchte Wirkmechanismus ist die negative Regulation des p53- Proteins, auf die im Weiteren näher eingegangen wird. [Liang et al., 2004]

#### **2.4 Der regulatorische p53- Mdm2-Pfad**

Die intrazelluläre Konzentration an p53- Protein ist entscheidend für seine Wirkung. In Zellen, die nicht unter dem Einfluss von zellulärem Stress stehen, ist p53 mit einer Halbwertszeit von 5 - 30 min äußerst kurzlebig, was die normalerweise niedrige Proteinkonzentration bedingt.

In den letzten Jahren hat sich Mdm2 immer mehr als einer der wichtigsten zellulären Antagonisten, der p53 dem proteasomalen Abbau zuführt, herauskristallisiert. Mdm2 ist wie schon oben beschrieben eine E3 Ubiquitin-Ligase. Es überträgt Ubiquitin-Monomere auf Lysinreste innerhalb von Proteinen. So auch auf Lysinreste innerhalb von p53, und da vor allem auf jene im carboxyterminalen Bereich des Proteins. Die durch Mdm2 bedingte Ubiquitinylierung findet im Zellkern innerhalb eines Komplexes mit dem p300/CREB-bindendem Protein und Transkriptions-Koaktivator Proteinen statt. Die Bildung des Komplexes aus Mdm2, p300 und p53 bewirkt zudem, dass Mdm2 die Acetylierung von p53 durch p300 und somit die Aktivierung seiner Transkriptionaktivität verhindert.

Durch Mdm2 monoubiquitinyliertes p53 ist noch kein Substrat für den proteasomalen Abbau. Um p53 diesem zuzuführen, ist eine Polyubiquitinylierung notwendig. Man nimmt an, dass eine Kette aus mindestens vier angefügten Ubiquitin- Molekülen nötig ist. Der p300/Mdm2-Komplex als Ganzes unterstützt die erforderliche Polyubiquitinylierung. P53 kann daraufhin in den Proteasomen des

Zellkerns oder des Cytoplasmas abgebaut werden. Durch Entstehen des Proteinkomplexes wird p53 demzufolge nicht nur nicht aktiviert sondern gleichzeitig für den Abbau markiert.

Auch außerhalb des erwähnten Komplexes bewirkt die Bindung von Mdm2 innerhalb der aminoterminalen Transaktivierungsdomäne von p53, dass das Protein seine Fähigkeit zur Transaktivierung verliert.

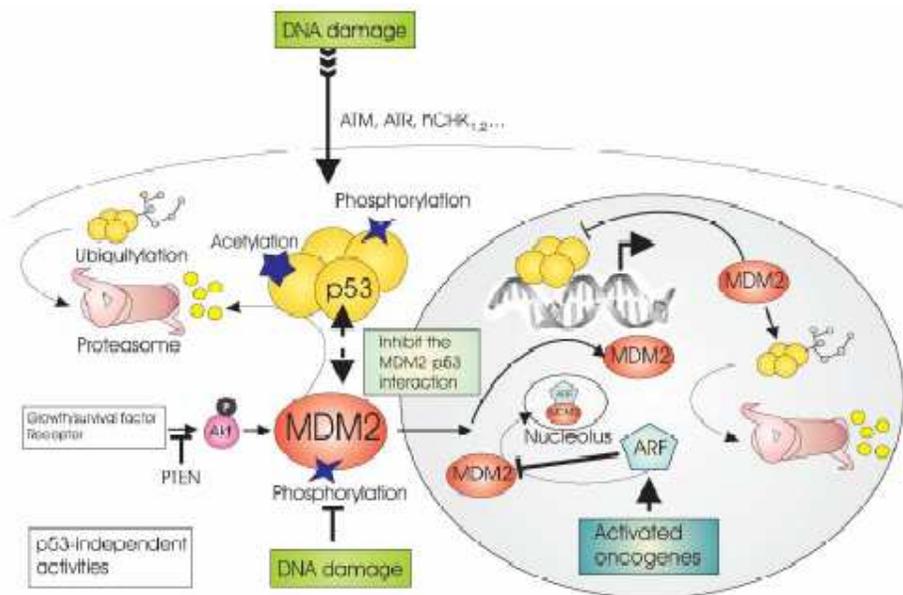
Interessanterweise wird die Transkription des Mdm2-Gens selbst ebenfalls durch p53 induziert. Mdm2 und p53 sind demnach durch eine negative feedback-Schleife eng miteinander verbunden, was dazu führt, dass die p53-Konzentration in Abwesenheit von Stress auf einem niedrigen Level gehalten wird. (s. Abb.2.1)

Welche Schritte sind nun aber notwendig, damit die p53- Konzentration im Fall einer Zellschädigung ansteigen kann, und so entweder ein Zellzyklusarrest oder die Apoptose eingeleitet wird? Das Schlüsselereignis ist hierfür der Zerfall des p53-Mdm2-Komplexes. Die verschiedenen Arten, durch die ein Zellschaden hervorgerufen werden kann, verursachen auch auf unterschiedliche Weise Mdm2-Verdrängung aus dem Komplex. Ionisierende Strahlung zum Beispiel aktiviert verschiedene so genannte „Stresskinasen“, was am Ende die Phosphorylierung von p53 an verschiedenen Serinresten im Aminoterminus bewirkt. Die Folge ist eine geringere Affinität von Mdm2 zum modifizierten p53. UV-Bestrahlung und Hypoxie hingegen verursachen eine verringerte Konzentration an Mdm2-Transkripten und an Mdm2-Protein selbst. Zusätzlich verhindert eine Schädigung durch UV-Strahlen Ubiquitinylierung und fördert sogar die Transkriptionsaktivität von p53 durch Modifizierung des Moleküls.

Mittlerweile ist bekannt, dass auch Mdm2 in Folge von zellulärem Stress verändert wird. Es wird an verschiedenen Stellen, von denen sich die Meisten innerhalb der p53-bindenden Region, und der für den p53-Abbau bedeutenden zentralen sauren Region befinden, phosphoryliert.

Nicht zuletzt ist Mdm2 auch in der Lage, sich selbst zu ubiquitinylieren. Die Balance zwischen Eigen- und p53-Ubiquitinylierung wird gehalten indem je nach Bedarf beide Moleküle phosphoryliert werden können, und so vor der Verbindung mit Ubiquitin geschützt sind.

[reviewed by Moll et al., 2003; Iwakuma et al., 2003]



**Abbildung 2.1: Mdm2-p53-Interaktion:** p53 stimuliert die Expression von Mdm2, Mdm2 inhibiert im Gegenzug die p53-Aktivität, indem es seine Degradation im Nucleus und Zytoplasma fördert, seine Transkriptionsaktivität blockt und seinen Export ins Zytoplasma unterstützt [Moll et al., 2003]

## 2.5 Der Mdm2-Gen-Polymorphismus SNP309

In einem gewissen Anteil menschlicher Tumore wird Mdm2-mRNA und -Protein überexprimiert. Dies ist mit schnellerer Tumorprogression und einer erhöhten Therapieresistenz verbunden.[Freedman and Levine, 1999] Ein Teil eben dieser Tumore weist nun nur eine verstärkte Expression von Mdm2, jedoch kein mutiertes p53 auf, was die Vermutung zulässt, eine hohe Mdm2-Konzentration könne eine

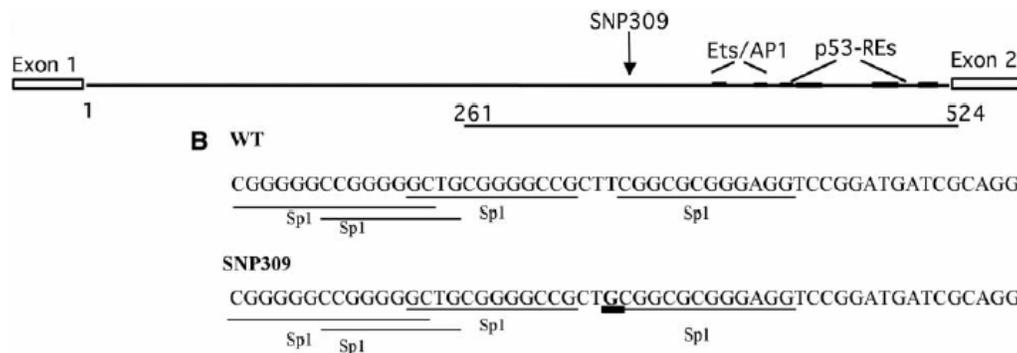
p53-Mutation auf dem Weg zur Tumorentstehung ersetzen und sei dementsprechend schon allein tumorigen. [Leach et al., 1993; Onliner et al., 1992] Dies brachte eine Arbeitsgruppe um Arnold Levine auf die Idee, dass natürlich vorkommende Sequenzvarianzen im Mdm2-Gen, die zu seiner verstärkten Expression führen, genauso ursächlich für die unterschiedliche Prädisposition menschlichen Individuen gegenüber Tumoren sein könnten, wie schon bekannte Genvarianten von p53 oder andere wichtige Moleküle innerhalb des „pathways“. Sie begannen nach genetischen Variationen innerhalb des ersten Introns und dort im Bereich eines intronischen Promoters, der unter anderem über den p53-„pathway“ aktiviert wird, zu suchen. Hierfür wurden aus DNA-Proben von 50 gesunden Freiwilligen ein Stück genomischer DNA der Länge 300 bp amplifiziert und sequenziert. Die Arbeitsgruppe fand zwei „single nucleotide polymorphisms“ (SNPs). Einer der beiden tauchte in der Versuchsgruppe relativ häufig (heterozygot 40 % und homozygot 12 %) auf und wurde daher näher untersucht. Dabei handelt es sich um den Austausch des 309. Nucleosids im ersten Intron von Thymin zu Guanin. Verschiedene Experimente zeigten, dass der Polymorphismus die Länge einer putativen Sp1-Bindungsstelle verlängert, und dadurch dessen Affinität zum Mdm2-Promoter erhöht. Als Konsequenz wird Mdm2 in einem erhöhten Maß transkribiert. Die Konzentration an Mdm2-RNA und -Protein steigt an. (s. Abb. 2.2)

Eine übersteigerte Expression von Mdm2 kann den p53-Pfad blockieren. Dementsprechend stellte sich die Frage, ob die erhöhten Mdm2-Level im Rahmen des SNP309 auch dazu in der Lage seien. Tatsächlich zeigte sich eine signifikant erniedrigte Apoptoserate in mit dem Chemotherapeutikum Etoposide behandelten Zellen mit dem Polymorphismus, im Vergleich zu Zellen ohne den Polymorphismus. Eine Aktivierung des p53-Pfades bedingt zudem das p53 die Transkription verschiedener Gene initiiert. Für SNP309 homozygote Zellen reagierten auf DNA-Schäden mit einer deutlich geringeren Transkriptionsaktivität als solche ohne den Polymorphismus. Die Zellantwort auf DNA-Schädigung wird durch den SNP309 also deutlich beeinträchtigt. Die Versuche zeigten, dass durch SNP309 erhöhte Mdm2-Konzentrationen verhindern, dass p53 in Folge von zellulärem Stress ausreichend stabilisiert werden kann, um seine Funktion zu erfüllen.

In Zellen, die nicht zellulärem Stress ausgesetzt werden, hat die gesteigerte Mdm2-Expression interessanterweise jedoch keine weitere Auswirkung auf die Höhe der p53-Konzentration. Die Fähigkeit von Mdm2 die p53-Konzentration in der Zelle zu beeinflussen, scheint in nicht geschädigten Zellen also nicht in dem Maß von Bedeutung zu sein.

In folgenden klinisch epidemiologischen Studien wurde im Weiteren die Assoziation von SNP309 mit einem mindestens 9 Jahre früheren Auftreten von sowohl erblichen, als auch sporadischen Tumoren gezeigt.

[Bond et al., 2004]



**Abbildung 2.2:** schematische Darstellung der Mdm2 Promoterregion, die den SNP309 enthält [Bond et al., 2004]

## 2.6 Der Botenstoff TNF $\alpha$

Vielerlei unterschiedliche Zellen im Organismus sind in der Lage, den Botenstoff TNF $\alpha$  zu produzieren. Er ist im Ablauf ganz unterschiedlicher zellulärer Mechanismen von Bedeutung. So spielt er eine Rolle bei der Regulation des zellulären Wachstums und der Differenzierung, beeinflusst Entzündungsreaktionen, die virale Replikation, die Tumorgenese, autoimmune Erkrankungen und die Reaktion auf bakterielle, virale, Pilz- und Parasiteninfektionen. Seine Produktion wird unter anderem durch Entzündungen, Infektionen und Verletzungen provoziert.

Mögliche Folgen im Organismus sind die Aktivierung von Lymphozyten und Leukozyten einschließlich deren Migration, Fieber, die „Akute Phase Reaktion“, die Proliferation von Zellen, ihre Differenzierung und die Einleitung der Apoptose.

Seit der Entdeckung von TNF (bzw. TNF $\alpha$ ) im Jahr 1977 durch Lloyd Old und seine Mitarbeiter wurden immer wieder neue Homologe gefunden. Sie stimmen in ihrem Aufbau in 25-30% überein und bilden eine Molekülfamilie aus trimerischen Zytokinen und Oberflächenproteinen. TNF $\alpha$  ist einer ihrer bekanntesten Vertreter.

[reviewed by Aggarwal, 2000; Baud et Karin, 2001; and by Fiers, 1991]

### 2.6.1 Biochemischer Aufbau

Das humane TNF-Gen liegt auf Chromosom 6, genauer gesagt auf 6p21.3. Es kodiert für ein Polypeptid, das in seiner prozessierten Form aus 157 Aminosäuren besteht.

TNF bildet ein Trimer mit einer Molekülmasse von 52 kDa. Jede der drei Untereinheiten enthält eine Disulfidbrücke, die jedoch nicht für die biochemische Aktivität von Bedeutung ist. Jede Untereinheit besteht aus zwei  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen, wiederum zusammengesetzt aus fünf antiparallel verlaufenden  $\beta$ -Strängen. Das carboxyterminale Ende der Polypeptide befindet sich jeweils im nach innen gerichteten hydrophoben  $\beta$ -Faltblatt, nahe der zentralen Achse des Trimers. Das jeweils nach außen gerichtete  $\beta$ -Faltblatt besitzt zahlreich hydrophile Anteile. Insgesamt entsteht ein pyramidenförmiges Gebilde.

Der aktive Teil des Proteins befindet sich in der Furche, die jeweils zwischen zwei Untereinheiten entsteht. Er entspricht dem Rezeptor bindenden Anteil des Moleküls.

[reviewed by Fiers, 1991; Aggarwal, 2000]

### 2.6.2 Der TNF $\alpha$ -NF $\kappa$ B-Pfad

TNF $\alpha$  kann mit nahezu gleicher Affinität an zwei unterschiedliche Rezeptoren binden, an TNFR1 oder TNFR2. Der TNF $\alpha$ -NF $\kappa$ B-Pfad wird durch die Bindung an

TNFR1 initiiert. Die Bindung bewirkt eine Trimerisation des Rezeptors. In der Folge wandern verschiedene zytoplasmatische Signalproteine zur intrazellulären Rezeptordomäne. Das erste Protein, das an TNFR1 bindet ist das „TNFR1-associated death domain protein“ (TRADD). Es interagiert mit TNFR1 über die so genannte „death domain“, die in beiden Proteinen enthalten ist. Die Interaktion der beiden Moleküle ist Voraussetzung für den weiteren Signalweg. Verschiedene andere Proteine können sich in Folge an den Komplex anlagern. „Fas-associated death domain protein“ (FADD), „receptor-interacting protein 1“ (RIP1), und der „TNF-receptor-associated factor 2“ (TRAF2) wandern zum Komplex. FADD reagiert mit TRADD über die in ihm ebenfalls enthaltene „death domain“. Es initiiert die Bindung weiterer Botenstoffe und aktiviert eine Signalkaskade, die an ihrem Ende den programmierten Zelltod der betroffenen Zelle einleitet.

Auch RIP1 tritt über eine „death domain“ mit FADD in Interaktion. RIP1 ist wesentlich für die spätere NF $\kappa$ B-Aktivierung. Damit es zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B kommen kann, muss auch noch TRAF mit dem Rezeptorkomplex interagieren. Optimal ist, wenn es sich bei dem Liganden um TRAF2 handelt, wahrscheinlich kann TRAF5 jedoch seine Rolle übernehmen. RIP1- und TRAF2-Bindung gemeinsam vervollständigen den Rezeptorkomplex, der nun als Ganzes auf den zytoplasmatischen IKK-Komplex (I $\kappa$ B Kinase Komplex) einwirken kann. RIP1 interagiert hierbei mit der regulatorischen IKK $\gamma$ /NEMO-Untereinheit, TRAF2 ist wahrscheinlich für die Translokation des sich im Zytosol befindenden IKK-Komplexes zum TNFR1-Komplex von entscheidender Bedeutung. IKK wird im Weiteren durch die Phosphorylierung zweier Serine in der IKK $\beta$ -Untereinheit aktiviert. Welche Moleküle den Übergang vom aktivierten TNFR-Komplex und dessen Interaktion mit IKK zur tatsächlichen Phosphorylierung des Letzteren schaffen ist noch unklar. Verschiedene MAP3Ks und NIK waren dabei schon im Gespräch.

Durch die Phosphorylierung des IKK-Komplexes erhält dieser seine Kinase-Aktivität und ist in der Lage das inhibitorische Proteine I $\kappa$ B zu phosphorylieren. Ist das geschehen, wird NF $\kappa$ B durch I $\kappa$ B aus der bestehenden Bindung entlassen. NF $\kappa$ B kann in den Zellkern wandern und dort die Transkription der für die

Entzündungsreaktion wichtigen Proteine initiieren. Auch im Zellkern ist es noch weiter möglich, die Transkriptionsaktivität von NFκB zu beeinflussen. Dies geschieht über Phosphorylierung dieses Transkriptionsfaktors (s. Abb. 2.3)

[reviewed by Aggarwal, 2000; Baud et Karin, 2001]

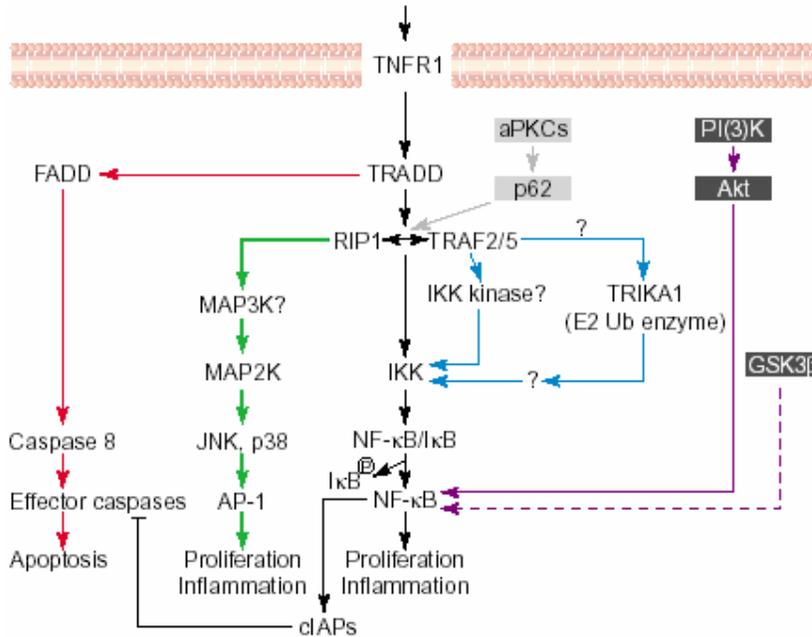


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des TNFα-Signalwegs [Baud et Karin, 2001]

## 2.7 Die Regulation von Entzündungsreaktionen durch p53 und NFκB

Ist p53 in Menschen oder Mäusen mutiert oder gar nicht vorhanden, tragen die Individuen ein hohes Tumorrisiko. Die meisten p53 negativen Mäuse sterben noch bevor sie sechs Monate alt werden an Tumoren. Dass p53 Tumorentstehung supprimiert, wird normalerweise seiner Eigenschaft als „Wächter des Genoms“ zugeschrieben. Dabei wird völlig außer Acht gelassen, dass es auch einige Hinweise

auf die Beteiligung von p53 bei der Kontrolle von Entzündungsreaktionen gibt und Entzündungen, vor allem wenn sie chronisch verlaufen, die Tumorentstehung fördern können. In diesem Zusammenhang fiel zum Beispiel auf, dass Immunreaktionen bei p53 negativen Mäusen wesentlich schwerer verlaufen, dass ionisierende Strahlung eine schnellere und stärkere Infiltration von Entzündungszellen und Fibroblasten bei eben diesen Mäusen verursacht, und dass 25 % der p53 negativen Mäuse noch bevor sich in ihnen ein Tumor entwickeln kann, an Infektionen versterben. Der Effekt lässt sich kaum dem erworbenen Immunsystem zuschreiben. Die Immunglobulin-Konzentration, so wie auch die B- und T-Zell-Zahlen im Thymus und in der Milz von p53 negativen Mäusen unterscheiden sich nicht von denen in normogenen Mäusen. Der Zusammenhang zwischen p53 und der Regulation von Entzündungsreaktionen scheint eher in einer möglichen Interaktion mit NFκB zu liegen. NFκB ist der wichtigste Regulator der Entzündungsreaktion auf molekularer Ebene. Es initiiert die Transkription von Genen, die für inflammatorische Zytokine, Chemokine, antimikrobielle Peptide, Adhäsionsmoleküle und andere an der Entzündungsreaktion beteiligte Moleküle kodieren. In in-vitro Studien konnte bereits seit längerem nachgewiesen werden, dass p53 und NFκB sich gegenseitig negativ beeinflussen. Nun stellte sich eine Arbeitsgruppe in Cleveland die Frage, ob die Erkenntnisse aus den in-vitro Versuchen sich auch auf Abläufe innerhalb von lebenden Organismen übertragen lassen. Sie waren in der Lage nachzuweisen, dass durch die Blockade von p53 ganz ähnliche Gene aktiviert werden, wie bei der Behandlung der Zellen mit TNFα. Das heißt, ein Mangel an p53 bewirkt grob die Transkription derselben Gene, wie die Signalkaskade, die über die Bindung von TNFα an TNFR1 im Rahmen vieler Entzündungen ausgelöst wird. Zellen von p53 negativen Mäusen reagieren auf Entzündungsreize wesentlich sensibler mit NFκB-abhängiger Transkriptionsinitiierung als die normogener Mäuse. Ebenso werden zelluläre Mediatoren verstärkt aktiviert und biochemische Entzündungsmarker sind in p53 negativen Mäusen signifikant erhöht. Nicht zuletzt hängt ein Mangel an p53 mit einer höheren Sensibilität gegenüber Endotoxinen zusammen. Alles zusammen brachte die Arbeitsgruppe zu dem Schluss, dass p53 die Entzündungsantwort im Körper limitiert, indem es NFκB supprimiert. Die

Arbeitsgruppe entdeckt neben der Möglichkeit über NfκB Einfluss auf die Entzündungsreaktion zu nehmen, dass p53 auch für die Makrophagenfunktion von Bedeutung ist. P53 negative Makrophagen sind nur in vermindertem Maß in der Lage apoptotische Zellen zu erkennen.

Demzufolge bewirkt ein Mangel an p53, auf welche Art und Weise er auch verursacht ist, dass chronische proinflammatorische Bedingungen entstehen und begünstigt auf diese Weise das Auftreten chronischer Entzündungen.

[Komarova et al., 2005]

## 2.8 Rheumatoide Arthritis

Bei der rheumatoiden Arthritis (RA) handelt es sich um eine entzündlich-rheumatische Systemerkrankung. Die Arthritis betrifft vor allem die kleinen, peripheren Gelenke und die obere Halswirbelsäule. Die rheumatoide Arthritis beschränkt sich jedoch nicht ausschließlich auf die Gelenke. Sie verursacht auch Granulome (auch als Rheumaknoten bekannt), Serositiden, Vaskulitiden und verschiedene weitere Erscheinungen. Sie verläuft meist schubweise und ist begleitet von starken Schmerzen, Schwellung, Überwärmung und Rötung der betroffenen Gelenke. In vielen Fällen führt die Erkrankung zu einer zunehmenden Bewegungseinschränkung und zur Deformation der Gelenke. [Genth, 2002]

Die Invasion der entzündeten Gelenkinnenhaut in den, die Gelenkfläche bedeckenden Knorpel und in den Knochen bedingt die Destruktion des Gelenkes. Verursacht wird die Invasion durch synoviale Hyperplasie, chronische Entzündung und eine pathologische Immunantwort. [Müller-Ladner et Pap, 2005]

Die Prävalenz der rheumatoiden Arthritis beträgt ca. 0,5 %. Pro Jahr kommt es zu ca. 30 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner (Inzidenz). Prinzipiell kann die Erkrankung in jedem Alter auftreten, der Erkrankungsgipfel liegt jedoch im 5. und 6. Lebensjahrzehnt. Frauen erkranken doppelt bis dreimal so häufig wie Männer. [Genth, 2002]

Die Pathogenese der rheumatoiden Arthritis ist noch immer nicht vollständig geklärt. Viele Fragen bleiben auch weiterhin offen. Trotzdem kristallisieren sich verschiedene Faktoren heraus, die am Entstehen der Krankheit beteiligt sind. Auf einzelne Aspekte soll im Weiteren näher eingegangen werden.

Im Jahr 1970 konnte Stasny die genetische Assoziation der rheumatoiden Arthritis mit HLA nachweisen. Näher beschrieben die genetischen Zusammenhänge Gregsen, Winchester und Silver. Sie fanden eine Sequenz innerhalb von DR $\beta$  des HLA Klasse II Moleküls, die an der Bildung der Peptid-Bindungs-Furche in HLA-DR Allel Formen beteiligt ist, die mit rheumatoider Arthritis assoziiert sind. Da diese Sequenz sich aber nur bei einem Teil der Erkrankten nachweisen lässt, ist unklar inwieweit ihr Vorhandensein die Entstehung der Erkrankung beeinflusst. Diskutiert wird, ob sie entscheidend für den zu erwartenden Krankheitsverlauf ist.

Eine wichtige Rolle bei Krankheitsentstehung und Krankheitsverlauf kommt verschiedenen Zytokinen zu. Sie beeinflussen die Entzündungsreaktion und die Gelenkdestruktion direkt. Wird im Tierexperiment durch genetische Manipulation TNF $\alpha$  überexprimiert bzw. seine Regulation unterdrückt, ist es möglich auf diese Weise eine chronische, destruierende Arthritis auszulösen. Auf den gleichen Sachverhalt weisen verschiedene in-vitro Experimente hin. Sie zeigen, dass TNF $\alpha$  Signalwege in Synovialzellen induziert, die für die Erkrankung von Bedeutung sind. Außer TNF $\alpha$  fördern verschiedene im Synovium enthaltene Interleukine (1, 15, 16) die Zerstörung des Gelenks.

Im Rahmen der rheumatoiden Arthritis verändern sich die biologischen Eigenschaften von Fibroblasten. Im Gesunden erhalten sie als ortständige Zellen die Homoöstase im Gelenkspalt. Bei Erkrankten werden sie sowohl durch Zytokine, als auch durch das entzündete Synovium selbst, aktiviert. Letzteres führt zu einer dauerhaften Veränderung oder auch Transformation der Fibroblasten. Sie weisen morphologische Veränderungen, wie große, blass erscheinende Zellkerne mit mehreren prominenten Nukleoli und ein dichtes endoplasmatisches Retikulum auf und zeigen ein aggressiv-invasives Verhalten.

Ein weiterer Faktor in der Genese der Erkrankung ist die veränderte Expression und Funktion von Proto-Onkogenen und Tumorsuppressoren in RA Fibroblasten. Dabei

scheint die Aktivierung Ras-abhängiger Signalwege besonders von Bedeutung zu sein. Ras wird normalerweise vor allem durch Wachstumsfaktoren aktiviert. In RA Fibroblasten hingegen bleibt Ras dauerhaft aktiviert. Noch ist unklar auf welche Weise diese Veränderung eine dauerhafte Transformation der Fibroblasten verursacht, doch scheint sie mit ihr in Verbindung zu stehen. Zusammenhänge werden in der Beteiligung der Ras/Raf/MAP-Kinase- und der Ras/PI3K/Akt-Kinase-Signalwege an der Aktivierung von Fibroblasten und in deren Quervernetzung gesehen. Die Ursachen der stabilen Aktivierung synovialer Fibroblasten sind jedoch noch weit komplexer. So konnte man somatische Mutationen innerhalb des p53-Gens nachweisen. Einige von ihnen hemmen seine Funktion, was wiederum eine erhöhte Aggressivität der von der Mutation betroffenen Fibroblasten bedingt. Des Weiteren zeigte sich, dass der Tumorsuppressor PTEN, der in Tumoren häufig gemeinsam mit p53 Veränderungen aufweist, in RA Fibroblasten in vermindertem Maß exprimiert wird.

Die Konsequenz der bis jetzt beschriebenen Veränderungen ist die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, deren Effektormoleküle Adhäsionsmoleküle, matrixzerstörende Enzyme und Inhibitoren des natürlichen Zelltods sind. Es wird insgesamt eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren aktiviert. Unter ihnen kommt jedoch NFκB die größte Bedeutung zu. NFκB ist nachweislich im RA Synovium hochaktiv. Es ist ursächlich für die Resistenz der RA Fibroblasten gegenüber Apoptose und es reguliert die Synthese von proinflammatorische Zytokinen, Adhäsionsmolekülen und die Matrix zerstörenden Enzymen.

RA Fibroblasten sind, wie gerade erwähnt, resistent gegenüber Apoptose. Sie sind nicht in der Lage auf Apoptose-auslösende Stimuli adäquat zu reagieren oder den bereits ausgelösten Zelltod zu vollenden. Neben den schon erwähnten Ursachen sind dafür Moleküle verantwortlich, die von RA Fibroblasten an der Invasionsfront überexprimiert werden. Zwei dieser Moleküle sind SUMO-1, ein kleines ubiquitinartiges Protein, und FLIP, ein Caspase-8-Gegenspieler. Sie lagern sich am Fas-Rezeptorkomplex an und hemmen so die durch Fas ausgelöste Apoptose.

Vorbedingung für die Zerstörung des Gelenkknorpels ist die Adhäsion der RA Fibroblasten. Sie wird durch spezifische Adhäsionsmoleküle, v.a. durch sog.

Integrine, vermittelt. RA Fibroblasten sind in der Lage verschiedene Integrine zu exprimieren. Die Adhäsion der Zellen an den Knorpel ist jedoch kein rein passiver Prozess. Die Integrine dienen hierbei auch als Rezeptoren und stimulieren die RA Fibroblasten.

Nicht zu vergessen ist die Rolle des Immunsystems bei der Entstehung der rheumatoiden Arthritis. Schließlich gilt die RA als eine Autoimmunerkrankung. CD4+ T-Zellen scheinen von besonderer Bedeutung zu sein. Anders als bei anderen Autoimmunerkrankungen, wie zum Beispiel der Multiplen Sklerose, ist noch nicht klar wie die T-Zell-Antigene, die für die Autoimmunantwort verantwortlich sind, aussehen. Kollagen II und Knorpelzell-gp39 sind genauso mögliche Kandidaten wie die ubiquitär vorkommenden Proteine BiP und Glukose-6-Phosphat-Isomerase (GPI). Paradoxerweise ist die T-Zell-Antwort bei Patienten mit aktiver RA erheblich eingeschränkt. Auch wenn der entzündliche Prozess mit diesem Paradoxon in Verbindung gebracht wird und man adaptative Mechanismen in Erwägung zieht, wird diese Reaktion noch kaum verstanden. Für eine Adaptation spricht, dass die Dämpfung der entzündlichen Prozesse durch Gabe von Antikörpern gegen TNF $\alpha$  die T-Zell-Funktion verbessern kann, was auf eine Funktionseinschränkung der T-Zellen in Folge der ständigen TNF $\alpha$ -Einwirkung schließen lässt. Diese Tatsache ließ sich auch in in-vitro Versuchen untermauern. Weiter ist eine eingeschränkte Thymusfunktion als mit verursachendes Element im Gespräch.

Ca. 30 % der Zellen im RA Synovium sind T-Zellen, die meisten von ihnen sind nachweislich aktiviert. Sie exprimieren Marker der Aktivierung. T-Zellen, die über eine Mixtur verschiedener Zytokine aktiviert werden reagieren anders als solche, die über ein einzelnes Antigen aktiviert werden. Die T-Zellen, die man aus RA Synovium isolieren kann verhalten sich so wie in-vitro durch Zytokine aktivierte T-Zellen. Sie induzieren TNF $\alpha$  in Makrophagen und dieses nutzt andere Signalwege, wie wenn es über Antigene induziert wird. [Feldmann, 2001; Müller-Ladner et Pap, 2005]

## 2.9 Common Variable Immunodeficiency (CVID)

Die "Common Variable Immunodeficiency" ist die häufigste Erkrankung mit einer angeborenen symptomatischen Immundefizienz. Bei allen Erkrankten lässt sich eine Hypogammaglobulinämie nachweisen. IgG, IgA und /oder IgM sind im Serum erniedrigt. Auch leiden alle Erkrankten unter einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber wiederkehrenden Infektionen. Sie betreffen besonders die Atemwege, aber auch den Gastrointestinaltrakt. CVID ist weiterhin mit dem vermehrten Auftreten von autoimmunen und neoplastischen Erkrankungen assoziiert. Männer und Frauen sind gleich häufig betroffen. Die Prävalenz der Erkrankung beträgt 1:10.000 bis 1:200.000.

Welcher Defekt primär für die verminderten Gammaglobuline verantwortlich ist, bleibt trotz zahlreichen Untersuchungen weiter unklar. Offensichtlich ist, dass CVID B-Zellen nicht in der Lage sind, sich vollständig auszudifferenzieren. Dies führt zu einer gestörten Immunglobulin-Sekretion. Nicht klar ist, ob der B-Zell-Defekt wirklich an erster Stelle der Pathogenese steht, oder ob er Folge einer gestörten T-Zell-Funktion ist. Die zweite Hypothese wird durch die Tatsache unterstützt, dass bei manchen CVID-Patienten eine HIV-Infektion zur Normalisierung der Immunglobulinwerte führt.

Bei CVID ist die Proliferation und Aktivierung der T-Zellen eingeschränkt. Außerdem ist ihre Reaktion auf Antigenkontakt und die Produktion verschiedener Zytokine verändert.

Des Weiteren ist die in-vitro Apoptoserate sowohl der B- als auch der T-Zellen bei CVID erhöht. Beide Zelllinien exprimieren vermehrt Fas und FasL. Auf T-Lymphozyten sind beide TNF-Rezeptoren vermehrt vorhanden, was die verstärkte Neigung zum programmierten Zelltod erklären könnte.

Ob nun die Fehlfunktion der T-Zellen auch wieder nur eine Folge einer noch unbekanntenen Ursache ist, oder ob es sich tatsächlich um einen molekularen Defekt innerhalb der Zellen handelt, ist ebenfalls offen. Defekte der Signaltransduktion in T-Zellen konnten in jedem Fall bereits beschrieben werden. Die T-Zellen sind nicht in der Lage auf Stimulation Inositol-Triphosphat zu synthetisieren. Ebenfalls wurde

eine verstärkte Aktivierung der Proteinkinase A1 zusammen mit erhöhten cAMP-Konzentrationen in CVID T-Lymphozyten beschrieben. Beides verhindert die Proliferation der T-Zellen und ihre Zytokinproduktion.

Insgesamt ist die CVID ein eher heterogenes Syndrom, das wahrscheinlich eine Gruppe verschiedener Störungen widerspiegelt. Die bereits bestehende Einteilung in Untergruppen hat sich bisher als eher unpraktikabel erwiesen. Trotzdem wurde bereits mehrmals eine Untergruppe beschrieben, in der neben den wiederkehrenden Infektionen andere Erscheinungen wie multisystemische Sarkoidose-ähnliche Granulome, Splenomegalie und Lymphadenopathie auftreten. Bei Patienten dieser Untergruppe ist häufig die CD4+/ CD8+-Ratio invertiert. Das resultiert entweder aus einer Verminderung der CD4+-Lymphozyten oder einer Vermehrung der CD8+-Lymphozyten, wobei gerade eine CD4+-Lymphopenie häufiger im Zusammenhang mit einer Splenomegalie beobachtet wird. Auf welche Weise diese Beobachtungen mit Symptomen wie der Splenomegalie und Lymphadenopathie zusammenhängen bleibt noch zu klären.

Bei der Untergruppe mit CD4+-Lymphopenie und Splenomegalie gibt es noch eine weitere Besonderheit auf molekularer Ebene. Schon mehrmals wurde CVID ganz allgemein mit den HLA-Klassen I und II in Verbindung gebracht. Interessanterweise liegt zwischen den Genen dieser beiden Klassen auf Chromosom 6 die HLA-Klasse III Region, die für verschiedene immunregulatorische Moleküle kodiert. Unter anderem befindet sich dort die für TNF $\alpha$  kodierende Sequenz. Eine schwache Assoziation der CVID mit einem Fragment-Längenpolymorphismus, der die TNF $\alpha$ -Funktion einschränkt, ist bekannt. Bei der beschriebenen Untergruppe kommt aber weiter hinzu, dass sowohl TNF $\alpha$  im Serum als auch die TNF-Rezeptoren in einem stark erhöhten Maß nachweisbar sind. In-vitro sezernieren CVID Monozyten aus dieser Untergruppe abnormal große Mengen an TNF $\alpha$ . Es ist zwar anzunehmen, dass diese Besonderheit auch für CVID-Patienten mit Granulomen gilt, die klinischen Daten reichen jedoch nicht aus um diesen Schluss zu ziehen.

Es bleibt offen ob die beschriebene abnormale TNF $\alpha$ -Produktion nur eine Reaktion auf andere zelluläre Veränderungen ist, oder ob sie ein Indikator dafür ist, dass eine genetisch determinierte Untergruppe der CVID existiert.

Mullighan und Mitarbeitern gelang es in einer Studie nachzuweisen, dass bei der CVID-Subgruppe mit Erscheinungen wie Splenomegalie und Granulomen ein ungewöhnliches TNF-Allel – TNF +488A – gehäuft vorkommt. Nimmt man die Tatsache hinzu, dass TNF, wie oben beschrieben in dieser Subgruppe eine besonders hohe Aktivität aufweist, gewinnt dieses Allel an Interesse. Es gibt zusätzlich einige Berichte, dass eine Cortisonbehandlung Granulome und Splenomegalie verbessert. All dies könnte darauf hinweisen, dass erhöhte TNF $\alpha$ -Konzentrationen mit verantwortlich für die Entstehung von Granulomen und Splenomegalie sind.

[Mullighan et al, 1997; and reviewed by Di Renzo et al. 2003]

## 2.10 Zielsetzung der Arbeit

Die Arbeitsgruppe um Arnold Levine, die den „single nucleotid Polymorphismus“ 309 erstmals beschrieb, untersuchte dessen Verteilung innerhalb der nordamerikanischen Bevölkerung in einer relativ kleinen Gruppe von 50 Freiwilligen. Ob diese Ergebnisse ohne weiteres auf die europäische Bevölkerung übertragbar sind wurde bisher nicht geklärt. Die vorliegende Arbeit sollte nun die Häufigkeit des Auftretens des Polymorphismus in der europäischen Bevölkerung mit Hilfe einer Stichprobe von 487 gesunden Blutspendern des Blutspendezentrums der Universität des Saarlandes untersuchen.

Des Weiteren soll untersucht werden, wie häufig der Polymorphismus bei an rheumatoider Arthritis bzw. CVID Erkrankten nachweisbar ist. Rheumatoide Arthritis und CVID sind zwei Erkrankungen, deren Pathogenese trotz zahlreicher klinischer und biologischer Untersuchungen weitgehend unklar ist. Man kennt verschiedene Faktoren, die an der Krankheitsentstehung beteiligt sind, doch bleiben alle bisherigen Modelle lückenhaft.

Vor allem die rheumatoide Arthritis betrifft mit einer Prävalenz von 0,5 % einen nicht geringen Teil der Bevölkerung und besitzt schon allein dadurch sowohl klinische als auch volkswirtschaftliche Relevanz.

Mit einer Prävalenz von 1:10.000 bis 1:200.000 ist die CVID zwar wesentlich seltener als die rheumatoide Arthritis, sie bleibt aber trotzdem die häufigste Erkrankung mit einer symptomatischen primären Immundefizienz. Die im Verlauf der Erkrankung nötige Therapie ist aufwändig und kostenträchtig. Auch verhindert sie nicht, dass im Laufe der Zeit sarkoidose-ähnliche Granulome, lymphoproliferative Störungen und sogar Lyphome auftreten können.

Ein besseres Verständnis der Entstehung beider Krankheiten könnte sowohl von großem therapeutischem als auch von volkswirtschaftlichem Nutzen sein.

Bei beiden Erkrankungen ist ein genetischer Einfluss auf ihre Genese bekannt. Untersuchungen zeigten, dass erhöhte Konzentrationen des Botenstoffs TNF $\alpha$  das Krankheitsbild einer rheumatoiden Arthritis induzieren können und, dass TNF $\alpha$  für

die Krankheit relevante Signalwege in Synovialzellen aktiviert. Weiterhin ist aus verschiedenen Untersuchungen bekannt, dass der über  $\text{TNF}\alpha$ -abhängige Signalwege aktivierte Transkriptionsfaktor  $\text{NF}\kappa\text{B}$  von zentraler Bedeutung für die Synthese der Zytokine ist, die die chronische Entzündung und Gelenkzerstörung aufrechterhalten. Auch bei der CVID werden ähnliche Zusammenhänge vermutet. So weiß man, dass innerhalb einer Untergruppe der Erkrankten, die neben wiederkehrenden Infektionen unter Splenomegalie, Lymphadenopathie und Granulomen leiden, ein  $\text{TNF}$ -Allel gehäuft nachgewiesen werden kann, das mit einer erhöhten  $\text{TNF}\alpha$ -Synthese assoziiert ist. Eine mögliche Schlussfolgerung aus dieser Beobachtung war deshalb, dass eine erhöhte  $\text{TNF}\alpha$ -Produktion und somit auch eine verstärkte  $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Induktion ursächlich für die neben den Infektionen zusätzlich auftretenden Erscheinungen sein könnte.

Ein wichtiger Gegenspieler des Transkriptionsfaktors  $\text{NF}\kappa\text{B}$  ist der Tumorsuppressor und Transkriptionsfaktor p53. In einer Studie zeigte sich, dass p53 auf verschiedenen Ebenen der Entzündungsreaktion als negativer Regulator derselben agiert. Wohl die größte Bedeutung hat hierbei, dass p53 die Transkription von Effektormolekülen antagonistisch zu  $\text{NF}\kappa\text{B}$  beeinflusst.

In Zellen ist p53 unter normalen Bedingungen nur in geringen Konzentrationen und in inaktivierter Form nachweisbar. Durch zellulären Stress induziert kann es akkumulieren und als Transkriptionsfaktor aktiv werden. Reguliert wird p53 durch seinen Gegenspieler Mdm2 und die Konzentration, in der dieser in Zellen vorliegt. Bei einem großen Teil der Menschen wird durch einen vererbten „single nucleotide polymorphism“ im Mdm2-Gen unter Stress vermehrt Mdm2-Protein synthetisiert. Dies bedeutet, dass die Funktion von p53 bei diesen Menschen in einem stärkeren Maß unterdrückt wird. Betätigt wurde diese Tatsache dadurch, dass Individuen aus dieser Gruppe signifikant häufiger unter verschiedenen Tumorerkrankungen leiden. P53 ist nun aber auch Antagonist des Transkriptionsfaktors  $\text{NF}\kappa\text{B}$ . So stellte sich die Frage, ob eine erhöhte Mdm2-Konzentration, die eine verminderte p53-Konzentration und -Funktion und auf diese Weise womöglich eine verstärkte Aktivierung von  $\text{NF}\kappa\text{B}$  bedingt, mit rheumatoider Arthritis und/oder der Entstehung von Granulomen, Lymphadenopathien und Splenomegalie bei CVID assoziiert ist.

Diese Erkrankungen wurden als Vertreter chronischer Erkrankungen ausgewählt, die mit einer erhöhten Aktivität des TNF-NF $\kappa$ B-Pfades in Verbindung gebracht werden. Unsere Hypothese lautete, dass rheumatoide Arthritis und Granulome, Lymphadenopathien und Splenomegalie bei COVID mit angeborenen erhöhten Mdm2-Leveln assoziiert sind. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, diese Hypothese zu untersuchen.

### 3 Material

#### 3.1 Chemikalien

Chemikalien (in Reinstform)	Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Seakem (Rockland, ME, USA), Sigma
-----------------------------	--

#### 3.2 Puffer

50x TAE-Puffer	Tris/HCl (pH 8,0)	2 M
	Eisessig	1 M
	EDTA	0,05 M
		ad pH 8,0
5x Ladepuffer für DNA-Agarosegelelektrophorese	EDTA	50 mM
	Glycerin	50 % (v/v)
	Bromphenolblau	0,25 % (w/v)

#### 3.3 Enzyme

Apek I

New England BioLabs (NEB)

Hot Start Taq- Polymerase

Quiagen

EcoR I

New England BioLabs (NEB)

### 3.4 DNA-Größen- und Molekulargewichtsmarker

Zur Bestimmung der Größe doppelsträngiger DNA- Fragmente wurden zwei verschiedene Marker verwendet:

- „1 kb Plus-DNA-Ladder“ der Firma Invitrogen

Der Marker eignet sich zur Bestimmung von Fragmentgrößen zwischen 0,1 und 12 kbp.

Fragmentgrößen (kbp): 12000 / 11000 / 10000 / 9000 / 8000 / 7000 / 6000 / 5000 / 4000 / 3000 / 2000 / 1650 / 1000 / 850 / 650 / 500 / 400 / 300 / 200 / 100

- „DNA Molecular Weight Marker VIII“ der Firma Roche Diagnostic GmbH Penzberg

Dieser zusätzliche Marker ist besonders geeignet zur Bestimmung der Fragmentgrößen zwischen 0.019 und 1.1 kpb.

Fragmentgrößen (kbp): 1114 / 900 / 692 / 501 / 489 / 404 / 320 / 242 / 190 / 147 / 124 / 110 / 67 / 37 / 34 / 34 / 26 / 19

### 3.5 Zelllinien

#### 3.5.1 T-47D-Zellen

Humane Mammakarzinom-Zelllinie, die 1974 von Keydar und Mitarbeitern durch die Punktion eines durch das Karzinom bedingten Pleuraergusses gewonnen und anschließend etabliert wurde [Keydar et al.,1979].

Die Zellen sind homozygot für den SNP309 (G/G) [Bond et al., 2004].

#### 3.5.2 Saos-2-Zellen

Es handelt sich um Zellen eines primär osteogenen Sarkoms, die 1973 als Zelllinie etabliert wurden [Fogh et al.,1975; Fogh et al. 1977 a/b].

Sie enthalten homozygot nicht den SNP309 (T/T) [Bond et al., 2004].

### 3.6 Medien und Lösungen für die Zellkultur

Mc Coy's 5A Medium	Gibco
Fötale Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories
Trypsin /EDTA- Lösung	PAA Laboratories
Puromycin (Stammlösung 1 mg/ml)	Sigma

### 3.7 EDTA- Blutproben

487 EDTA- Blutproben	Gesunde Blutspender	Blutspendezentrum an der Universität des Saarlandes Homburg
192 EDTA- Blutproben	Patienten nach den ACR Kriterien von 1987 diagnostizierter Rheumatoider Arthritis	Innere Medizin I an der Universität des Saarlandes, Homburg

### 3.8 DNA-Proben

52 DNA-Proben	Patienten mit den WHO- Kriterien-entsprechend diagnostizierter COVID	Universität Freiburg
---------------	--	----------------------

### 3.9 Lösungen zur DNA- Isolierung aus EDTA-Blut und Zellen

Die DNA- Extraktion aus EDTA –Blut und Zellen erfolgte mit Hilfe des QIAamp DNA Kit von Qiagen.

Proteinkinase K
Puffer AL
Waschpuffer AW I
Waschpuffer AW II
Puffer AE

### 3.10 Lösungen für die SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

1x Laufpuffer für SDS- PAGE	Tris	25 mM
	Glycin	192 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
		ad pH 8,3

### 3.11 Synthetische Oligonukleotide („Primer“)

Das folgende Primerpaar wurde eingesetzt:

Bezeichnung	Sequenz
MDM2_for	5`-CGG GAG TTC AGG GTA AAG GT- 3`
MDM2_rev	5` -AGC AAG TCG GTG CTT ACC TG- 3`

### 3.12 Elutionspuffer für DNA aus Acrylamidgelen

Ammoniumacetat	0,5 M
EDTA	1 mM
SDS	0,1%

### 3.13 Bakterienstämme

DH5 $\alpha$ -T1 rec A1 neg (Invitrogen)

### 3.14 Nährmedien zur Kultivierung von DH5α-T1

LB-Medium: Luria broth base (GIBCO)

LB-Platten: Luria's agar (GIBCO)

Zur Selektion wurde jeweils Ampicillin (Bayer/Leverkusen; 1000 µg/ml) in einer Endkonzentration von 1 µg/ml verwendet.

### 3.15 Vektoren

#### 3.15.1 Der pCR 2.1-TOPO-Vektor

An der mit PCR-Produkt markierten Stelle kann DNA eingebaut werden, die mit Taq Polymerasen amplifiziert wurde. Der Vektor exprimiert eine Ampicillin- und eine Kanamycinresistenz als Selektionsmarker. Er wurde von der Firma Invitrogen bezogen.

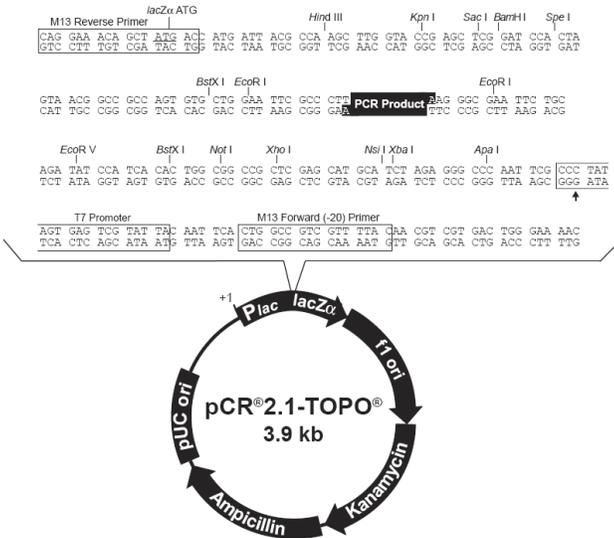


Abbildung 3.1: pCR 2.1 -TOPO

### 3.16 Lösungen zur präparativen Plasmid- DNA- Isolierung

Alle Plasmidaufreinigungen erfolgten mit dem „Plasmid DNA Purification“- Kit von Macherey- Nagel.

Puffer S1 (Resuspensionspuffer)	Tris/HCl	50 mM
	EDTA	10 mM
	RNAseA	100 µg/ml
		pH 8,0
Puffer S2 (Lysispuffer)	NaOH	200 mM
	SDS	1 %
Puffer S3 (Neutralisationspuffer)	Kac	2,8 M pH 5,1
Puffer N2 (Äquibrierungspuffer)	Tris	100 mM
	Ethanol	15 %
	KCl	900 mM
	Triton X-100	0,15 %
		ad pH 6,3 mit H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
Puffer N3 (Waschpuffer)	Tris	100 mM
	Ethanol	15 %
	KCl	1,15 M
		ad pH 6,3 mit H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
Puffer N5	Tris	100 mM

(Elutionspuffer)	Ethanol	15 %
	KCl	1 M
		ad pH 8,5 mit H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>

### 3.17 Materialien für die Zellkultur

6- Lochplatten	Corning Costar
12- Lochplatten	Corning Costar
24- Lochplatten	Corning Costar
Zellkulturflaschen 75 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio one
Zellkulturflaschen 25cm <sup>2</sup>	Greiner Bio one
Zellkulturschalen 10 cm	Corning Costar
Zellschaber	Greiner Bio one

### 3.18 Sonstige Materialien

Membranen

PVDF-Immobilon-Membran, Millipore

Polypropylen- Röhren

Greiner

### **3.19 Computersoftware**

Die Arbeit wurde mit dem Textverarbeitungsprogramm Windows XP Word (Microsoft) erstellt. Die Abbildungen wurden mit Hilfe des Programmes Open Office und Windows Office (Microsoft) hergestellt. Für die Statistik wurde das Programm SPSS verwendet.

## 4 Methoden

Unter diesem Gliederungspunkt wird die Methodik beschrieben, wie sie laborintern im Institut der Virologie und im José-Carreras-Zentrum der Inneren Medizin I der Universität der Saarlandes, Homburg gehandhabt wird. Teile dieses Abschnittes sind an zuvor im virologischen Institut entstandene Diplom- und Doktorarbeiten angelehnt.

### 4.1 Zellkulturtechniken

#### 4.1.1 Kultivierung von T-47-D-Zellen

Kultiviert werden T-47-D-Zellen in „Dulbecco`s Minimal Essential Medium“. Beim Wachstum in Zellkulturflaschen haften die Zellen am Flaschenboden und bilden Monolayer. Mit Hilfe von Calcium- und Magnesium-freier EDTA-Thyrode-Lösung lösen sich die Zellen nach 20-minütiger Inkubation bei 37°C vom Flaschenboden ab. Danach werden die Zellen im Verhältnis 1:4 mit frischem Medium verdünnt und auf neue Kulturflaschen verteilt.

Die Kulturen wurden je nach Dichte des Zellrasens alle zwei bis drei Tage unter sterilen Bedingungen an der Sicherheitswerkbank gesplittet.

#### 4.1.2 Kultivierung von SAOS-2-Zellen

Saos-2-Zellen werden in McCoys 5A Medium kultiviert. Dem Medium wird 15% fötales Kälberserum hinzugefügt. Die Zellen sind Oberflächen-adhärenent und wachsen bei einer Temperatur von 37°C unter Zuführung von 5% CO<sub>2</sub>. Am Boden der Zellkulturflasche breiten sie sich in Form eines Monolayer aus.

Alle zwei bis drei Tage wird die Zellkultur im Verhältnis 1:2 bis 1:3 gesplittet. Hierfür werden die SAOS-2-Zellen mit Trypsin und EDTA vom Flaschenboden gelöst mit neuem Medium verdünnt und in neue Zellkulturflaschen überführt. Das

Splitten der Zellkultur findet unter sterilen Bedingungen an der Sicherheitswerkbank statt.

[Zelllinienverzeichnis: [www.DSMZ.de/human and animal cell lines](http://www.DSMZ.de/human%20and%20animal%20cell%20lines)]

#### **4.2 DNA-Extraktion aus EDTA-Blut und eukaryotischen Zellen**

DNA wurde sowohl aus Blut als auch aus Zellen mit Hilfe des QIAamp® DNA Mini Kit und nach der von der Firma mitgelieferten Anleitung extrahiert. Die Extraktion liefert bei einem Elutionsvolumen von 100 µl im Durchschnitt 62,5 ng/µl DNA, bei einem Elutionsvolumen von 200 µl im Durchschnitt 34.0 ng/µl DNA. Die gewonnene DNA-Menge kann durch mehrmaliges Wiederholen der Elution erhöht werden.

Zu Beginn der Extraktion wurden 20 µl Proteinkinase K in 1,5 ml Mikrozentrifugen-Behälter pipettiert. Zur Proteinkinase K wurden 200 µl EDTA-Blut bzw. 200 µl in PBS gelöste Zellen hinzu gegeben. Weiter wurden 200 µl des Puffers AL zugefügt. Damit die Zellen lysiert werden können, ist es von großer Bedeutung, dass der Puffer und die Proben ein homogenes Gemisch bilden. Deshalb wurden die Proben 15 sec gevortext, bevor sie über 10 min im Wasserbad bei 56°C inkubiert wurden. Danach wurden die Proben kurz zentrifugiert (Tischzentrifuge), um etwaige Tropfen vom Deckel der Behälter zu entfernen. 200 µl Ethanol wurden den Proben zugegeben und die Lösung erneut durch vortexen homogenisiert. Dabei am Deckel der Behälter hängengebliebene Tropfen wurden wiederum durch Zentrifugieren des Gemisches entfernt. Die Lösung wurde nun auf die DNA-bindenden Säulen, die sich in 2 ml Mikrozentrifugen-Behältern befanden, gegeben und bei 8.000 rpm über 1 min zentrifugiert. Die abzentrifugierte Flüssigkeit wurde verworfen. Die Säulen wurden in frische Behälter überführt, 500 µl des Waschpuffers AW I wurde auf die Säulen gegeben und der Waschpuffer 2 min bei 8.000 rpm abzentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde erneut verworfen und die nun bereits einmal gereinigten Säulen in neue Behälter überführt. Für einen zweiten Waschschrift wurden 500 µl des Waschpuffers

AW II auf die Säulen gegeben und über 2 min bei maximaler Umdrehungszahl mit der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde verworfen und die Säulen in Behältern ein weiteres Mal für 1 min zentrifugiert, um mögliche Ethanol-Rückstände endgültig von den Säulen zu entfernen. Danach wurden die Säulen in Eppendorf-Gefäße überführt. Es wurden 100-200 µl Elutionspuffer auf die Säulen gegeben. Die DNA wurde nun durch 1-minütiges Zentrifugieren bei 8.000 rpm durch den Elutionspuffer von den Säulen gelöst und im Eppendorf-Gefäß gesammelt. Die Proben wurden im Kühlschrank bei -6°C gelagert, ein Aliquot bei -20°C weggefroren.

### 4.3 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine „in vitro“ Methode zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente aus einem Fragmentgemisch beziehungsweise aus dem Gesamtgenom. Entscheidend für das Verfahren ist die Fähigkeit von DNA-Polymerasen, ausgehend von einem als Matrize (Template) dienenden DNA-Einzelstrang, einen neuen komplementären Strang zu synthetisieren.

Zu Beginn der Amplifikation wird die noch als Doppelstrang vorliegende DNA bei 94°C denaturiert („Melting“), d.h. in Einzelstränge aufgetrennt. Wird für die PCR eine „Hot Start Taq-Polymerase“ verwendet, wie in der vorliegenden Versuchsreihe, ist vor der Denaturierung der DNA-Doppelstränge noch die initiale Aktivierung des Enzyms bei 95°C von Nöten.

Nach der Auftrennung der DNA-Doppelstränge wird der Reaktionsansatz abgekühlt, so dass sich synthetische Oligonukleotide („Primer“), die eine jeweils zu einem Teil der beiden Einzelstränge komplementäre Nukleotidabfolge besitzen, an das Template lagern können („Annealing“). Die Primer werden so gewählt, dass durch sie der Anfang und das Ende der zu amplifizierenden Sequenz festgelegt wird. Auf welche Temperatur der Reaktionsansatz abgekühlt werden muss, ist abhängig von der

Sequenz der Primer, genauer gesagt von ihrem CG-Gehalt. In diesem Fall betrug die Annealing-Temperatur 62°C.

Im letzten Schritt der Polymerase-Kettenreaktion synthetisiert die Taq-Polymerase ausgehend von den freien 3`-OH-Enden der an die Templates gebundenen Primer neue DNA-Doppelstränge, indem sie die im Ansatz enthaltenen Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs) anknüpft („Extension“). Die Länge der entstandenen Doppelstränge ist nach dem ersten Zyklus noch nicht einheitlich, da nur die Ausgangspunkte der DNA-Synthese durch die beiden Primersequenzen festgelegt werden, nicht aber der Punkt an dem die Synthese endet. Im zweiten Reaktionszyklus werden die neu entstandenen Doppelstränge nun aber selbst zu Matrizen und hybridisieren mit den Primern. Es entstehen erstmals DNA-Doppelstränge deren Anfangs- und Endpunkt durch die Primer definiert sind. In weiteren Reaktionszyklen wird die gewünschte Sequenz exponentiell vermehrt. Der Reaktionsansatz wird mit ihr angereichert. [Löffler et Petrides, 1998, S 229ff]

Zur Amplifikation der gewünschten Sequenz wurden in diesem Fall 45 Zyklen durchlaufen.

Für die PCR wurde der Thermocycler PTC-200 der Firma MJ Research eingesetzt. Die Ansätze wurden nach folgendem Schema in 500 µl Gefäße pipettiert:

**Tabelle 4.1: Pipettierschema der PCR**

PCR-Komponenten	Eingesetzte Volumina	Endkonzentration
Reaktionspuffer (10x)	5 $\mu$ l	1x
5`-Primer (2,5 $\mu$ M)	1 $\mu$ l	0,05 $\mu$ M
3`-Primer (2,5 $\mu$ M)	1 $\mu$ l	0,05 $\mu$ M
dNTPs (je 10 mM)	je 1 $\mu$ l	je 0,2 mM
Hot Start Taq-Polymerase (5U/ $\mu$ l)	0,2 $\mu$ l	0,02 U/ $\mu$ l
Template-DNA	2 $\mu$ l ad 50 $\mu$ l mit sterilem Aqua dest.	

**Tabelle 4.2: Profil des verwendeten PCR-Programms**

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Reaktionszyklen
Enzymaktivierung	95°C	15 min	1
Vorlauf	94°C	2 min	1
Denaturierung	94°C	1 min	45
Anealing	62°C	1 min	
Extension	72°C	1 min	
Letzte Synthese	72°C	5 min	1
Kühlen	4°C	$\infty$	1

#### 4.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Mit dem biochemischen Verfahren der Elektrophorese werden geladene Moleküle innerhalb eines elektrischen Feldes aufgetrennt. DNA-Moleküle sind bei neutralen pH- Wert negativ geladen und wandern deshalb innerhalb eines elektrischen Feldes zur Anode. Die Geschwindigkeit mit der sich DNA-Fragmente zur Anode bewegen ist abhängig von ihrem Molekulargewicht. Fragmente mit einem höheren Molekulargewicht wandern langsamer, Fragmente mit einem niedrigeren Molekulargewicht schneller. Dieses Verhalten nutzt man zur Auftrennung eines DNA-Fragmentgemisches der Fragmentgröße nach. Die Genauigkeit der Auftrennung richtet sich hierbei nach der Porengröße des verwendeten Agarosegels. Um Fragmente zwischen 0,1 kb und 2 kb gut von einander zu trennen sind 2 % Agarosegele besonders geeignet.

#### 4.5 Agarosegelelektrophorese doppelsträngiger DNA

##### 4.5.1 Herstellung von Agarosegelen

Für ein Agarosegel werden 9 g Agarose in 450 ml 1x TAE-Puffer aufgenommen. Die Lösung wird im Mikrowellenherd bei 750 Watt aufgekocht. Unterbrochen von Schütteln wird sie weiter erhitzt bis sich die Agarose vollständig gelöst hat. Der Ansatz wird jetzt langsam abgekühlt. Hat er eine Temperatur von ca. 55°C erreicht, werden 23 µl des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid (10 mg/ml) zupipettiert. Ethidiumbromid interkaliert mit DNA und macht die im Gel aufgetrennten Fragmente unter UV-Licht als orangefarbene Banden sichtbar. Die Lösung wird in eine vorbereitete Gelkammer gegossen. Nach dem Festwerden wird sie vor Austrocknung durch eine Folie geschützt bei 4°C gelagert.

#### 4.5.2 Agarosegelelektrophorese

Den DNA-Proben, die mittels Elektrophorese aufgetrennt werden sollen (10 µl/Tasche), wurden jeweils 2 µl Blaumarker hinzugefügt. Der Blaumarker markiert die Lauffront. Zusätzlich erhöht das enthaltene Glycerin die Probedichte und inaktiviert unter Umständen noch enthaltene Enzyme. In die erste Geltasche wurden 10 µl des DNA-Größenmarkers (1 kb Plus-DNA-Ladder) pipettiert, in die folgenden Geltaschen wurden die DNA-Proben gefüllt.

Durch Anlegen eines elektrischen Feldes (120 V; 1 h) wandern die Proben im Gel Richtung Anode und trennen sich entsprechend ihrer molekularen Größe auf. Nach Abschluss der elektrophoretischen Auftrennung werden die DNA-Fragmente unter UV-Licht als Banden sichtbar gemacht und das Ganze mit einer Kamera (Bildauswertesystem, MWG-Biotech) festgehalten.

Der Versuch wurde angewandt, um die Reinheit der zuvor durchgeführten PCR zu überprüfen. Als Negativproben wurden zwei PCR-Proben, denen vor der PCR anstatt DNA steriles Wasser zugefügt wurde, verwendet.

#### 4.6 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die eine spezifische Basensequenz mit einer Länge von meist 4-8 bp (Palindrom) innerhalb beider Stränge eines DNA-Moleküls erkennen und es an dieser Stelle oder in einem definierten Abstand zu dieser Stelle spalten. Die Enzyme wurden unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen sowohl in Bezug auf die eingesetzten Puffer, als auch auf die Temperatur, unter der der Verdau ablief, verwendet. Je Ansatz wurde 1 µl Enzym eingesetzt. Durch Zugabe von Bromphenolblau wurde der Verdau beendet. Die entstandenen Fragmente wurden anschließend mit Hilfe einer SDS-Polyacrylamidelektrophorese bzw. einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt.

#### 4.7 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Normalerweise wird eine SDS-PAGE zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen eingesetzt. Wir nutzten die Methode zur Auftrennung von DNA-Fragmenten deren Größe sich nur um wenige Basenpaare voneinander unterschied. Das negativ geladene SDS ist im Gel im Überschuss vorhanden. Es lagert sich in einem konstanten Gewichtsverhältnis an die hydrophoben Regionen der DNA-Moleküle an und kompensiert so, dass die DNA-Moleküle bei leicht basischen Verhältnissen nicht vollständig negativ geladen sind. Die Fragmente wandern, wird eine Spannung angelegt, zur Anode. Ihre Beweglichkeit im elektrischen Feld entspricht der linearen Funktion zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes.

Die Gelmatrix entsteht durch die Polymerisation von Acrylamid und die gleichzeitige Quervernetzung mit N,N'-Methylenbisacrylamid. Ammoniumpersulfat (APS) dient zum Starten und N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) katalysiert die Polymerisationsreaktion. Je nach eingesetzter Acrylamid- und Bisacrylamidkonzentration verändert sich die Porengröße des Gels und somit auch die Auftrenneigenschaften.

Mit Hilfe von DNA-Größenmarkern (1 kb-Plus-DNA-Ladder und Marker VIII), die in den ersten beiden Geltaschen parallel zu den DNA-Fragmenten liefen, konnte die Fragmentgröße der geschnittenen DNA bestimmt werden.

**Tabelle 4.3: Pipettierschema für ein 15 % SDS-Gel**

Gelkomponenten	Eingesetzte Volumina
1M Tris pH 8,8	12 ml
30% Acrylamid	18 ml
2% Bis-Acrylamid	7,4 ml
10% SDS	640 µl
APS	280 µl
TEMED	28 µl

Im Rahmen dieser Arbeit kamen 15 %ige Polyacrylamid-Trenngele zum Einsatz. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Voltzahl von 220 V über 1½ Stunden.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der DNA-Fragmente wurde das Gel 30 min in Ethidiumbromid (5 µg/ml) angefärbt und anschließend 15 min in 1xTAE-Puffer gewaschen. Mit Hilfe von UV-Licht wurden die DNA-Fragmente als Banden sichtbar gemacht und mit einer Kamera (Bildauswertesystem, MWG-Biotech) dokumentiert.

#### **4.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus SDS-Gelen**

Um DNA-Fragmente aus einem SDS-Gel zu isolieren verwendet man einen Elutionspuffer, der sich aus 0,5 M Ammoniumacetat, 1 mM EDTA und 0,1 % SDS zusammensetzt. Das ausgeschnittene Gelstück und der Elutionspuffer werden bei 37°C inkubiert. Die Länge der Inkubationszeit richtet sich nach der Länge des DNA-Fragments, das aus dem Gel isoliert werden soll. Bei einer Größe von 250 bp wird 2-3 h inkubiert, bei einem größeren Fragment über Nacht. Die Lösung wird mit zweifachem Volumen Ethanol 2x präzipitiert.

#### **4.9 Ligation von DNA-Fragmenten**

Damit eine Ligation möglich ist, müssen die Enden der zu ligierenden Fragmente kompatibel sein. Wird eine DNA-Sequenz mit Hilfe einer Taq-Polymerase amplifiziert, hängt an beiden Enden der Sequenz das Nukleotid Adenosin über. Der eingesetzte pCR®2.1-TOPO®-Vektor besitzt an der für die Ligation vorgesehenen Stelle jeweils ein überhängendes Thymidin, so dass sich das PCR-Produkt perfekt einpassen kann.

1 µl PCR-Produkt wurden zusammen mit 1 µl destilliertem, sterilen Wasser, 0,5 µl Salt Solution (Topo Ta Cloning® Kit, Invitrogen) und 0,5 µl des Vektors 5 min lang

bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ligationsansatz kann direkt mit kompetenten DH5 $\alpha$ -Bakterien transformiert werden. Zur Überprüfung der Integration des PCR-Produktes in den Vektor kann man einen ECOR I- Verdau durchführen.

#### 4.10 Transformation kompetenter Bakterien

Unter Transformation versteht man die Einschleusung freier, löslicher DNA in vorbehandelte, kompetente Bakterien (DH5 $\alpha$ ). Dadurch, dass Bakterien mit bestimmten Salzlösungen vorbehandelt werden, wird ihre DNA- Aufnahmefähigkeit erhöht.

Die in die Bakterien aufgenommene Plasmid-DNA kann dort repliziert werden, vorausgesetzt sie ist ringförmig und enthält einen Replikationsursprung („ORI“). Im Plasmid ist Antibiotikaresistenzgen enthalten. Auf diese Weise ist es möglich, die transformierten Bakterien zu selektionieren.

Für die Transformation wurde der Ligationsansatz aus 3.12 10 min bei 65°C erwärmt. Gleichzeitig wurden die kompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut. Die 4  $\mu$ l Ligationsansatz wurden zu 80  $\mu$ l der Bakteriensuspension gegeben und der gesamte Ansatz 30 min auf Eis inkubiert. Dies dient dazu, dass sich die Plasmide an die Bakterienzellen anlagern können. Anschließend wird die Suspension für 30-90 sec in einem 42°C warmem Wasserbad einem Hitzeschock ausgesetzt. Die DNA kann in dieser Zeit in die Bakterienzellen aufgenommen werden. In einem nächsten Schritt wurden 25  $\mu$ l SOC-Medium zum Ansatz hinzu gegeben. Die gesamte Lösung wurde dann weitere 30 min bei 37°C unter ständigem Schütteln inkubiert. Schließlich wurde der Transformationsansatz auf vorbereiteten Agar-Platten ausplattiert. Die Agar-Platten enthielten das zur Selektion der transformierten Bakterien nötige Antibiotikum Ampicillin. Die auf Platten ausplattierten Bakterien konnten über Nacht bei 37°C wachsen.

#### 4.11 Kultivierung von Bakterien

Die Bakterien wurden zur Selektion der plasmidtragenden Bakterien auf LB-Agarplatten, die zusätzlich das Antibiotikum Ampicillin enthalten, ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Suspensionskulturen von DH5 $\alpha$  wurden ausgehend von einer Bakterienkolonie oder einer Stammlösung angelegt. Hierfür wurden die Bakterien in 150 ml Ampicillin-enthaltendes LB-Medium überführt. Die Kulturen wurden unter Schütteln für 12-16 h bei 37°C inkubiert. 900  $\mu$ l der Suspensionskultur wurden mit 100  $\mu$ l DMSO versetzt und bei -75°C aufbewahrt.

#### 4.12 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

##### 4.12.1 Analytische Plasmid-DNA-Isolierung (Minipräparationen)

Minipräparationen wurden zur schnellen Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien verwendet. Sie liefern zwar nur geringe DNA-Mengen, doch nutzt man sie, um mittels einer Agarosegelelektrophorese kontrollieren zu können, ob die in die Bakterien aufgenommenen Plasmide die zu erwartende Größe besitzen.

1,5 ml der Übernachtskultur wurden hierfür bei 5.000 rpm über 5 min mit der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in einem Rest-Medium resuspendiert. In einem nächsten Schritt wurden 300  $\mu$ l Tens-Puffer und ohne vorheriges invertieren sofort 150  $\mu$ l Na-Acetat (pH 5,2) zugegeben. Die Lösung wurde nun 4 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, 800  $\mu$ l eiskaltes 100 % Ethanol hinzugefügt und invertiert. Die Lösung wurde als nächstes für mindestens 5 min bei 4°C und 13.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Optional ist ein zwischengeschalteter Waschschrift. Für diesen werden nochmals 800  $\mu$ l eiskaltes, jedoch nur 70 % Ethanol auf das Pellet gegeben und die Lösung erneut für 5 min bei

4°C und 13.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet getrocknet und in 20-50 µl TE + RNase aufgenommen.

TENS-Puffer	1x TE	
	NaOH	0,1 M
	SDS	0,5 %

TE-Puffer	Tris/HCl (pH 8,0)	10 mM
	EDTA (pH 8,0)	1 mM

#### 4.12.2 Präparative Plasmid-DNA-Isolierung

Wurden größere Mengen an Plasmid-DNA benötigt, wie z.B. um eine Sequenzierung zu ermöglichen, wurde die Aufbereitung mittels alkalischer Lyse und Ionenaustauschromatographie an Nucleobond®-Säulen (Marchery-Nagel) nach der von der Firma mitgelieferten Anleitung durchgeführt.

Mit Hilfe der Nucleobond®-Säulen (AX 100) ist es möglich, aus 100 ml Bakterienkultur 20-100 µl Plasmid-DNA zu isolieren.

Die Übernachtskultur der plasmidtragenden Bakterien wurde bei 4°C und 5.000 rpm über 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Pellet in 4 ml Puffer S1 resuspendiert. Zusätzlich wurden 4 ml des Puffers S2 zugefügt und der Ansatz vorsichtig gemischt. Der Ansatz wurde in Folge 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Puffer ist SDS enthalten. Es löst die Bakterienzellwände und -membranen auf und führt zur Freisetzung der Zellbestandteile. Das ebenfalls enthaltene NaOH dient der Denaturierung der chromosomalen und der Plasmid-DNA, sowie der Proteine. Als nächster Schritt wurden 4 ml Puffer 3 zugegeben und der Ansatz über 5 min auf Eis inkubiert. Dieser Schritt dient der Neutralisation des Lysats. Die kleinere kovalent, geschlossene Plasmid-DNA kann wieder renaturieren und bleibt so in Lösung. Die chromosomale

Bakterien-DNA präzipitiert. Der Ansatz wurde nun bei 4°C und 13.000 rpm über 25 min abzentrifugiert, durch einen Papierfilter filtriert und anschließend auf die zuvor mit 2,5 ml Puffer N2 äquilibrierte Nucleobond®-Säulen gegeben. Die Salz- und pH-Bedingungen im Lysat bedingen, dass nur die Plasmid-DNA an den Säulen binden kann. Die Säule wird zur Entfernung der Proteine zweimal mit 5 ml Puffer N3 gewaschen. Mit 5 ml Puffer N5 wird die DNA eluiert und mit 3,5 ml Isopropanol (100 %) und unter Zentrifugation (13.000 rpm, 1h, 4°C) gefällt. Der Überstand wird verworfen. Das erhaltene Pellet mit 2 ml eiskaltem Ethanol (70%) gewaschen, getrocknet und in 50 µl Wasser aufgenommen.

#### **4.13 Spektrometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Mit Hilfe der Absorptionsspektroskopie ist es möglich, die Nukleinsäurekonzentration einer Lösung zu bestimmen. Nukleinsäuren absorbieren ultraviolettes Licht der Wellenlänge 250-270 nm, wobei einzelsträngige DNA Licht 1,4-mal stärker absorbiert als doppelsträngige DNA (hyperchromer Effekt). Wird bei einer Wellenlänge von 260 nm eine optische Dichte von 1,0 (Schichtdicke der Küvette: 1 cm) gemessen, entspricht das bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50 µg/ml, bei einzelsträngiger DNA einer Konzentration von 40 µg/ml und bei einzelsträngigen Oligonukleotiden einer Konzentration von 33 µg/ml.

Zur Messung wurde die DNA-Lösung mit Aqua dest. im Verhältnis 1:1000 verdünnt. Es wurde das Photometer Ultrospec 3000 der Firma Pharmacia Biotech eingesetzt. Zum Nullabgleich wurde Aqua dest. verwendet.

#### 4.14 Statistische Methodik

Mit den tabellarisch aufgeführten Werten wurden Kreuztabellen erstellt. Die statistische Signifikanz wurde mittels des  $\chi^2$ -Testes und bei kleinen Fallzahlen des „Fisher`s exakten Testes“ überprüft. Das Signifikanzniveau wurde auf 5 % festgelegt.

## **5 Ergebnisse**

### **5.1 Zusammengefasste Zielsetzung der Arbeit**

Die Arbeitsgruppe um Arnold Levine, die den „single nucleotid Polymorphismus“ 309 erstmals beschrieb, untersuchte dessen Verteilung innerhalb der nordamerikanischen Bevölkerung in einer relativ kleinen Gruppe von 50 Freiwilligen. Ob diese Ergebnisse ohne weiteres auf die europäische Bevölkerung übertragbar sind, wurde bisher nicht geklärt. Die vorliegende Arbeit sollte die Häufigkeit des Auftretens des Polymorphismus in der europäischen Bevölkerung mit Hilfe einer Stichprobe von 487 gesunden Blutspendern des Blutspendezentrums der Universität des Saarlandes untersuchen.

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob rheumatoide Arthritis und die Entstehung von Granulomen, Lymphadenopathie und Splenomegalie im Rahmen einer CVID, mit SNP309 in Zusammenhang steht. Unsere Hypothese lautete, dass rheumatoide Arthritis und Granulome, Lymphadenopathie und Splenomegalie bei CVID mit angeborenen erhöhten Mdm2-Leveln assoziiert sind.

### **5.2 Etablierung der Methodik**

Um die Variation der Mdm2-Sequenz im Bereich des „single nucleotid Polymorphismus“ zu untersuchen, wurde von den Erstbeschreibern ein 300 bp langes Stück DNA amplifiziert und sequenziert. Die DNA wurde aus von 50 gesunden Freiwilligen zu Verfügung gestellten Proben extrahiert [Bond et al., 2004].

Die vorliegende Arbeit sollte die Häufigkeit des Auftretens des SNP 309 innerhalb einer wesentlich größeren Stichprobe Europäer verifizieren und sie mit derjenigen bei rheumatoider Arthritis und Granulomen, Lymphadenopathie und Splenomegalie im Rahmen einer Erkrankung an CVID vergleichen. Hierzu war es sowohl

kostentechnisch als auch den Zeitaufwand betreffend von Nöten, den Polymorphismus ohne Sequenzierung analysieren zu können.

Durch visuelle und computergestützte Inspektion konnten wir eine Restriktionsenzym-Schnittstelle, die SNP309 darstellen kann, identifizieren.

Die zu untersuchende DNA wurde aus EDTA-Blutproben bzw. Zelllösungen extrahiert, eine 352 bp lange DNA-Sequenz, innerhalb der der Polymorphismus lokalisiert ist, mittels PCR amplifiziert. Die Länge der amplifizierten Sequenz und die Reinheit des Amplifikats wurden in Folge mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese kontrolliert. Ein speziell von den New England Biolabs (NEB) zur Verfügung gestelltes Enzym, das kommerziell nicht erhältlich war, wurde nun eingesetzt, um das Molekül abhängig vom Polymorphismus zu fragmentieren.

Das Restriktionsenzym ApeKI spaltet DNA-Sequenzen zwischen den Nukleosiden G und C. Im Fall des T-Genotyps befinden sich in der 325-bp-langen Sequenz zwei charakteristische Schnittstellen. Es entstehen drei Fragmente mit der Länge 248 bp, 68 bp und 36 bp. Der G-Genotyp hingegen weist durch den Austausch des Nukleosids Thymin zu Guanin eine zusätzliche Schnittstelle auf, so dass insgesamt 4 Fragmente (248 bp, 57 bp, 11 bp, 36 bp) entstehen (Abb.5.1A). Entscheidend für die Analyse ist die 68 bp-Sequenz, die den T-Genotyp und die 57 bp-Sequenz, die den G-Genotyp identifiziert. Beide lassen sich gut auf einem Polyacrylamidgel darstellen.

Zur Kontrolle der Fragmentlängen verwendeten wir amplifizierte DNA aus Saos-2-Zellen und T-47-D-Zellen. Erstere enthalten homozygot den T-Genotyp, zweitere homozygot den G-Genotyp (Abb.5.1B).

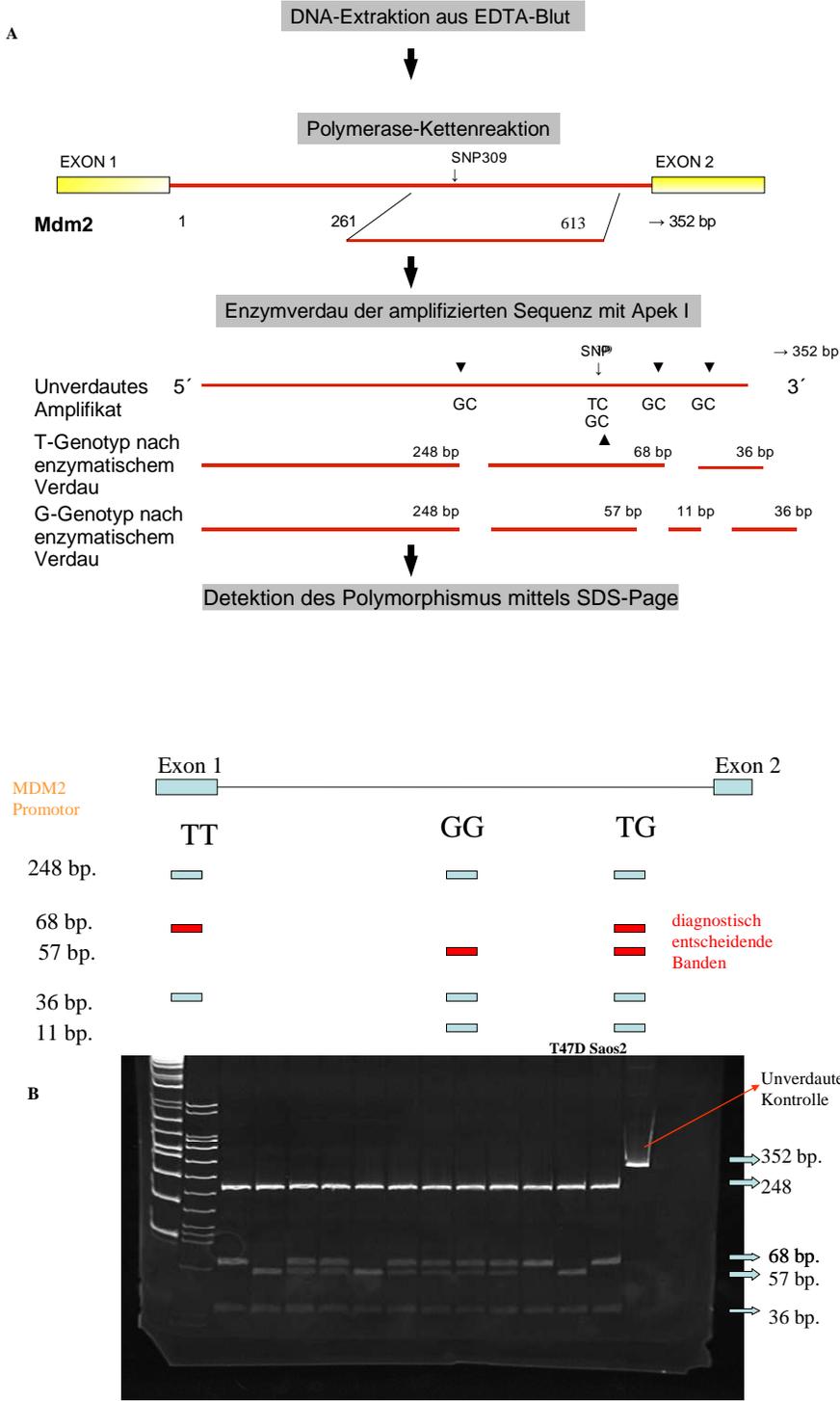


Abbildung 5.1: Darstellung der Methodik im Fließdiagramm

### 5.3 Verteilung des Mdm2-Polymorphismus SNP309 in der europäischen Bevölkerung

Innerhalb der Population von 517 gesunden Blutspendern des Blutspendezentrums der Universität des Saarlandes zeigte sich folgende Verteilung des Mdm2 Polymorphismus SNP309:

**Tabelle 5. 1 :Distribution des SNP309 in der Normalbevölkerung**

	Mdm2			Gesamt
	T/T	G/T	G/G	
Anzahl	178	240	69	487
% von Gruppe	36,6 %	49,3 %	14,2 %	100,0 %

Der homozygote Genotyp T/T ließ sich in den 487 Proben 178-mal nachweisen. Dies entspricht einem prozentualen Anteil von 36,6 %. 69 der untersuchten Proben enthielten homozygot den „single nucleotid Polymorphismus 309“ (G/G). In Prozentzahlen ausgedrückt entspricht das 14,2 %. Heterozygot wurde SNP309 in 240 Proben nachgewiesen, was einem Anteil von 49,3 % gleichkommt.

Schlüsselt man die Ergebnisse weiter geschlechtsspezifisch auf, ergibt sich die in Tabelle 5.2 dargestellte Verteilung.

Tabelle 5.2: geschlechtsspezifische Distribution

Geschlecht		Mdm2			Gesamt
		T/T	G/T	G/G	
männlich	Anzahl	118	147	41	306
	% von Gruppe	38,6 %	48,0 %	13,4 %	100,0 %
weiblich	Anzahl	60	93	28	181
	% von Gruppe	33,1 %	51,4 %	15,5 %	100,0 %

Die geschlechtsspezifischen Prozentzahlen entsprechen mit 38,6 % (männlich) und 33,1 % (weiblich) für den Genotyp T/T, 48,0 % (männlich) und 51,4 % (weiblich) für den Genotyp G/T und 13,4 % (männlich) und 15,5 % (weiblich) für den Genotyp G/G weitgehend den in der Gesamtpopulation ermittelten Werten ( T/T: 36,6 %, G/T: 49,3 %, G/G: 14,2 %). Die aufgetretenen Differenzen in der Verteilung sind mit einem p-Wert von 0,464 nicht signifikant.

Die empirisch ermittelte Genotypfrequenz entspricht annäherungsweise, der nach der Hardy-Weinberg-Regel [siehe Koeke et al., 2000 S 281] zu erwartenden Genotypfrequenz innerhalb großer Populationen.

$$p(A) + q(B) = 1$$

$$p^2(A/A) + 2pq(A/B) + q^2(B/B) = 1$$

wobei A= Allel 1

und B= Allel 2

$$p(T) + q(G) = 1$$

$$p^2(T/T) + 2pq(T/G) + q^2(G/G) = 1$$

$$p^2 = 0,366 \Rightarrow p \approx 0,605$$

$$q = 1 - p = 1 - 0,605 = 0,395$$

$$\Rightarrow q^2 \approx 0,156$$

$$2pq = 2 \times 0,395 \times 0,605 \approx 0,478$$

Der aus der Allelfrequenz p (T) mit Hilfe des Hardy-Weinberg-Gesetzes errechneten Wert für  $q^2$  (G/G) entspricht mit 15,6 % näherungsweise dem Wert von 14,2 %, der sich in unserer Blutspenderpopulation nachweisen ließ. Gleiches gilt für den errechneten Anteil der Träger des heterozygoten Genotyps. Der errechnete Prozentsatz liegt mit 47,8 %, sehr Nahe am empirisch ermittelten Wert von 49,3 %. Auch umgekehrt lässt sich entsprechend  $p^2$  aus q errechnen:

$$q^2 = 0,142 \Rightarrow q \approx 0,377$$

$$p = 1 - q = 1 - 0,377 = 0,623$$

$$\Rightarrow p^2 \approx 0,388$$

Der errechnete Wert von 38,8 % für den Anteil des T/T-Genotyps an der Gesamtpopulation liegt wiederum sehr nahe am empirisch ermittelten Wert von 36,6 %.

#### **5.4.1 Vergleich der Genotypfrequenzen der gesunden Population mit denen einer an rheumatoider Arthritis erkrankter Population**

Innerhalb der Gruppe der 192 an rheumatoider Arthritis erkrankten Patienten ist der SNP309 folgendermaßen verteilt:

**Tabelle 5.3: Distribution des SNP309 unter an rheumatoider Arthritis Erkrankten**

	Mdm2			Gesamt
	T/T	G/T	G/G	
Anzahl	90	81	21	192
% von Gruppe	46,9 %	42,2 %	10,9 %	100,0 %

Der T/T-Genotyp ließ sich in 90 Fällen und somit in 46,9 % der untersuchten Patientenproben nachweisen. Homozygot lag SNP309 in 21 Fällen und somit in 10,9 % vor, heterozygot in 81 Fällen, welches 42,2 % des untersuchten Probenmaterials entspricht.

Die Unterschiede zwischen den Genotypfrequenzen der gesunden Kontrollgruppe und der Patientengruppe mit rheumatoider Arthritis waren mit einem ermittelten p-Wert von 0,046 signifikant. Das G-Allel trat innerhalb der Gruppe der an rheumatoider Arthritis Erkrankten sowohl heterozygot, als auch homozygot seltener auf als in der Kontrollgruppe.

**Tabelle 5.4: geschlechtsspezifische Verteilung innerhalb der Gruppe, der an rheumatoider Arthritis Erkrankten**

Geschlecht		Mdm2			Gesamt
		T/T	G/T	G/G	
männlich	Anzahl	23	21	5	49
	% von Gruppe	46,9 %	42,9 %	10,2 %	100,0 %
weiblich	Anzahl	67	60	16	143
	% von Gruppe	46,9 %	42,0 %	11,2 %	100,0 %

Insgesamt war die Gruppe der männlichen Erkrankten mit 49/192 sehr viel kleiner als die der weiblichen (143/192). Bei den männlichen Erkrankten ließ sich mit einem errechneten p-Wert von 0,577 kein signifikanter Unterschied der Genotyp-Verteilung im Vergleich zur männlichen Normalpopulation nachweisen. Bei den weiblichen Erkrankten beträgt der errechnete p-Wert 0,043. Dies entspricht einem signifikanten Unterschied in der Genotyp-Verteilung. Der G/G- und der G/T-Genotyp wurden bei weiblichen Patienten mit rheumatoider Arthritis deutlich seltener nachgewiesen als bei weiblichen Gesunden. Entgegen unserer eingangs formulierten Hypothese war das SNP309 G-Allel also bei weiblichen Patienten unterrepräsentiert.

Aus diesem Ergebnis wird ersichtlich, dass der signifikante Unterschied der Genotypverteilung zwischen Rheumapatienten und Gesunden auf dem Unterschied innerhalb der weiblichen Subpopulation beruht und sich nur aufgrund des Überwiegens der weiblichen Rheumapatienten auf die gesamte Population überträgt.

### **5.5 SNP309-Genotypverteilung innerhalb einer Gruppe an COVID-erkrankter Patienten**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden DNA-Proben einer 52 Personen umfassenden Gruppe von Patienten, die an COVID (entsprechend der WHO-Diagnosekriterien) erkrankt sind, untersucht. Innerhalb dieser Gruppe wurde SNP309 in folgender Verteilung nachgewiesen:

**Tabelle 5.5: Distribution des SNP309 unter an COVID Erkrankten**

	Mdm2			Gesamt
	T/T	G/T	G/G	
Anzahl	17	29	6	52
% von Gruppe	32,7 %	55,8 %	11,5 %	100,0 %

In 17 der insgesamt 53 DNA-Proben konnte der homozygote T-Genotyp nachgewiesen werden. Das entspricht einem prozentualen Anteil von 32,7 %. Ein heterozygoter Polymorphismus lag in 29 Fällen und infolgedessen bei 55,8 % des untersuchten Probematerials vor. Homozygot ließ sich SNP309 6-mal nachweisen. Anteilig entspricht dies 11,5 %. Mit einem p-Wert von 0,743 konnte kein signifikanter Unterschied der Genotyp-Verteilung unter Erkrankten und Gesunden nachgewiesen werden.

Die Geschlechtsspezifische Untergliederung ergibt folgende Verteilung:

**Tabelle 5.6: geschlechtsspezifische Verteilung innerhalb der Gruppe, der an COVID Erkrankten**

Geschlecht		Mdm2			Gesamt
		T/T	G/T	G/G	
männlich	Anzahl	6	16	5	27
	% von Gruppe	22,2 %	59,3 %	18,5 %	100,0 %
weiblich	Anzahl	11	13	1	25
	% von Gruppe	44,0 %	52,0 %	4,0 %	100,0 %

Unter den männlichen Erkrankten sind 22,2 % Träger des T/T-Genotyps, 59,3 % heterozygot und 18,5 % homozygot für SNP309. Innerhalb der Population der

weiblichen Erkrankten ließ sich in 44,0 % T/T, in 52,0 % G/T und in 4,0 % G/G nachweisen. Insgesamt ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zur gesunden Kontrollpopulation (p-Wert für Männer 0,216; p-Wert für Frauen 0,281)

## 5.6 Häufigkeit der Genotypfrequenz bei CVID-Patienten mit Lymphadenopathie, Splenomegalie oder Granulomen im Vergleich zu derjenigen bei anderen an CVID-Erkrankten

### 5.6.1 Genotypfrequenzen der Patienten mit Lymphadenopathie im Rahmen einer CVID im Vergleich

Bei 40 der in die Untersuchung einbezogenen Patienten lagen Angaben zu einer nachgewiesenen bzw. einer nicht vorhandenen Lymphadenopathie vor. Die 7 CVID-Patienten mit bekannter Lymphadenopathie innerhalb dieser Gruppe verteilen sich folgendermaßen auf die verschiedenen Mdm2-Genotypen:

**Tabelle 5.7: Verteilung des SNP 309 unter an CVID-erkrankten Patienten mit oder ohne Lymphadenopathie**

Lymphadenopathie	Mdm2			Gesamt
	T/T	G/T	G/G	
Anzahl yes	4	3	0	7
% von Lymphadenopathie	57,1 %	42,9 %	0,0 %	100 %
Anzahl no	8	21	4	33
% von Lymphadenopathie	24,2 %	63,6 %	12,1 %	100 %
gesamte Anzahl	12	24	4	40
% von Lymphadenopathie	30,0 %	60,0 %	10,0 %	100 %

Der T/T-Genotyp kommt bei den in die Untersuchung eingeschlossenen Patienten mit Lymphadenopathie im Rahmen einer CVID in 57,1 % der Fälle vor, der G/T-Genotyp in 42,9 %, der G/G-Genotyp in 0,0 %. Es lässt sich mit dem errechneten p-Wert von 0,282 kein signifikanter Unterschied der Verteilung der Genotypen im Vergleich zu derjenigen bei CVID-Patienten ohne Lymphadenopathie nachweisen.

#### 5.6.2 Genotypfrequenzen der Patienten mit Splenomegalie im Rahmen einer CVID im Vergleich

Auch für die Analyse der Daten im Hinblick auf einen Zusammenhang zwischen dem SNP309 und dem Auftreten einer Splenomegalie bei CVID, standen Angaben zu einer eventuell vorhandenen Splenomegalie als Teil der Erkrankung CVID bei 40 der Patienten zur Verfügung. Bei 23 dieser Patienten war eine Splenomegalie bekannt.

**Tabelle 5.8: Verteilung des SNP309 unter an CVID-erkrankten Patienten mit oder ohne Splenomegalie**

Splenomegalie	Mdm2			Gesamt
	T/T	G/T	G/G	
Anzahl yes	8	13	2	23
% von Splenomegalie	34,8 %	56,5 %	8,7 %	100 %
Anzahl no	4	11	2	17
% von Splenomegalie	23,5 %	64,7 %	11,8 %	100 %
gesamte Anzahl	12	24	4	40
% von Splenomegalie	30,0 %	60,0 %	10,0 %	100 %

34,8 % der Patienten mit Splenomegalie besitzen den T/T-Genotyp, 56,5 % den heterozygoten G/T-Genotyp und 8,7 % den homozygoten Polymorphismus G/G.

Es besteht ebenfalls kein signifikanter Unterschied der Verteilung im Vergleich zur Gruppe der an CVID-Erkrankten ohne Splenomegalie. Der errechnete p-Wert beträgt 0,806.

### 5.6.3 Genotypfrequenzen der Patienten mit Granulomen im Rahmen einer CVID im Vergleich

Bei 39 der insgesamt 53 untersuchten CVID Patienten konnte auf Angaben zu vorhandenen oder nicht vorhandenen Granulomen zurückgegriffen werden. Insgesamt 8 dieser 39 Patienten litten nachweislich unter dieser zusätzlichen Symptomatik. Unter ihnen war der SNP309 folgendermaßen verteilt.

**Tabelle 5.9: Verteilung des SNP309 unter an CVID-erkrankten Patienten mit oder ohne Granulome**

Granulome	Mdm2			Gesamt
	T/T	G/T	G/G	
Anzahl yes	4	4	0	8
% von Granulomen	50,0 %	50,0 %	0,0 %	100 %
Anzahl no	8	19	4	32
% von Granulomen	25,8 %	61,3 %	12,9 %	100 %
gesamte Anzahl	12	23	4	40
% von Granulomen	30,8 %	59,0 %	10,3 %	100 %

Diese Untergruppe der an CVID Erkrankten teilt sich zu gleichen Teilen auf den Genotyp T/T und den Genotyp G/T auf. Es besteht kein signifikanter Unterschied der Genotyp-Verteilung innerhalb dieser Gruppe zur Population, der an CVID

Erkrankten ohne das zusätzliche Symptom Granulome. Der errechnete p-Wert beträgt 0,422.

### 5.7 Graphische Darstellung der Genotyp-Verteilung innerhalb der drei untersuchten Populationen

Die Abbildung 5.2 zeigt eine zusammengefasste Darstellung der prozentualen Genotypverteilungen:

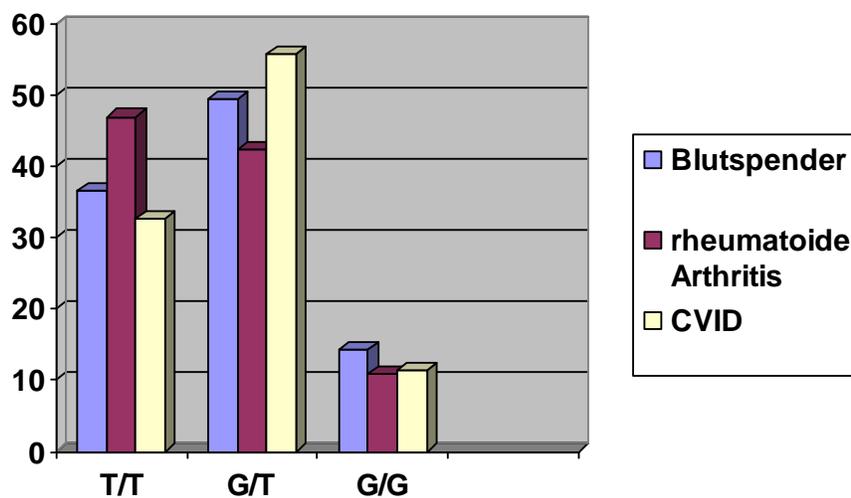
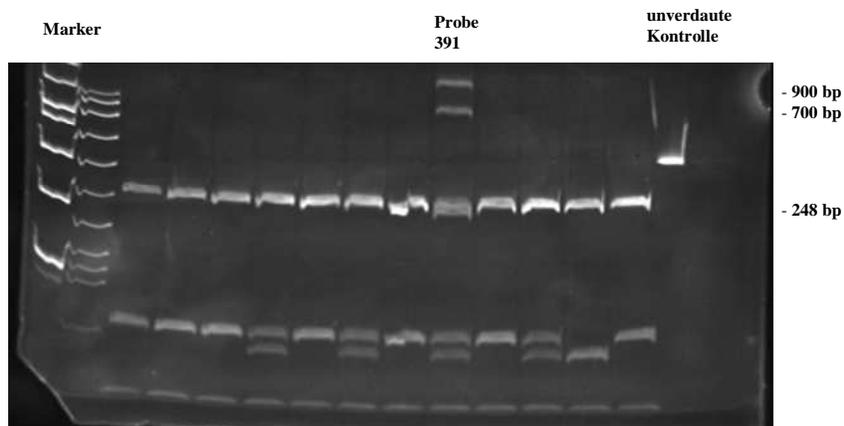


Abbildung 5.2: Blockdiagramm zur Darstellung der Genotyp-Verteilung innerhalb der untersuchten Populationen

## 5.8 Die Blutspenderprobe 391

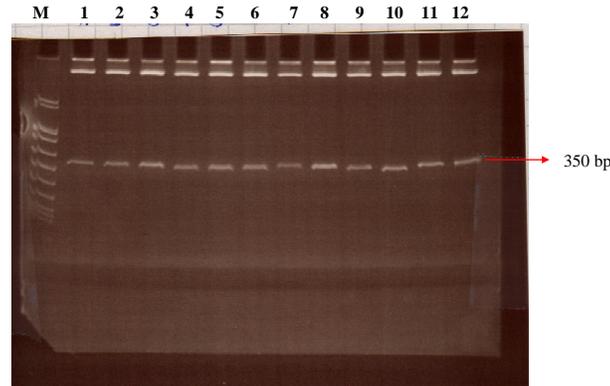
Bei der Untersuchung der vom Blutspendezentrum zur Verfügung gestellten Proben fiel die Probennummer 391 auf. Nach dem wie üblich durchgeführten enzymatischen Verdau der mittels PCR amplifizierten DNA, ließen sich auf dem SDS-Gel zwei zusätzliche Banden der Größen ~ 900 bp und ~ 700 bp erkennen. Auch erschien eines der beiden 248 bp langen Mdm2-Allel-Fragmente kürzer als das andere. Die beobachteten Abweichungen in dieser Probe waren reproduzierbar.



**Abbildung 5.3: Darstellung der Probe 391 auf SDS-Gel nach enzymatischem Verdau**

In Folge entschieden wir, diese auffällige Probe eingehender zu untersuchen.

Die beiden zusätzlichen Banden (~900 bp und ~700 bp) wurden aus dem SDS-Gel herausgeschnitten und aufgereinigt, die erhaltene aufgereinigte DNA anschließend in den Vektor pCR 2.1-TOPO ligiert. Der Ligationsansatz wurde in DH5 $\alpha$  –Bakterien transformiert. Zwölf der gewachsenen Klone wurden geerntet und die durch den Vektor vermehrte DNA nach enzymatischem Verdau mittels EcoRI anhand einer SDS-Gelelektrophorese als Banden sichtbar gemacht. Erstaunlicherweise ergaben sich jeweils Banden einer Größe von etwa 350 bp. Dies deutete darauf hin, dass es sich bei den großen Banden um Amplifikate mit Anordnung im Tandem handelte.

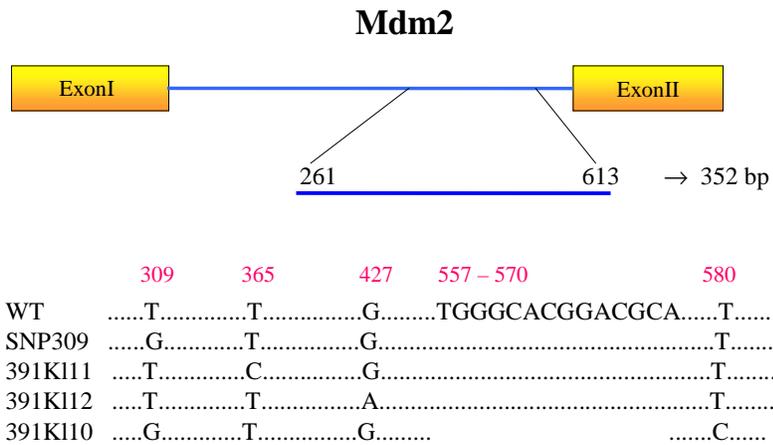


**Abbildung 5.4: Darstellung der in den 12 Bakterienklonen vermehrten und enzymatisch ausgeschnittenen DNA-Fragmente**

Die Klone 7,10,11 und 12 differierten in Bezug auf ihre Größe, entsprachen insgesamt aber mit ungefähr 350 bp näherungsweise dem normalerweise bei 352 bp laufenden unverdauten, amplifizierten DNA-Fragment. Die zugehörige DNA wurde aus dem Gel geschnitten, aufgereinigt und sequenziert.

Hierbei fielen vor allem die Sequenzen der Klone 10, 11 und 12 auf. Der Klon 7 zeigte keine auffälligen Veränderungen im Vergleich zum Mdm2-Wildtyp. In Klon 11 wurde an Stelle des Nucleosids Thymidin in Position 365 das Nucleosid Cytosin nachgewiesen, in Klon 12 das Nucleosid Adenosin an Stelle von Guanosen in Position 427.

Als von Interesse erwies sich der Klon 10. In ihm konnte eine Deletion der Nucleotide 557-570 detektiert werden (Abb.5.5).



**Abbildung 5.5: schematische Darstellung der bei der Sequenzierung nachgewiesenen Basendifferenzen der mittels Bakterien vermehrten aufgereinigten DNA-Fragmente**

Die Deletion innerhalb des Klonen 10 könnte deshalb von Bedeutung sein, weil die fehlende Sequenz eine putative Bindungsstelle für verschiedene Transkriptionsfaktoren darstellt. So konnten durch computergestützte Inspektion die Transkriptionsfaktoren CEBP beta, AML1 und PEB2 alpha als mögliche Liganden ausgemacht werden. Insgesamt schien also die aus weißen Blutzellen isolierte DNA aus diesem Probanden mit Bezug auf den Mdm2-Promoter heterogen zu sein. Ob dies funktionelle Auswirkungen hat und Ausdruck einer Erkrankung des hämatopoietischen Systems ist, sollte in späteren Studien geklärt werden.

## **6 Diskussion**

### **6.1 Der SNP309 in der europäischen Bevölkerung**

Bond und Kollegen beschrieben im Jahr 2004 erstmals den innerhalb der Promoterregion des Mdm2-Genes liegenden SNP309. Nachgewiesen wurde dieser Polymorphismus heterozygot (G/T) in 40 % und homozygot (G/G) in 12 % des untersuchten Probenmaterials. [Bond et al., 2004] Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Genotypverteilung des SNP309 innerhalb einer 587 gesunde, Blutspender umfassenden Kontrollgruppe entspricht mit 14,2 % homozygoten und 49,3 % heterozygoten SNP309-Trägern weitgehend den zuvor beschriebenen Ergebnissen. Die Abweichung ist nicht signifikant ( $p = 0,299$ ), sie lässt sich wahrscheinlich auch dadurch erklären, dass von denen durch Bond und Kollegen untersuchten Personen keine genaueren Angaben zur Rassenzugehörigkeit existieren und die Genotyp-Verteilung des SNP309 z.B. unter Afroamerikanern mit nur 18,4 % Heterozygoten und 2,0 % Homozygoten deutlich differiert [Pine et al 2006]. Der Anteil an Nichtkaukasiern ist im Kollektiv der Blutspender der Universität des Saarlandes dahingegen mit  $< 1\%$  gering.

### **6.2 Der SNP309 in der Literatur der letzten Jahre**

#### **6.2.1 Veränderung des zellulären Mdm2-Gehaltes und Tumorentstehung**

Schon geringfügige Veränderungen des Mdm2-Gehaltes führen sowohl in verschiedenen Mausmodellen, als auch beim Menschen zu einer veränderten p53-abhängigen Tumorsuppression. Eine vermehrte Expression des Mdm2-Genes bedingt hier die gehäufte Entstehung von Tumoren, eine verminderte Expression unterstützt die Tumorablehr. [reviewed in Bond et Levine 2007]

In verschiedenen menschlichen Tumoren wird Mdm2 überexprimiert, was bei einigen Tumortypen mit schnellerer Tumorprogression und schlechterem Therapieansprechen assoziiert ist. [reviewed in Bond et Levine 2007]

Der „single nucleotid“ Polymorphismus 309 des Mdm2-Genes erhöht über eine verlängerte Sp1 Bindungsstelle die Affinität von Sp1 zur Promoterregion. Als Konsequenz wird Mdm2 vermehrt transkribiert und die Konzentration an Mdm2-RNA und -Protein steigt. Schon in der Veröffentlichung, die den Polymorphismus erstmals beschrieb konnte gezeigt werden, dass der durch den Polymorphismus gesteigerte Mdm2-Gehalt eine Unterdrückung des p53-„pathways“ verursacht und so zu einer beschleunigten Entstehung von sporadischen und erblichen Tumoren führt. [Bond et al., 2004]

Als erbliche Tumorerkrankung wurde das **Li-Fraumeni-Syndrom** untersucht: eine autosomal-dominant vererbliche, für Tumorentstehung prädisponierende Erkrankung, für die in vielen Fällen TP53 Keimbahn-Mutationen ursächlich sind. Bei Erkrankten die gleichzeitig Träger des G-Allels des SNP309 („starkes“ Mdm2) und einer TP53 Keimbahn-Mutation sind, wurde zu einem früheren Zeitpunkt ein Tumor diagnostiziert als bei jenen, die homozygot das T-Allel tragen. Innerhalb der Subgruppe der TP53 negativen Li-Fraumeni-Patienten wurde der G/G-Genotyp häufiger nachgewiesen als in der Normalbevölkerung. Das Alter bei Diagnose differierte in dieser Subgruppe nicht. [Bond et al., 2004; Bougeard et al., 2006; Ruijs et al., 2007]

Eine erhöhte Mdm2-Expression konnte auch in Verbindung mit einer schlechteren Prognose bei **Mantelzell-Lymphomen** gebracht werden, allerdings gelang es nicht die Brücke zum „single nucleotid“ Polymorphismus 309 als mögliche Ursache für die gesteigerte Expression zu schlagen [Hartmann et al., 2007].

**Plattenepithelkarzinome** im Kopf- und Halsbereich konnten ebenfalls nicht auf den SNP309 zurückgeführt werden. Innerhalb der Patientengruppe und einer Kontrollgruppe unterschied sich die Genotyp-Verteilung nicht, auch das Erkrankungsalter war nicht abhängig vom nachgewiesenen Genotyp. [Alhopuro et al., 2005]

### 6.2.2 Geschlechtsabhängige Tumorentstehung

Bereits vor mehr als 10 Jahren wurden erhöhte Mdm2 mRNA- und Protein-Konzentrationen in Tumoren der Mamma, die den Östrogenrezeptor exprimieren, gemessen. In Folge konnte gezeigt werden, dass der Östrogenrezeptor- $\alpha$  die Transkription von Mdm2 induziert. Dies scheint zumindest zum Teil über die Mdm2-Promoterregion in der sich der SNP309 befindet vermittelt zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass der Östrogenrezeptor in vivo an diese Region bindet. Zusätzlich verändert der Polymorphismus die Bindungsaffinität von Sp1, und eben dieses ist ein bekannter Kotranskriptionsfaktor vieler Hormonrezeptoren, unter anderem des Östrogenrezeptors. Dieser Zusammenhang führte zu der Annahme, dass der Östrogen-Signalweg an der Frage, ob SNP309 die Mdm2-Transkription, und somit die Tumorentstehung beeinflusst, beteiligt sein könnte. [reviewed by Bond et Levine, 2007]

Bond und Kollegen entwickelten auf diesen Grundlagen basierend im Jahr 2006 die Theorie, dass Mdm2 die Tumorentstehung geschlechts- und hormonabhängig beeinflusst. Zur Überprüfung ihrer These zogen sie Patientendaten zu drei verschiedenen sporadisch auftretenden Tumorerkrankungen heran. [Bond et al., 2006b]

Eine der drei untersuchten Tumorerkrankungen ist das diffuse **großzellige B-Zell Lymphom** (DLBCL), bei dem bereits bekannt war, dass seine Inzidenz geschlechtsspezifisch differiert. In der 162 Kaukasier der ethnischen Gruppe jüdischer Ashkenaszi umfassenden Patientengruppe erkrankten Frauen mit dem G/G-Genotyp im Durchschnitt 13 Jahre früher als jene mit dem T/T-Genotyp. Der Altersunterschied bei Erkrankung zwischen den Genotypen war noch deutlicher bei Frauen vor der Menopause zu erkennen. Bei den untersuchten männlichen Erkrankten gab es keine größeren Unterschiede im Bezug auf das Erkrankungsalter zwischen den verschiedenen Genotypen. Sie erkrankten jedoch insgesamt durchschnittlich 5 Jahre eher als die Frauen. [Bond et al., 2006b] Eine im April 2008 erschienene Veröffentlichung konnte den Zusammenhang zwischen dem SNP309 und einem früherem Auftreten von DLBCL bei Frauen für europäische Kaukasier

nicht bestätigen. Es wird ein sich entsprechendes Erkrankungsalter bei Männern und Frauen beschrieben. Zusätzlich konnte kein Einfluss des Polymorphismuses auf die Überlebenszeit nachgewiesen werden. [Bittenbring et al., 2008] Zusammen zeigen diese Erkenntnisse, dass bei der Beurteilung von Genotypfrequenzen eigentlich immer der ethnische Hintergrund berücksichtigt werden sollte.

Bei der Zweiten der untersuchten Erkrankungen handelt es sich um **Weichteil-Sarkome**. Bei dieser Erkrankung hatten Bond und Kollegen bereits im Jahr 2004 einen Zusammenhang zwischen Erkrankungsalter und SNP309 nachweisen können. Als nun die Daten erneut untersucht wurden, wurde klar, dass dieser Zusammenhang nur bei den weiblichen Erkrankten besteht, die, sind sie Träger des G/G-Genotyps, im Durchschnitt 14 Jahre eher erkranken als Trägerinnen des T/T-Genotyps. Wiederum verstärkt sich der Altersunterschied bei Erkrankung noch bei Frauen vor der Menopause. [Bond et al., 2006b]

Die dritte untersuchte Erkrankung ist das **invasive duktales Karzinom der Mamma**. Die herangezogene Studienpopulation umfasste 685 kaukasische Patientinnen, die sich selbst als jüdische Ashkenazi bezeichneten. Patientinnen mit den für Brustkrebs prädisponierenden Allelen BRCA1 und BRCA2 wurden aus der Studiengruppe ausgeschlossen. Da vor allem ein Einfluss des SNP309 auf die Tumorentstehung bei intaktem Östrogen-Signalweg vermutet wird, wurden innerhalb der Studiengruppe die Daten von 100 Patientinnen näher betrachtet, bei denen bekannt war das der Tumor den Östrogenrezeptor stark exprimiert. Innerhalb dieser Subgruppe erkrankten Frauen, die homozygot den SNP309 tragen, im Schnitt 7 Jahre früher als Frauen, die homozygot das T-Allel aufweisen. Wiederum war die beschleunigte Tumorentstehung bei G/G-Genotyp-Trägerinnen prämenopausal besonders ausgeprägt. Bei Frauen deren Tumor nur eine kleine Zahl an Östrogenrezeptoren exprimiert, konnte kein Genotyp-spezifisch, unterschiedliches Erkrankungsalter nachgewiesen werden. [Bond et al., 2006b]

Zum Zusammenhang von Brustkrebs und SNP309 wurden noch weitere Studien veröffentlicht. Eine Assoziation zwischen der Geschwindigkeit der Tumorentstehung bei Patientinnen mit BCRA1 und SNP309 konnte durch Copson und Kollegen nicht nachgewiesen werden [Copson et al., 2006] Diese kurz vor der Bond-

Veröffentlichung (2006b) erschienene Studie macht den Ausschluss der Subgruppe in jener verständlich. Eine weitere 2007 erschienene Veröffentlichung unterstützt zum Teil die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Bond. Allerdings wurden für diese nur Patientinnen mit familiär auftretendem Brustkrebs untersucht, also auch solche die Mutationen im BCRA1- und BCRA2-Gen aufweisen. Insgesamt differierte die Genotypverteilung zwischen Kontrollgruppe und an familiärem Brustkrebs Erkrankten nicht. Junge Frauen mit Brustkrebs (<51 Jahre) und hierfür spezifischen Mutationen trugen jedoch vermehrt den SNP309 G/G-Genotyp im Vergleich zu älteren Patientinnen, was auf eine Beschleunigung der Tumorprogression durch SNP309 hindeuten könnte. Noch deutlicher war die Assoziation bei jungen Patientinnen mit familiären Mammatumoren ohne hierfür spezifische Mutationen. [Wasielowski et al., 2007]

Zwei weitere Arbeitsgruppen konnten dahingegen keine Assoziation zwischen dem Beginn der Tumorerkrankung und SNP309 nachweisen. [Boersma et al., 2006; Schmidt et al. 2007]

Ähnliche Beobachtungen zum geschlechtsabhängigen Einfluss von SNP309 auf die Tumorentstehung wurden auch bei verschiedenen anderen Tumorerkrankungen gemacht.

So beschleunigt der Polymorphismus die Entstehung von **colorektalen Tumoren** bei Frauen. Trägerinnen des G-Allels („starkes“ Mdm2) erkrankten im Schnitt, je nach Veröffentlichung, zwischen 2,7-9 Jahre früher. [Alhopuro et al., 2005; Bond et al., 2006a] Beim erblichen, familiären nicht-polypösen Colontumor (HNPCC oder Lynch-Syndrom) konnte bisher aber nicht nachgewiesen werden, dass die Tumorentstehung durch SNP309 beschleunigt werden kann. Es scheint sogar Hinweise darauf zu geben, dass das G-Allel protektiv im Hinblick auf die Tumorentstehung wirken könnte. Anzumerken ist allerdings, dass beide hier zitierte Studien ihre Patientenpopulationen nicht weiter nach Geschlecht oder Hormonstatus stratifizierten. [Talsbeth et al., 2006; Sotamaa et al., 2005] Die neueste Veröffentlichung im Zusammenhang mit colorektalen Tumoren und dem SNP309 konnte nur eine Assoziation einer vermehrten Mdm2-Synthese mit der Tumorprogression nachweisen. Die vermehrt Mdm2 Synthese konnte aber nicht mit

dem „single nucleotid“ Polymorphismus in Verbindung gebracht werden. [Forslund et al., 2008] Auch bei dieser Studie wurde der Hormonstatus der Patienten außer Acht gelassen, was einen gewissen Anteil dazu beitragen könnte, dass keine Verbindung zum SNP309 hergestellt werden konnte.

Zur Bedeutung des SNP309 für die Entstehung von **Basalzellkarzinomen** der Haut wurde bisher erst einmalig veröffentlicht. Es konnte weder ein alters- noch ein geschlechtsabhängiger Zusammenhang zwischen Polymorphismus und Tumoraufreten nachgewiesen werden. Die Genotypfrequenzen innerhalb der Patientengruppe unterschieden sich nicht von denjenigen innerhalb der Kontrollgruppe. [Wilkening et al., 2007a]

In die Reihe der Tumore, deren Entstehung geschlechtsabhängig ist, gehören selbstverständlich auch die klassischen Tumore der Frau. Forschungsergebnisse sind bisher für das **Ovarial-Karzinom**, das **Endometrium-Karzinom** und das **Leiomyosarkom des Uterus** verfügbar. Bei Ovarial-Karzinomen im FIGO-Stadium III, die vermehrt Östrogenrezeptoren exprimieren, ist ein früherer Krankheitsbeginn signifikant mit dem G-Allel assoziiert. Allerdings scheint das insgesamte Überleben bei Erkrankung im FIGO-Stadium III eher positiv durch das G-Allel beeinflusst zu werden [Bartel et al. 2008].

Beim Endometrium- Karzinom weisen bisher alle Daten auf ein erhöhtes Tumorrisiko bei Frauen mit homozygoten SNP309 hin [Walsh et al. 2007; Terry et al., 2008] Dementgegen konnte bisher keine Assoziation der Entstehung von Leiomyosarkomen mit dem Polymorphismus nachgewiesen werden [Alhopuro et al., 2005], wobei auch bei dieser Studie nicht näher auf den Hormonrezeptorstatus der untersuchten Tumoren eingegangen wird. Gerade bei den in ihrem Wachstum stark von Östrogen abhängigen Myomen wäre dieser jedoch von besonderem Interesse.

### 6.2.3 Tumorentstehung im Zusammenhang mit Umwelteinflüssen : Rauchen und virale Infektionen

p53 kann durch eine Vielzahl zellulärer Stressfaktoren aktiviert werden. Dies hat zur Folge, dass der Zellzyklus der betreffenden Zelle arretiert wird, um eine Reperatur des DNA-Schadens zu ermöglichen. Ist der Schaden groß, kann die Zelle auch in die Seneszenz oder sogar die Apoptose überführt werden. Man nimmt an, dass p53 auf diese Weise die Integrität des Erbgutes erhält. Eine ganze Reihe an Umwelteinflüssen, wie Rauchen, Ernährung und virale Infektionen stellen zelluläre Stressfaktoren dar und erhöhen das individuelle Tumorrisiko. Es ist sehr wahrscheinlich, dass Individuen mit unterschiedlich ausgeprägter p53-Aktivität auch auf zellulärer Ebene verschieden auf schädigende Umwelteinflüsse reagieren und dementsprechend ein unterschiedlich großes Risiko besteht einen Tumor zu entwickeln. [reviewed by Bond et Levine, 2007]

Verschiedene Wissenschaftler ziehen in Betracht, dass Rauchen und eine angeboren schwächere p53-Aktivierung zusammenwirken könnten und so ein erhöhtes Risiko an **Lungentumoren** zu erkranken bedingen. Die bisher veröffentlichten Daten sind jedoch widersprüchlich. Lind und Kollegen konnten eine Assoziation der Entstehung von nicht-kleinzelligen Lungentumoren mit SNP309 nachweisen, die beim weiblichen Geschlecht sogar noch deutlicher ausfiel. Erkrankten, in deren Tumoren p53-Mutationen nachgewiesen wurden, und die gleichzeitig homozygot den SNP309 trugen wurden erst zu einem späteren Zeitpunkt diagnostiziert als jene mit nachgewiesenen Mutationen und Wildtyp-Mdm2 (heterozygot und homozygot). Ein homozygot vorkommender SNP309 könnte dementsprechend protektiv wirken, indem durch ihn mutiertes p53 supprimiert wird. [Lind et al., 2006]. Eine kombinierte Analyse verschiedener schon vorhandener Studien aus dem Jahr 2007 beschreibt eine Assoziation des Risikos einen Lungentumor zu entwickeln mit dem Polymorphismus [Wilkening et al., 2007b]. Gleiches war hingegen einer Reihe anderer Forscher nicht möglich, die eine Assoziation sowohl insgesamt, als auch geschlechtsspezifisch oder in Bezug auf Nikotinabusus verneinen [Pine et al., 2006; Hu et al., 2006; Han et al., 2008]. Die Arbeitsgruppe um Han konnte jedoch dem

T/T-Genotyp eine längere Überlebenszeit zuschreiben [Han et al., 2008]. Zwei weitere Veröffentlichungen beschreiben eine teilweise Assoziation von SNP309 und Tumorprogression. So konnten Liu und Kollegen zwar keinen Gesamtzusammenhang, jedoch eine deutliche Interaktion zwischen SNP309 und Nikotinabusus bei der Tumorentstehung nachweisen. Innerhalb der Gruppen der Nichtraucher und der Wenigraucher bedingt der G/G-Genotyp ein höheres Tumorrisiko, für stärkere Raucher konnte ein solcher Zusammenhang nicht nachgewiesen werden [Liu et al., 2008]. Mittelstrass und Kollegen verneinen ebenfalls eine Assoziation im Allgemeinen, sahen aber eine mögliche Tendenz zu einem geschlechtspezifischen Zusammenhang bei nicht-kleinzelligen Lungentumoren [Mittelstrass et al., 2008]. Ganz im Gegensatz zur bisherigen Forschung stehen die Ergebnisse einer texanischen Forschungsgruppe. Sie wies das G-Allel seltener bei Patienten mit Lungentumoren, als bei Gesunden nach und stellte die Vermutung auf, dass das G-Allel möglicherweise mit einem geringeren Tumorrisiko in Verbindung gebracht werden könnte [Li et al., 2006].

Eine ähnlich karzinogene Wirkung wie dem Rauchen bei der Entwicklung von Neoplasien der Lunge wird chronischen Hepatitiden in Bezug auf die Entstehung von **hepatozellulären Karzinomen** zugeschrieben. Eine japanische und eine koreanische Arbeitsgruppe untersuchten, ob ein durch den SNP309 geschwächter p53-Pfad bei einer bestehenden chronischen Hepatitis mit dem frühzeitigen Auftreten von hepatozellulären Karzinomen assoziiert sein könnte. Eine solche Assoziation wurde sowohl bei hepatozellulären Karzinomen im Rahmen einer chronischen Hepatitis C, als auch bei diesen Karzinome im Rahmen einer chronischen Hepatitis B nachgewiesen [Dharel et al., 2006; Yoon et al., 2008].

#### 6.2.4 Tumorentstehung im Zusammenhang mit Mutationen innerhalb des p53-Genes

Innerhalb fast jeden Tumorgewebes können somatische Mutationen nachgewiesen werden. Dabei ist von einigen bereits bekannt, dass sie Einfluss auf Tumorwachstum und/oder Therapieansprechen nehmen. P53 ist nun eines der Gene die innerhalb von Neoplasien am häufigsten von Mutationen betroffen sind. Gleichzeitig wurden Mutationen des p53-Genes vermehrt in sich aggressiver verhaltenden Tumorarten und Tumoren mit schlechterer Prognose nachgewiesen. Gerade aufgrund des häufigen Auftretens von p53-Mutationen innerhalb von Tumorzellen, macht es Sinn sie in die Untersuchung der Rolle des SNP309 bei der Tumorentstehung mit einzubeziehen. [reviewed by Bond et Levine, 2007] Bei verschiedenen neoplastischen Erkrankungen wurden in den letzten Jahren deshalb der „single nucleotid“ Polymorphismus 309 des Mdm2 Genes und der p53-Status gleichzeitig untersucht.

Tritt beim **Li-Fraumeni-Syndrom**, der Erkrankung bei der erstmals ein Einfluss des SNP309 auf die Tumorentstehung nachgewiesen werden konnte, der Polymorphismus des Mdm2 Genes gleichzeitig mit dem p53 Arg72Pro Polymorphismus auf, führt dies sowohl bei jeweils heterozygoten als auch homozygoten Trägern zu einem früheren Erkrankungsbeginn. Ein Einfluss der Polymorphismen auf den aufgetretenen Tumortyp ließ sich allerdings nicht nachweisen. [Bougeard et al., 2006]

Auch bei **Tumoren der Mamma** wurde der SNP309 im Zusammenhang mit Veränderungen innerhalb des p53-Genes betrachtet. Insgesamt konnte das Auftreten der Erkrankung nicht mit dem kombinierten Nachweis des SNP309 und des p53 Arg72Pro Polymorphismus in Korelation gebracht werden [Schmidt et al., 2007]. Der Arbeitsgruppe um Brenda J. Boersma gelang es jedoch ein geringfügig erhöhtes Tumorrisiko bei Frauen die homozygote Trägerinnen des SNP309 waren nachzuweisen, wenn der bei ihnen aufgetretene Tumor keine Mutation des p53-Genes aufwies. Gleichzeitig scheint der G/G-Genotyp bei Tumoren mit nachgewiesenen aberranter p53-Expression, längeres Überleben zu ermöglichen. Dies wendet sich

jedoch ins Gegenteil, ist in den Tumorzellen gar kein p53 nachweisbar. Dann ist die Überlebenszeit bei Trägern des G/G-Genotyps signifikant verkürzt. [Boersma et al., 2006]

Für **Ovarialkarzinome** des Stadiums FIGO III gelten sowohl die Expression von p53, als auch der SNP309 als prognostisch bedeutsame Faktoren. So treten diese Karzinome, enthält das Tumorgewebe Östrogenrezeptoren, statistisch bei Trägern des G/G-Genotypes zwar früher auf, sind aber bei diesem Genotyp mit einer längeren Überlebenszeit verbunden. [Bartel et al., 2008] Einer anderen Arbeitsgruppe gelang es im Jahr 2006 nicht, eine Korrelation zwischen Überlebenszeit und SNP309 nachzuweisen. Sie konnten die Prognose nur vom Tp53 codon72 Status abhängig machen. Allerdings sahen sie eine Tendenz zu einem verfrühten Erkrankungsbeginn in Bezug auf Ovarial- und Peritonealtumore, wenn p53 im Tumorgewebe mutiert war und der Erkrankte gleichzeitig den G/G-Genotyp aufwies. [Galic et al., 2006]

Auch das **kolorektale Karzinom** wurde in Zusammenhang mit dem SNP309 und Veränderungen des p53 Gens gebracht. Lynch Syndrom Patienten die gleichzeitig Träger des G-Allels und älter als 45 Jahre sind, haben ein geringes Risiko noch eine Kolontumor zu entwickeln. Treten der SNP309 und der p53 Arg72Pro Polymorphismus gemeinsam auf konnte keine Veränderung des Diagnosezeitpunktes festgestellt werden. [Talseth et al., 2006]

Kolorektale Tumoren im Allgemeinen, in denen das p53-Gen nicht durch Mutation verändert ist, treten bei Trägern des G-Allels zu einem früheren Zeitpunkt auf, als bei Patienten ohne SNP309. Dies ist insoweit mit den bekannten Daten konsistent, als SNP309 zu einer vermehrten Mdm2 Transkription führt und auf diesem Weg funktionelles p53 supprimiert werden kann. [Menin et al., 2006]

Beim **Magenkarzinom** besteht ein erhöhtes Tumorrisiko für den G/G-Genotyp im Vergleich zu heterozygoten und homozygoten T- Allel-Trägern. Auch treten bei Erkrankten mit G/G-Genotyp vermehrt zusätzliche Tumore außerhalb der Magenregion auf. Die Magentumore selbst weisen bei ihnen gehäuft p53-Mutationen auf. All dies weist schon darauf hin, dass auch die Prognose bei Magenkarzinomen durch den Mdm2 SNP309 Genotyp beeinflusst sein könnte. Tatsächlich ist der G/G-

Genotyp signifikant mit einer schlechteren Prognose für Magenkarzinome ab dem TNM-Stadium Ib-IV assoziiert. [Ohmiya et al., 2006]

Bereits oben wurde beschrieben, dass das **hepatozelluläre Karzinom** in Folge einer chronischen Hepatitis B bei Trägern des Mdm2 SNP309 zeitiger auftritt, als bei Hepatitis-Patienten, die den Polymorphismus nicht aufweisen. Gleiches konnte für den p53 Arg72Pro Polymorphismus nachgewiesen werden. Der Pro/Pro-Genotyp ist mit einem höheren Risiko, frühzeitig ein hepatozelluläres Karzinom bei bestehender Hepatitis B zu entwickeln, assoziiert. Treten nun beide Polymorphismen in Kombination auf, wirken sie synergistisch auf die Tumorentstehung ein. [Yoon et al., 2008]

Bei **Blasentumoren** scheint die Prognose nur vom Status des p53-Genes an sich abhängig zu sein. Treten Mutationen des Genes gleichzeitig mit einem vorhandenen SNP309 auf, verändert dies prognostisch nichts. Allerdings weisen Tumoren bei Patienten deren Mdm2 nicht durch den Polymorphismus verändert ist, wesentlich häufiger Mutationen des p53-Genes auf und sind daher aggressiver. Betrachtet man nur die Subgruppe der oberflächlich-wachsenden Blasentumore näher, scheinen diese bei homozygot nachweisbarem SNP309 zu einem früheren Zeitpunkt aufzutreten, als bei heterozygot oder homozygot nachweisbarem Wildtyp-Mdm2. [Sachez-Carbayo et al., 2007]

Im Fall des **Nierenzell-Karzinoms** ließ sich der G/G-Genotyp innerhalb einer Gruppe von Erkrankten häufiger nachweisen, als innerhalb einer gesunden Kontrollpopulation. In der zitierten Studie war das Risiko an einem Nierenzelltumor zu erkranken für G/G-Genotyp-Träger unter 65 Jahre nachweislich höher als für ältere Menschen mit SNP309. War ein p53 Codon 72 Polymorphismus in Kombination nachweisbar, hatte dies keinen zusätzlichen Einfluss auf das Risiko an einem Tumor zu erkranken. Gleichzeitig konnte der SNP309 mit der Überlebenszeit nach Erkrankung assoziiert werden. Die Überlebenszeit war bei Patienten, die den G/G-Genotyp aufwiesen signifikant verkürzt im Vergleich zu Patienten, die homo- oder heterozygot das T-Allel aufwiesen. Als von anderen Einflüssen unabhängiger Prognosefaktor erreichte der Polymorphismus jedoch nur eine grenzwertige Signifikanz. [Hirata et al., 2007]

Weder unterschiedliche Genotyp- noch Allelfrequenzen in Bezug auf den SNP309 ließen sich bei Patienten mit **Glioblastomen** im Vergleich zu einer gesunden Kontrollpopulation nachweisen. Beim Einfluss des Polymorphismus auf die Überlebenszeit nach Diagnose findet man jedoch unterschiedliche Ergebnisse in der Literatur. So finden El Hallani et al. keinen Zusammenhang, Zawlik et al. kamen jedoch zu dem Ergebnis, dass weibliche Patienten, die Trägerinnen des G-Alles waren, länger überlebten. Ein synergistischer Effekt des SNP309 und des p53 Arg72Pro Polymorphismus konnte nicht nachgewiesen werden. [El Hallani et al., 2007; Zawlik et al., 2008]

Das Vorhandensein des G-Allels scheint bei der **B-CLL** mit einer kürzeren Überlebenszeit verbunden zu sein. Tritt es homozygot auf, beeinflusst es gleichzeitig die Überlebenszeit ohne Therapie, die im Vergleich zu Trägern des T/T-Genotyps verkürzt ist. Tritt der SNP309 in Verbindung mit einer Deletion innerhalb des p53-Genes auf, wirkt er sich bereits heterozygot auf die Überlebenszeit ohne Therapie aus, die dann derjenigen von homozygoten SNP309-Trägern entspricht. Auch wenn der SNP309 innerhalb zweier Patientengruppen nicht unterschiedlich im Vergleich zu einer Kontrollgruppe verteilt ist und auch kein Einfluss auf das Diagnosealter besteht, ist er durch die beschriebenen Zusammenhänge ein unabhängiger Prognosefaktor für den Verlauf einer B-CLL. [Gryshenko et al., 2007]

Patienten mit **therapieinduzierter AML** sind nicht häufiger Träger des G/G-Genotyps des Mdm2-Promoters als Gesunde. Betrachtet man die Mdm2-Promoter-Varianten gleichzeitig mit den Varianten des Codons 72 des p53-Genes, kommt der T/T-Genotyp (Mdm2) gehäuft mit dem Arg/Arg-Genotyp (p53) kombiniert, und das G-Allel (Mdm2) häufiger in Kombination mit p53 Codon72Pro vor. Die Interaktion beider Polymorphismen scheint eine gesteigerte Empfindlichkeit im Hinblick auf die Entstehung einer therapieinduzierten AML zu bedingen. [Ellis et al., 2008]

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass SNP309 einen Einfluss auf die Tumorentwicklung, insbesondere bei Frauen, sowie den Zeitpunkt der Tumordiagnose und die Prognose von unterschiedlichen Tumoren hat. Allerdings zeigen die zum Teil widersprüchlichen Berichte, dass die weiteren SNP309- ebenso

wie die p53 Arg/Pro-Studien umfangreicher und prospektiver Arbeiten an ethnisch gut charakterisierten Patienten bedürfen. Die meisten Diskrepanzen reflektieren wohl Unzulänglichkeiten des Studienmaterials.

Der SNP309 wurde bisher nur mit der Entstehung von Tumoren in Zusammenhang gebracht. Zu seiner mögliche Bedeutung für die Genese chronischer Entzündung wurde bis dato noch nicht veröffentlicht.

### **6.3 Der SNP309 im Zusammenhang mit Rheumatoider Polyarthrit**

Unsere Arbeitshypothese, dass der SNP309, also „starkes“ Mdm2, durch verstärkte Suppression von p53 mit dem Auftreten der rheumatoiden Polyarthrit assoziiert ist, konnte durch die vorliegende Arbeit nicht bestätigt werden. Innerhalb einer weiblichen Subpopulation wurde zwar eine unterschiedliche Genotyp-Verteilung bei Erkrankten und Gesunden nachgewiesen, der SNP309 trat jedoch bei erkrankten Frauen nicht wie erwartet häufiger, sondern vielmehr, sowohl homozygot als auch heterozygot, seltener auf.

Dass ein supprimierter p53-Signalweg für die rheumatoide Arthrit und ihrem Verlauf von Bedeutung sein könnte, versprochen verschiedene, im Vorfeld dieser Untersuchung bereits bekannte Zusammenhänge. P53-defiziente Mäuse entwickeln, wird in ihnen Arthrit mittels Kollagen induziert, eine schwerere Form der Erkrankung, die mit vermehrten Gelenkschäden einhergeht, als normogene Mäuse, die auf die gleiche Weise behandelt werden. [Yamanishi et al., 2002a] Wird die Erkrankung mit Hilfe von Antigenen induziert, verläuft sie bei p53-defizienten Mäusen ebenfalls schwerer [Leech et al., 2008]. Auch wurden in verschiedenen Veröffentlichungen, im Rahmen der Erkrankung auftretende Mutationen innerhalb des p53-Gens beschrieben, die zumindest zum Teil dessen Funktion beeinträchtigen. [Firestone et al., 1997; Rème et al., 1998; Inazuka et al., 2000; Yamanishi et al., 2005] Andere Studien konnten diese allerdings nicht bzw. nur in wenigen Fällen nachweisen [Kullmann et al., 1999; Taubert et al., 2000]. Wie häufig Mutationen innerhalb des p53-Gens im Rahmen einer rheumatoiden Arthrit tatsächlich auftreten

ist wahrscheinlich schwer zu beurteilen. Zum einen, da selbst die Studien, in denen Mutationen nachgewiesen wurden nicht das gesamte Gen untersuchten [Inazuka et al., 2000], und zum anderen, da Synovialzellen deren p53 mutiert ist auch inselartig zwischen nicht veränderten Synovialzellen vorkommen [Yamanishi et al., 2002b]. Letzteres impliziert, dass der Nachweis von Synovialzellen mit intaktem p53 bei einem RA Patienten noch lange nicht bedeutet, dass alle Synovialzellen Wildtyp p53 aufweisen. Sicherlich wurden jedoch nicht in jedem untersuchten Synovialgewebe genügend Zellen untersucht, um tatsächlich mit Sicherheit Zellinseln mit p53-Mutationen auszuschließen. Neben den genannten Hinweisen für einen Zusammenhang zwischen supprimiertem p53 und rheumatoider Arthritis, spräche auch eine erst kürzlich erschienene Veröffentlichung für diesen Sachverhalt. Taranto und Kollegen konnten in Synovialgewebe von RA Patienten eine hohe Mdm2-Konzentration nachweisen. Mdm2 wurde in RA Fibroblasten-ähnlichen Synovialzellen stärker exprimiert, als in denselben Zellen bei Osteoarthritis. Diese Studie wurde allerdings nur an Synovialgewebe von vier Spendern, also einer sehr kleinen Population von Erkrankten, durchgeführt. [Taranto et al., 2005] So ist es fraglich, ob das Ergebnis auch für die Gesamtpopulation der Erkrankten repräsentativ ist.

*Gegen* die in der hier vorliegenden Arbeit formulierte Arbeitshypothese spricht, dass p53 in Fibroblasten-ähnlichen Synovialzellen von an rheumatoider Arthritis erkrankten Patienten stärker exprimiert wird, als in den gleichen Zellen bei Osteoarthritis oder in gesunden Hautfibroblasten [reviewed by Sun et Cheung, 2002] Das Ausmaß der messbaren p53-Expression konnte sogar mit der Schwere des Krankheitsverlaufs korreliert werden. So wurde bei der erosiven Form der rheumatoiden Arthritis mittels eines Score-Systems ein signifikant höherer p53 Score nachgewiesen als bei der weniger schweren, nicht erosiven Form. Der Score konnte zudem in Zusammenhang mit der Krankheitsprogression gebracht werden. Patienten mit radiologisch nachgewiesener Progression innerhalb eines Jahres, wiesen gleichzeitig die höchsten Score-Werte auf. [Salvador et al., 2004]

Obwohl p53 bei rheumatoider Arthritis überexprimiert wird, und dementsprechend in einem erhöhten Maß zur Verfügung stehen sollte, weiß man, dass die Synovialzellen

verstärkt proliferieren, formverändert erscheinen sowie invasiv und unabhängig vom Zellverband wachsen können. Die Synovialzellen bei rheumatoider Arthritis verhalten sich also ähnlich wie Tumorzellen, und das obwohl eine erhöhte p53-Konzentration doch eher vor Transformation schützen sollte, indem der Zellzyklus arretiert oder die Apoptose eingeleitet wird. Genau dies scheint bei rheumatoider Arthritis aber nicht der Fall zu sein. Apoptose wird zwar durchaus eingeleitet, Zellen die die Apoptose vollendet haben, können jedoch nur selten nachgewiesen werden. [reviewed by Sun et Cheung, 2002] Eine mögliche Erklärung für diese Phänomene könnten die in verschiedenen Veröffentlichungen beschriebenen, im Rahmen der Erkrankung auftretenden Mutationen innerhalb des p53-Genes bieten [Firestine et al., 1997; Rème et al., 1998; Inazuka et al., 2000; Yamanishi et al., 2005].

Insgesamt scheinen die genauen Zusammenhänge, die zur Entstehung der rheumatoiden Arthritis und deren Progression führen, noch recht unklar und teilweise widersprüchlich. So wird einerseits eine erhöhte Mdm2-Expression mit niedriger p53-Expression [Taranto et al., 2005] und andererseits eine erhöhte p53-Expression [reviewed by Sun et Cheung, 2002] im Rahmen der Erkrankung beschrieben. Außerdem werden ein erhöhter zellulärer p53-Gehalt oder aber auch ein defizientes p53 für einen schwereren Krankheitsverlauf verantwortlich gemacht. [reviewed by Sun et Cheung, 2002]. Eine Erklärung könnte sein, dass die Erkrankung tatsächlich mit weniger oder dysfunktionellem p53 assoziiert ist und es sich beim überproduzierten p53 um Mutanten handelt. So könnten erhöhte Mdm2-Werte zu Beginn der Erkrankung bis zu einem gewissen Grad sogar protektiv wirken, indem sie eine überhöhte p53-Expression unterdrücken. Hierzu würde das von uns entdeckte seltenere Vorkommen des SNP309 bei Frauen mit rheumatoider Arthritis passen. Wird p53 jedoch zu stark supprimiert, könnte sich dies ebenfalls negativ auf den Krankheitsverlauf auswirken. Wie bereits von vielen anderen Stoffen im Körper - zum Beispiel Elektrolyten und Hormonen - bekannt, könnte es auch für p53 entscheidend sein, dass seine Konzentration innerhalb bestimmter Grenzen gehalten werden muß, damit das Protein seine Aufgaben optimal erfüllen kann. Es bleibt weiter zu untersuchen, wie nun p53 tatsächlich auf die Krankheitsentstehung-

und Progression Einfluss nimmt. Auch wäre von Interesse, ob erhöhte Mdm2-Level mit einem milderem Krankheitsverlauf assoziiert sein könnten.

Nicht zuletzt bleibt die Feststellung, dass Mdm2 auch p53-unabhängige Funktionen in der Zelle ausübt [reviewed by Iwakuma et al., 2003]

#### **6.4 Die Bedeutung des SNP309 für den Verlauf der CVID**

Die von uns postulierte Hypothese, der SNP309 könne im Zusammenhang mit dem Auftreten von Lymphadenopathie, Splenomegalie und Granulomen bei CVID gebracht werden, konnte nicht bestätigt werden. Die Genotypfrequenzen unterschieden sich weder bei CVID-Patienten im Allgemeinen von denen innerhalb der Kontrollgruppe, noch bei CVID-Patienten mit oben aufgeführten Symptomen im Vergleich zu CVID-Patienten ohne diese. Die in den Subgruppen von CVID-Patienten mit Lymphadenopathie, Splenomegalie oder Granulomen bereits mehrfach beschriebene erhöhte TNF $\alpha$ -Aktivität [Mullighan et al., 1997; Aukrust et al., 1996; Aukrust et al., 1995] scheint also nicht ursächlich in Zusammenhang mit einem durch den SNP309 geschwächten p53-Signalweg zu bringen zu sein. Sollte dieser dennoch bestehen, ist er wohl nur an größeren Patientenzahlen nachzuvollziehen. Leider war auch eine weitere Stratifizierung nach Östrogenstatus innerhalb der Gruppen der CVID-Erkrankten mit Lymphadenopathie, Splenomegalie und Granulomen aufgrund der geringen Patientenzahl nicht möglich.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Aggarwal BB (2000)

*Tumour necrosis factors receptor associated signalling molecules and their role in activation of apoptosis, JNK and NF- $\kappa$ B.*

Annals of the rheumatic diseases 59: i6-i16

2. Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (1999)

*Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie.*

Wiley-VHC Weinheim

3. Alhopuro P, Ylisaukko-oja SK, Koskinen WJ, Bono P, Arola J, Järvinen HJ, Mecklin JP, Atula T, Kontio R, Mäkitie AA, Suominen S, Leivo I, Vahteristo P, Aaltonen LM, Aaltonen LA (2005)

*The MDM2 promoter polymorphism SNP309T→G and the risk of uterine leiomyosarcoma, colorectal cancer, and squamous cell carcinoma of the head and neck.*

Journal of Medical Genetics 42: 694-698

4. Aukrust P, Svardal AM, Lunden B, Berge RK, Frøland SS (1995)

*Decreased levels of total and reduced Glutathione in CD4+ Lymphocytes in Common Variable Immunodeficiency are associated with activation of the tumor necrosis factor system: possible immunopathogenic role of oxidative stress.*

Blood 86: 1383-1391

5. Aukrust P, Lien E, Kristoffersen AK, Muller F, Haug CJ, Espevik T, Frøland SS (1996)  
*Persistent activation of the tumor necrosis factor system in a subgroup of patients with Common Variable Immunodeficiency: possible immunologic and clinical consequences.*  
Blood 87: 674-681
  
6. 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.*  
Clinical Cancer Research 14: 89-96
  
7. Baud V, Karin M (2001)  
*Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives.*  
TRENDS in Cell Biology 11:372-377
  
8. Bittenbring J, Parisot F, Wabo A, Mueller M, Kerschenmeyer L, Kreuz M; Truemper L, Landt O, Menzel A, Pfreundschuh M, Roemer K (2008)  
*MDM2 gene SNP309T/G and p53 gene SNP72G/C do not influence diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma onset or survival in central European Caucasians.*  
BMC Cancer 8
  
9. Boersma BJ, Howe TM, Goodman JE, Yfantis HG, Lee DH, Chanock SJ, Ambros S (2006)  
*Association of breast cancer outcome with status of p53 and MDM2 SNP309.*  
Journal of the National Cancer Institute 98: 911-918

10. 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
  
11. Bond GL, Menin C, Bertorelle R, Alhopuro P, Aaltonen LA, Levine AJ (2006a)  
*MDM2 SNP309 accelerates colorectal tumour formation in women.*  
Journal of Medical Genetics 43: 950-952
  
12. 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 (2006b)  
*MDM2 SNP309 accelerates tumor formation in a gender-specific and hormone-dependent manner.*  
Cancer Research 66: 5104-5110
  
13. Bond GL, Levine AJ (2007)  
*A single nucleotide polymorphism in the p53 pathway interacts with gender, environmental stresses and tumor genetics to influence cancer in humans.*  
Oncogene 26: 1317-1323
  
14. Bougeard G, Baert-Desurmont S, Tournier I, Vasseur S, Matrin 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.*  
Journal of Medical Genetics 43: 531-533

15. Copson ER, White HE, Blaydes JP, Robinson DO, Johnson PW, Eccles DM  
(2006)  
*Influence of the MDM2 single nucleotide polymorphism SNP309 on tumour development in BRCA1 mutation carriers.*  
BMC Cancer 6
  
16. Dharel N, Kato N, Muroyama R, Moriyama M, Shao RX, Kawabe T, Omata M  
(2006)  
*MDM2 promoter SNP309 is associated with the risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic Hepatitis C.*  
Clinical Cancer Research 12: 4867-4871
  
17. Di Renzo M, Pasqui AL, Auteri A (2004)  
*Common variable immunodeficiency: a review.*  
Clinical and Experimental Medicine 3: 211-217
  
18. El Hallani S, Marie Y, Idbaih A, Rodero M, Boisselier B, Laigle-Donadey F, Ducray F, Delattre JY, Sanson M (2007)  
*No association of MDM2 SNP309 with risk of glioblastoma and prognosis.*  
Journal of Neurooncology 85: 241-244
  
19. Ellis NA, Huo D, Yildiz O, Worrillow LJ, Banerjee M, Le Beau MM, Larson RA, Allan JM, Onel K (2008)  
*MDM2 SNP309 and TP53 Arg72Pro interact to alter therapy-related acute myeloid leukemia susceptibility.*  
Blood prepubished online
  
20. Feldmann M (2001)  
*Pathogenesis of arthritis: recent research progress.*  
Nature Immunology 2: 771-773

21. Fiers W (1991)  
*Tumor necrosis factor characterization at the molecular, cellular and in vivo level.*  
FEBS Letters 285: 199-212
22. Firestine GS, Echeverri F, Yeo M, Zvaifler NJ, Green DR (1997)  
*Somatic mutations in the p53 tumor suppressor gene in rheumatoid arthritis synovium.*  
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94: 10895-10900
23. Forslund A, Zeng Z, Quin LX, Rosenberg S, Ndubuisi MK, Pincas H, Gerald W, Notterman DA, Barany F, Paty PB (2008)  
*MDM2 gene amplification is correlated to tumor progression but not to the presence of SNP309 or TP53 mutational status in primary colorectal cancers.*  
Molecular Cancer Research 6: 205-211
24. Freedman DA, Levine AJ (1999)  
*Regulation of the p53 protein by the MDM2 oncoprotein-thirty-eight G.H.A. Clowes Memorial Award Lecture.*  
Cancer Research 59: 1-7
25. Galic V, Willner J, Wollan M, Garg R, Garcia R, Goff BA, Gray HJ, Swisher EM  
(2006)  
*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

26. Genth E (2002)  
*Rheumatoide Arthritis.*  
Laboratoriums Medizin 26: 130-136
27. Geyer RK, Yu ZK, Maki CG (2000)  
*The MDM2 RING-finger domain is required to promote p53 nuclear export.*  
Nature Cell Biology 2: 569-573
28. Gryshchenko I, Hofbauer S, Stoecher M, Daniel PT, Steurer M, Gaiger A, Eigenberger K, Greil R, Tinhofer I (2008)  
*MDM2 SNP309 is associated with poor outcome in B-cell chronic lymphocytic leukemia.*  
Journal of Clinical Oncology 26:2252-2257
29. Han JY, Lee GK, Jang DH, Lee SY, Lee JS (2008)  
*Association of p53 codon 72 polymorphism and MDM2 SNP309 with clinical outcome of advanced nonsmall cell lung cancer.*  
Wiley InterScience, early view
30. Hartmann E, Fernández V, Stoecklein H, Hernández L, Campo E, Rosenwald A, (2007)  
*Increased MDM2 expression is associated with inferior survival in mantle cell lymphoma, but not related to the MDM2 SNP309.*  
Haematologica 92: 547-575
31. Hirata H, Hinoda Y, Kikuno N, Kawamoto K, Suehiro Y, Tanaka Y, Dahiya R (2007)  
*MDM2 SNP309 polymorphism as risk factor for susceptibility and poor outcome in renal cell carcinoma.*  
Clinical Cancer Research 13: 4123-4129

32. Honda R, Yasuda H (2000)  
*Activity of Mdm2, a ubiquitin ligase, toward p53 or itself is dependent on the RING finger domain of the ligase.*  
Oncogene 19: 1473-1476
33. Hu Z, Ma H, Lu D, Qian J, Zhou J, Chen Y, Xu L, Wang X, Wei Q, Shen H (2006)  
*Genetic variants in the MDM2 promoter and lung cancer risk in a Chinese population.*  
International Journal of Cancer 118: 1275–1278
34. Inazuka M, Tahira T, Horiuchi T, Harashima S, Sawabe T, Kondo M, Miyahara H, Hayashie K (2000)  
*Analysis of p53 tumour suppressor gene somatic mutations in rheumatoid arthritis synovium.*  
Rheumatology 39: 262-266
35. Iwakuma T, Lozano G (2003)  
*MDM2, an introduction.*  
Molecular Cancer Research 1: 993-1000
36. Keydar I, Chen L, Karby S, Weiss FR, Delarea J, Radu M, Chaitcik S, Brenner HJ (1997)  
*Establishment and characterization of a cell line of human breast cancer origin.*  
European journal of cancer, 15: 659-670
37. Koecke HU, Emschermann P, Härle E (2000)  
*Biologie – Lehrbuch der allgemeinen Biologie für Mediziner und Naturwissenschaftler. 4th ed.*  
Schattauer Stuttgart New York

38. Komarova EA, Krivokrysenko V, Wang K, Neznanov N, Chernov MV, Komarov PG, Brennan ML, Golovkina TV, Rokhlin OW, Kuprash DV, Nedospasov SA, Hazen SL, Feinstein E, Gudkov AV (2005)  
*P53 is a suppressor of inflammatory response in mice.*  
The FASEB Journal express article 10: 1-21
39. Kullmann F, Judex M, Neudecker I, Lechner S, Justen HP, Green DR, Wessinghage D, Firestine GS, Gay S, Schoomerich J, Muller-Ladner U (1999)  
*Analysis of the p53 tumor suppressor gene in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts.*  
Arthritis and Rheumatism 42: 1594-1600
40. Leach FS, Tokino T, Meltzer P, Burrell M, Oliner JD, Smith S, Hill DE, Sidransky D, Kinzler KW, Vogelstein B (1993)  
*P53 mutation and MDM2 amplification in human soft tissue sarcomas.*  
Cancer Research 53: 2231-2234
41. Leech M, Xue JR, Dacumos A, Hall P, Santos L, Yang Y, Li M, Kitching AR, Morand EF (2008)  
*The tumour suppressor gene p53 modulates the severity of antigen-induced arthritis and the systemic immune response*  
Clinical and Experimental Immunology 152: 345-353
42. Li G, Zhai X, Zhang Z, Chamberlain RM, Spitz MR, Wei Q (2006)  
*MDM2 gene promoter polymorphisms and risk of lung cancer: a case-control analysis.*  
Carcinogenesis 27: 2028-2033

43. Liang H, Atkins H., Abdel- Fattah R, Jones SN, Lunec J (2004)  
*Genomic organisation of the human MDM2 oncogene and relationship to its alternatively spliced mRNAs.*  
Gene 338:217-223
44. Lind H, Zienolddiny S, Ekstrøm PO, Skaug V, Haugen A (2006)  
*Association of a functional polymorphism in the promoter of the MDM2 gene with risk of nonsmall cell lung cancer.*  
International Journal of Cancer 119: 718-721
45. Liu G, Wheatley-Price P, Zhou W, Park S, Heist RS, Asomaning K, Wain JC, Lynch TJ, Su L, Christiani DC (2007)  
*Genetic polymorphism of MDM2, cumulative cigarette smoking and nonsmall cell lung cancer risk.*  
International Journal of Cancer 122: 915-918
46. Löffler G, Petrides PE (1998)  
*Biochemie und Pathobiochemie.*  
Springer Berlin Heidelberg New York
47. 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.*  
Journal of the National Cancer Institute 98: 285-288

48. Mittelstrass K, Sauter W, Rosenberg A, Illig T, Timofeeva M, Klopp N, Dienemann H, Meese E, Sybrecht G, Woelke G, Gebulla M, Degen M, Morr H, Drings P, Groeschel A, Grosse Kreymborg K, Haeußinger K, Hoeffken G, Schmidt C, Gilge B, Schmidt W, Ko YD, Tauscher D, Chang-Claude J, Wichmann HE, Bickelboeller H, Risch A (2008)  
*Early onset lung cancer, cigarette smoking and the SNP309 of the murine double minute-2 (MDM2) gene*  
BMC Cancer 8
49. Moll UM, Petrenko O (2003)  
*The MDM2-p53 interaction.*  
Molecular Cancer Research 1: 1001-1008
50. Müller-Ladner U, Pap T (2005)  
*Pathogenesis of RA: more than just immune cells.*  
Zeitschrift für Rheumatologie 64: 396-401
51. Mullighan CG, Fanning GC, Chapel HM, Welsh KI (1997)  
*TNF and lymphotoxin- $\alpha$  polymorphisms associated with common variable immunodeficiency: role in the pathogenesis of granulomatous disease.*  
The Journal of Immunology 159: 6236-6241
52. Ohmiya N, Taguchi A, Mabuchi N, Itoh A, Hirooka Y, Niwa Y, Goto H (2006)  
*MDM2 promoter polymorphism is associated with both an increased susceptibility to gastric carcinoma and poor prognosis.*  
Journal of Clinical Oncology 24: 4434-4440
53. 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

54. Oren M. (2003)  
*Decision making by p53: life, death and cancer.*  
Cell Death and Differentiation 10: 431-442
55. Pine SR, Mechanic LE, Bowman ED, Welsh JA, Chanock SC, Shields PG, Harris CC (2006)  
*MDM2 SNP309 and SNP354 are not associated with lung cancer risk.*  
Cancer Epidemiology Biomarkers 15: 1559-1561
56. Rème T, Travaglio A, Gueydon E, Adla L, Jorgensen C, Sany J (1998)  
*Mutations of the p53 tumour suppressor gene in erosive rheumatoid synovial tissue.*  
Clinical Experimental Immunology 111: 353-358
57. Römer L, Klein C, Dehner A, Kessler H, Buchner J (2006)  
*p53 – ein natürlicher Krebskiller: Einsichten in die Struktur und  
Therapiekonzepte.*  
Angewandte Chemie 118: 6590-6611
58. Ruijs MWG, Schmidt MK, Nevanlinna H, Tommiska J, Aittomäki K, Pruntel R, Verhoef S, van't Veer LJ (2007)  
*The single-nucleotide polymorphism 309 in the MDM2 gene contributes to the Li-Fraumeni syndrome and related phenotypes.*  
European Journal of Human Genetics 15: 110-114
59. Salvador G, Sanmarti R, Garcia-Peiró A, Rodriguez-Cros JR, Munoz-Gomez J, Canete JD (2005)  
*P53 expression in rheumatoid and psoriatic arthritis synovial tissue and association with joint damage.*  
Annals of the rheumatic diseases 64: 183-187

60. 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.*  
Clinical Cancer Research 13: 3215-3220
61. Schmidt MK, Reincke S, Broeks A, Braaf LM, Hogervorst FBL, Tollenaar RAEM, Johnson N, Fletcher O, Peto J, Tammiska J, Blomqvist C, Nevanlinna HA, Healey CS, Dunning AM, Pharoah PDP, Easton DF, Dörk T; Van't Veer LJ (2007)  
*Do MDM2 SNP309 and TP53 R72P interact in breast cancer susceptibility? A large pooled series from the Breast Cancer Association Consortium.*  
Cancer Research 67: 9584-9590
62. Sotamaa K, Liyanarachchi S, Mecklin JP, Järvinen H, Aaltonen LA, Peltomäki P, de la Chapelle A (2005)  
*P53 Codon 72 and MDM2 SNP309 polymorphisms and age of colorectal cancer onset in Lynch Syndrome.*  
Clinical Cancer Research 19: 6840-6844
63. Steele RJC, Thompson AM, Hall PA, Lane DP (1998)  
*The p53 tumour suppressor gene.*  
British Journal of Surgery 85: 1460-1467
64. Sun Y, Cheung HS (2002)  
*P53, proto-oncogene and rheumatoid arthritis.*  
Seminars in Arthritis and Rheumatism 31: 299-310

65. Talseth BA, Meldrum C, Suchy J, Kurzawski G, Lubinski J, Scott RJ (2006)  
*MDM2 SNP309 T>G alone or in combination with the TP53 R72P polymorphism does not appear to influence disease expression and age of diagnosis of colorectal cancer in HNPCC patients.*  
International Journal of Cancer 120: 563-565
66. Taranto E, Xue JR, Lacey D, Hutchinson P, Smith M, Morand EF, Leech M (2005)  
*Detection of the p53 regulator MDM2 in rheumatoid arthritis.*  
Journal of Rheumatology 32: 424-429
67. Taubert H, Thamm B, Meye A, Bartel F, Rost AK, Heidenreich D, John V, Brandt J, Bache M, Würfl P, Schmidt H, Riemann D (2000)  
*The p53 status in juvenile chronic arthritis and rheumatoid arthritis.*  
Clinical Experimental Immunology 122: 264-269
68. Terry K, McGrath M, Lee IM, Buring J, De Vivo (2008)  
*MDM2 SNP309 is associated with endometrial cancer risk.*  
Cancer epidemiology, biomarkers & prevention 17: 983-986 I
69. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ (2000)  
*Surfing the p53 network.*  
Nature 408: 307-310
70. Walsh CS, Miller CW, Karlan BY, Koeffler HP (2006)  
*Association between a functional single nucleotide polymorphism in the MDM2 gene and sporadic endometrial cancer risk.*  
Gynecologic Oncology 104: 660-664

71. Wasielewski M, Nagel JHA, Brekelmans C, Klijn JGM, van den Ouweland A, Meijers-Heijboer H, Schutte M (2007)  
*MDM2 SNP309 accelerates familial breast carcinogenesis independently of estrogen signaling.*  
Breast cancer research and treatment 104: 153-157
72. Wilkening S, Hemminki K, Rudnai P, Gurzau E, Koppova K, Försti A, Kumar R (2007a)  
*No association between MDM2 SNP309 promoter polymorphism and basal cell carcinoma of the skin.*  
British Journal of Dermatology 157: 375-377
73. Wilkening S, Bermejo JL, Hemminki K (2007b)  
*MDM2 SNP309 and cancer risk: a combined analysis.*  
Carcinogenesis 28: 2262-2267
74. Yamanishi Y, Boyle DL, Pinkoski MJ, Mahboubi A, Lin T, Han Z, Zvaifler NJ, Green DR, Fireseitn FS (2002)  
*Regulation of joint destruction and inflammation by p53 in collagen- induced Arthritis.*  
American Journal of Pathology 160: 123-130
75. Yamanishi Y, Boyle DL, Rosengren S, Green DR, Zvaifler NJ, Firestine GS (2002)  
*Regional analysis of p53 mutations in rheumatoid arthritis synovium*  
PNAS 99: 10025-10030

76. Yamanishi Y, Boyle DL, Green DR, Keystone EC, Connor A, Zollman S, Firestine GS (2005)  
*p53 tumor suppressor gene mutations in fibroblast-like synoviocytes from erosion synovium and non-erosion synovium in rheumatoid arthritis.*  
Arthritis research & therapy 7: R12-R18
77. Yoon YJ, Chang HY, Ahn SH, Kim JK, Park YK, Kang DR, Park JY, Myoung SM, Kim DY, Chon CY, Han KH (2008)  
*MDM2 and p53 polymorphisms are associated with the development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic Hepatitis B.*  
Carcinogenesis Advanced Access
78. Zawlik I, Kita D, Vaccarella S, Mittelbronn M, Franceschi S, Ohgaki H (2008)  
*Common polymorphisms in the MDM2 and TP53 genes and the relationship between TP53 mutations and patient outcomes in Glioblastomas.*  
Brain Pathology
79. Zelllinienverzeichnis: [http://www.dsmz.de/human\\_and\\_animal\\_cell\\_lines/info.php?dsmz\\_nr=243&from=cell\\_lineindex&select=S&term=&preselect=human;](http://www.dsmz.de/human_and_animal_cell_lines/info.php?dsmz_nr=243&from=cell_lineindex&select=S&term=&preselect=human;)

## 8 Anhang

### 8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Mdm2-p53-Interaktion: p53 stimuliert die Expression von Mdm2, Mdm2 inhibiert im Gegenzug die p53-Aktivität, indem es seine Degradation im Nucleus und Zytoplasma fördert, seine Transkriptionsaktivität blockt und seinen Export ins Zytoplasma unterstützt [Moll et al., 2003].....	20
Abbildung 2.2:schematische Darstellung der Mdm2 Promoterregion, die den SNP309 enthält [Bond et al., 2004].....	22
Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des TNFa-Signalwegs [Baud et Karin, 2001]25	
Abbildung 3.1: pCR 2.1 -TOPO .....	43
Abbildung 5.1: Darstellung der Methodik im Fließdiagramm.....	63
Abbildung 5.2: Blockdiagramm zur Darstellung der Genotyp-Verteilung innerhalb der untersuchten Populationen.....	73
Abbildung 5.3: Darstellung der Probe 391 auf SDS-Gel nach enzymatischem Verdau	74
Abbildung 5.4: Darstellung der in den 12 Bakterienklonen vermehrten und enzymatisch ausgeschnittenen DNA-Fragmente.....	75
Abbildung 5.5: schmetaische Darstellung der bei der Sequenzierung nachgewiesenen Basendifferenzen der mittels Bakterien vermehrten aufgereinigten DNA-Fagmente.....	76

## 8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 4.1: Pipettierschema der PCR .....	51
Tabelle 4.2: Profil des verwendeten PCR-Programms .....	51
Tabelle 4.3: Pipettierschema für ein 15 % SDS-Gel .....	54
Tabelle 5. 1 :Distribution des SNP309 in der Normalbevölkerung.....	64
Tabelle 5.2: geschlechtsspezifische Distribution.....	65
Tabelle 5.3: Distribution des SNP309 unter an rheumatoider Arthritis Erkrankten .....	67
Tabelle 5.4: geschlechtsspezifische Verteilung innerhalb der Gruppe, der an rheumatoider Arthritis Erkrankten.....	67
Tabelle 5.5: Distribution des SNP309 unter an CVID Erkrankten.....	69
Tabelle 5.6: geschlechtsspezifische Verteilung innerhalb der Gruppe, der an CVID Erkrankten .....	69
Tabelle 5.7: Verteilung des SNP 309 unter an CVID-erkrankten Patienten mit oder ohne Lymphadenopathie.....	70
Tabelle 5.8: Verteilung des SNP309 unter an CVID-erkrankten Patienten mit oder ohne Splénomegalie .....	71
Tabelle 5.9: Verteilung des SNP309 unter an CVID-erkrankten Patienten mit oder ohne Granulome.....	72

## 9 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Müller  
Vorname: Monika Barbara  
Geburtsdatum: 17.11.1977  
Geburtsort: Augsburg  
Familienstand: ledig

### Chronologie:

#### Schulbildung

1984-1988 Grundschule Ansbach-Nord  
1988-1997 Theresien-Gymnasium Ansbach  
1997 Allgemeine Hochschulreife

#### Freiwilligendienst

1997-1998 Diakonisches Jahr im Ausland  
Behindertenheim „Sonnenhof“ (Bischwiller/Frankreich)

#### Berufsausbildung

1998-2001 Ausbildung zur Krankenschwester  
Krankenhaus Martha-Maria, Nürnberg  
2001 Staatliche Prüfung in der Krankenpflege

Studium

- 2001-2008 Studium der Humanmedizin
- 08/2003 Ärztliche Vorprüfung
- 08/2004 1 Semester ERASMUS-Studium an der Universität Oslo
- 08/2005 Beginn der Doktorarbeit am Institut Virologie
- 02/2007 Praktisches Jahr
- 06/2008 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

## 10 Danksagung

Ich möchte mich bei allen die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben bedanken, insbesondere :

Herrn Prof. Dr. Müller Lantzsch und Herrn Prof. Dr. Pfreundschuh möchte ich für die freundliche Aufnahme in ihre Institute danken.

Herrn Prof. Dr. Römer danke ich für die Überlassung des Themas und die praktische und theoretische Betreuung der Arbeit.

Der gesamten Arbeitsgruppe Römer insbesondere Frau Dr. Heyne und Frau Reich, dem Team der Virologie insbesondere Frau Dr. Abou Omar, Frau Appel und Frau Best danke ich für vielseitige Hilfe bei der Etablierung der Methodik und der praktischen Durchführung der Arbeit.

Herrn Dr. Aßmann, Herrn Dr. Bittenbring und Herrn Menzel danke ich für die Kooperation bei der Auswertung der Rheumaprobe.

Herrn Dr. Warnatz danke ich für die Bereitstellung der DNA-Proben und Daten bezüglich der COVID-Patienten.

Herrn PD. Dr. Gräber danke ich für die statistische Auswertung der Daten und besonders für die dafür aufgewendete Geduld.

Meinen Eltern und Freunden möchte ich für alle Unterstützung und Hilfe danken, die sie mir auf während der Promotionszeit gegeben haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Herrn Jesus Christus.