

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

(Ärztlicher Direktor: PD Dr. Thomas Klöss)

Bedeutung von Polymorphismen in Genen des P53-PATHWAYS für das Altern

Dissertation

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

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

von **Sebastian Groß**

geboren am 06.01.1988 in Ilmenau

Betreuer: PD Dr. Frank Bartel

Gutachter: 1. PD Dr. F. Bartel
2. Prof. Dr. A. Simm
3. PD Dr. Ch. Blattner

09.04.2013

10.03.2014

Meinen Eltern

Referat

Altern ist der Verlust der Homöostasefähigkeit des Körpers. Das bedeutet eine zunehmende Unfähigkeit, sich wechselnden externen und internen Bedingungen anzupassen. Im Verlauf der Zeit kommt es zur Akkumulation von molekularen und zellulären Schäden, die durch unterschiedlichste Einflüsse auf die Zelle entstehen. Ein Hauptregulator der Stressantwort von Zellen auf diese Einflüsse ist das Tumorsuppressorgen p53. In Mäusen korreliert die Aktivität von P53 mit der Lebensspanne.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb herauszufinden, ob bestimmte Genpolymorphismen (SNPs) in Mitgliedern des p53-Pathways mit einer Langlebigkeit beim Menschen assoziiert sind. Dabei wurden fünf SNPs in den Genen von p53, MDM2, MDM4 und PPP2R2B untersucht. Die Studienpopulation bestand aus 127 hoch betagten Menschen, die im Alter von 91 bis 103 Jahren (Mittelwert 93,5 Jahre) verstorben sind. Die Kontrollgruppe bestand aus 171 jungen Menschen (Mittelwert 27,7 Jahre) mit regional vergleichbarer Herkunft. Die Analyse der Polymorphismen erfolgte mittels direkter Sequenzierung der genomischen DNA sowie der real-time PCR. Beim Vergleich der Allelfrequenzen der SNPs zwischen alter Studien- und junger Kontrollpopulation wurde der χ^2 -Test verwendet. Zusätzlich wurden Überlebenszeitanalysen mittels *Kaplan-Meier-Analyse* und *F-Test* durchgeführt.

Innerhalb der weiblichen *alten* Studienpopulation lebten jene Frauen signifikant länger, die Träger des Pro-Allels des P53 Codon72-SNP waren ($p=0.046$), ebenso wie G-Allel-Träger des MDM2 SNP309 ($p=0.002$). Im Gegensatz dazu war bei den männlichen *alten* Studienteilnehmern kein Unterschied zu erkennen (Codon72: $p=0.925$, SNP309: $p=0.75$). Zusätzlich wurden die Allelhäufigkeiten zwischen *junger* Kontroll- und *alter* Studienpopulation verglichen. Auch hier konnte die Beobachtung gemacht werden, dass innerhalb der Gruppe der *alten* Frauen das Pro-Allel ($p=0.045$) und das G-Allel ($p=0.009$) signifikant häufiger vertreten waren als in der *jungen* Kontrollpopulation. Beim MDM4-Gen hingegen war kein Unterschied zwischen den SNPs zu erkennen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl das Pro-Allel des Codon 72-SNP als auch das G-Allel des SNP309 mit einer verlängerten Lebenszeit einher gehen. Wichtig ist, dass dieser Effekt geschlechtsspezifisch ist. Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass genetische Varianten, die mit einer *niedrigeren* Aktivität von P53 – und damit einem *erhöhten* Tumorrisiko – assoziiert sind, mit einer längeren Lebenszeit korrelieren.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Was ist Altern?	1
1.2	P53 und der Einfluss auf das Altern	2
1.2.1	Aufbau und Aufgaben innerhalb der Zelle	2
1.2.2	Ausgewählte Erkrankungen und Modelle	5
1.3	Der Effekt weiterer wichtiger Proteine auf P53	6
1.3.1	MDM2	6
1.3.2	MDM4	7
1.3.3	Die Proteinphosphatase 2A	7
1.3.4	Ausgewählte Modelle	8
1.4	Der Einfluss von Polymorphismen auf Signalwege des p53-Pathways	9
1.4.1	Der p53 Codon 72-Polymorphismus (rs1042522)	9
1.4.2	MDM2 und der SNP309 (rs2279744)	10
1.4.3	MDM4 und der SNP31826 (rs1563828)	12
1.4.4	MDM4 und der SNP34091 (rs4245739)	13
1.4.5	PPP2R2B-Genpolymorphismus (rs319217)	14
2	Zielsetzung	16
3	Material und Methoden	17
3.1	Material	17
3.1.1	Studien- und Kontrollpopulation	17
3.1.2	Primer	19
3.1.3	TaqMan SNP Genotyping-Assays	19
3.1.4	Verwendete Enzyme	20
3.1.5	Verwendete Kits	20
3.1.6	Eingesetzte Chemikalien	20
3.1.7	Geräte und Verbrauchsmaterialien	20
3.1.8	Puffer und Lösungen	21
3.2	Methoden	21

3.2.1	DNA-Isolation	21
3.2.2	Polymerasekettenreaktion und DNA-Untersuchungen	22
3.2.3	Sequenzierung und Fällung	23
3.2.4	Statistische Analysen	25
4	Ergebnisse	26
4.1	Untersuchungen zum P53 Codon 72-Polymorphismus	26
4.1.1	Vergleich der Allelverteilung zwischen jungen und alten Menschen . . .	26
4.1.2	Vergleich der Überlebensdauer mit den Allelen	29
4.2	Untersuchungen zum MDM2 SNP309-Polymorphismus	31
4.2.1	Vergleich der Allelverteilung zwischen jungen und alten Menschen . . .	32
4.2.2	Vergleich der Überlebensdauer mit den Allelen	34
4.3	Untersuchungen zum MDM4 SNP31826-Polymorphismus	36
4.3.1	Vergleich der Allelverteilung zwischen jungen und alten Menschen . . .	37
4.3.2	Vergleich der Überlebensdauer mit den Allelen	38
4.4	Untersuchungen zum MDM4 SNP34091-Polymorphismus	41
4.4.1	Vergleich der Allelverteilung zwischen jungen und alten Menschen . . .	41
4.4.2	Vergleich der Überlebensdauer mit den Allelen	43
4.5	Untersuchungen zum rs319217-Polymorphismus im PPP2R2B-Gen	45
4.5.1	Vergleich der Allelverteilung zwischen jungen und alten Menschen . . .	46
4.5.2	Vergleich der Überlebensdauer mit den Allelen	48
4.6	Untersuchungen zur Kombination mehrerer Polymorphismen	50
4.6.1	Kombination von P53 Codon 72 und SNP309	50
5	Diskussion	53
5.1	P53 und der Codon 72-Polymorphismus	54
5.2	MDM2 und der SNP309	58
5.3	MDM4 und der SNP31826	59
5.4	MDM4 und der SNP34091	61
5.5	PP2A und die regulatorische PPP2R2B-Untereinheit	61
5.6	Betrachtungen zum Studiendesign	63
5.6.1	Gruppenzusammensetzung	63
5.6.2	Wahl der Kontrollpopulation	64
5.6.3	Todesursachen in der Studienpopulation	67

6 Zusammenfassung	68
7 Literaturverzeichnis	70
8 Thesen	78

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIF	apoptosis-inducing factor
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar(e)
Bsp.	Beispiel
bzw.	beziehungsweise
CDK	cyclin-dependent kinase
d.h.	das heißt
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Östrogenrezeptor
et al.	et altera
IGF1	insulin-like growth factor 1
kb	Kilobase(n)
kDA	Kilodalton
mRNA	“messenger RNA” – Boten-RNS
miRNA	microRNA
μ L	Mikroliter
NES	Nuclear Export Sequence
NLS	Nuclear Localization Sequence
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction
rpm	revolutions per minute
SNP	single nucleotide polymorphism
SST	sequenzspezifische Transaktivierung
Tab.	Tabelle
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
UTR	untranslated region
WHO	Weltgesundheitsorganisation (“world health organization”)
z.B.	zum Beispiel

1

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Was ist Altern?

“Altern ist die ständige Abnahme der Überlebenswahrscheinlichkeit bewirkt durch intrinsische Prozesse.”

So beschreiben SCHMIDT et al. den Effekt des Alterns auf den Organismus (Schmidt et al., 2007). Heutzutage nimmt der Anteil der alten und sehr alten Menschen in Deutschland kontinuierlich zu. Nach Angaben des statistischen Bundesamtes stieg erneut die Lebenserwartung. So beträgt sie für neugeborene Jungen 77 Jahre und 6 Monate – für neugeborene Mädchen 82 Jahre und 7 Monate (Bundesamt, 2010). Noch im Deutschen Reich betrug die durchschnittliche Lebenserwartung in der Berichtsperiode 1871/1881 für Jungen 35 Jahre und 7 Monate, für neugeborene Mädchen 38 Jahre und 5 Monate. Die Lebenserwartung hat sich innerhalb der vergangenen 130 Jahre durch die industrielle Weiterentwicklung, durch gesteigerte Lebensqualität und nicht zuletzt durch den medizinischen Fortschritt somit mehr als verdoppelt. Gleichzeitig aber ist das Alter heute der bedeutsamste prädisponierende Faktor für die wichtigsten schweren Erkrankungen. Doch welche Prozesse führen auf zellulärer Ebene zu dem eben beschriebenen Phänomen? Welche Vorgänge bewirken, dass sich Zellen nicht unbegrenzt weiter teilen und irgendwann dem programmierten Zelltod unterliegen?

Altern ist verbunden mit der Unfähigkeit der somatischen Zellen sich zu erhalten und zu reparieren (Kirkwood und Austad, 2000). Es wurde gezeigt, dass altersassoziierte Gewebedysfunktion durch eine Akkumulation von molekulären und zellulären Schäden verursacht wird (Hasty et al., 2003). Mutationen der DNA, die zur genomischen Instabilität führen, können zu einer solchen Dysfunktion beitragen.

Dabei verhindern Gene, die in DNA-Reparaturpathways eingeschlossen sind (sog. *Caretaker-Gene*), dass sich DNA-Schäden akkumulieren und möglicherweise Krebs in erneuerbaren Geweben entwickelt. Sie können außerdem dazu beitragen, gesund zu bleiben, und eine lange Lebensdauer bewirken (Bürkle, 2000). Falls diese Gene Mutationen aufweisen, kann es zu sog. Progerie-Syndromen, wie dem Werner- und Cockayne-Syndrom, kommen. Die betroffe-

nen Patienten zeigen Merkmale eines vorzeitigen Alterns, wie Haarausfall, Fettgewebs- und Hautatrophie, Osteoporose und verstärkte Pigmentierung, und haben zusätzlich eine erhöhte Inzidenz von bösartigen Tumoren.

Zusätzlich existieren Gene, die für den Zelltod und Zellzyklusarrest verantwortlich sind (sog. *Gatekeeper-Gene*). Zu ihnen gehören die klassischen Tumorsuppressorgene (Campisi, 2003). Sie sind regelmäßig durch Mutationen oder epigenetische Ausschaltung bei einer Vielzahl von Neoplasien inaktiviert. Allerdings ist der Zusammenhang zwischen Tumorsuppressoren und dem Alterungsprozess weit weniger klar als bei DNA-Reparaturgenen. Es konnte gezeigt werden, dass der Verlust eines Tumorsuppressors zu einer erhöhten Prädisposition von Krebs führt, während eine Vervielfachung zu einem besseren Schutz gegen Tumorentwicklung führt. Diese verstärkte Aktivität könnte also zu einem längeren Überleben beitragen. Auf der anderen Seite könnten Tumorsuppressoren zu einer Beeinträchtigung der Proliferation von Stammzellen und zur erhöhten Apoptoserate beisteuern. Außerdem führen sie zu einer vermehrten Seneszenz, einem zellulären Programm des irreversiblen Zellzyklusarrests, welches die Zelle unempfindlich auf äußere Wachstumsstimuli macht (Lowe et al., 2004). Seneszenten Zellen werden gehäuft in Geweben von älteren Patienten gefunden. Das deutet darauf hin, dass Seneszenz zum Altern des Organismus beiträgt (Dimri et al., 1995). Eines der wichtigsten Tumorsuppressorgene ist p53, worauf im Folgenden genauer eingegangen werden soll.

1.2 P53 und der Einfluss auf das Altern

1.2.1 Aufbau und Aufgaben innerhalb der Zelle

Das P53-Protein, der wohl bekannteste Tumorsuppressor, wurde bereits im Jahre 1979 (DeLeo et al., 1979; Linzer und Levine, 1979; Lane und Crawford, 1979) entdeckt. Doch auch noch heutzutage überrascht es die Wissenschaftler immer wieder aufs Neue. Bei seiner Entdeckung ging man davon aus, es handele sich um ein Onkogen (Crawford et al., 1981) – um es nachträglich knapp ein Jahrzehnt später zum Tumorsuppressor zu deklarieren (Finlay et al., 1989). Ursprünglich wurde es als Transkriptionsaktivator charakterisiert – heute wissen wir, dass es auch als Repressor der Transkription fungieren kann (Menendez et al., 2009). Und gerade als man die P53-Aktivitäten auf den Zellkern eingrenzen konnte, wurde klar, dass P53 auch im Zytoplasma eine Vielzahl von Prozessen steuert (Green und Kroemer, 2009).

Eine Vielzahl von Studien zeigte, dass P53 sowohl auf die Tumorentstehung als auch auf das Altern einen Einfluss hat. Für einen *beschleunigten* Alterungsprozess spricht die Fähigkeit von P53, Apoptose und Seneszenz auszulösen, was zu einer Gewebeatrophie (Apoptose) und dem Verlust der Gewebsregeneration (Seneszenz) führt. Für einen *verlangsamten* Alterungsprozess spricht, dass P53 beschädigte und dysfunktionale Zellen entfernen (Apoptose) und ihre Proliferation (Seneszenz) verhindern kann und somit einer Krebsentstehung vorbeugt. Dieser Effekt wird mit dem Begriff der *antagonistischen Pleiotropie* beschrieben.

Das p53-Gen liegt auf dem Chromosom 17p13.1 und besteht aus 11 Exonen. Sein Transkript hat eine Länge von 2629 bp; das Protein ist aus 393 Aminosäuren zusammengesetzt und hat eine Molekularmasse von 53 kDA (Bojesen und Nordestgaard, 2008). Dieses Phosphoprotein kann in verschiedene funktionelle Domänen unterteilt werden.

Am N-Terminus befindet sich eine Transaktivierungs-Domäne, wodurch die Genexpression von p53 durch die Bindung unterschiedlicher Proteine beeinflusst werden kann. Insbesondere sind hierbei die Onkogene MDM2 und MDM4 hervor zu heben, welche die transkriptionelle Aktivität von p53 inhibieren (Shvarts et al., 1996). Daran schließt sich eine Prolin-reiche Sequenz an. Angrenzend befindet sich die zentrale DNA-bindende Domäne, welche P53 ermöglicht, selber als Transkriptionsfaktor für eine Vielzahl unterschiedlicher Gene zu wirken. Am C-Terminus befindet sich eine kurze Domäne mit der Fähigkeit, das Bindungsverhalten der zentralen DNA-bindenden Domäne an spezifische Sequenzen zu regulieren (Levine, 1997).

Wird die DNA einer Zelle geschädigt, z.B. durch Doppelstrangbrüche bei γ -Strahlung oder Schäden durch Chemotherapeutika, kommt es zur Aktivierung von p53. Auch Hypoxie führt zur erhöhten P53-Konzentration und zur Aktivierung des P53-Proteins (Graeber et al., 1996).

Normalerweise wird in der Zelle die P53-Konzentration, bedingt durch dessen kurze Halbwertszeit von ca. 20 Minuten, niedrig gehalten. Zusätzlich wird durch Ubiquitin-vermittelte Proteolyse der Abbau von P53 in den Proteasomen gewährleistet. Hierbei spielt MDM2 als E3-Ubiquitin-Ligase wahrscheinlich die größte Rolle (Honda et al., 1997).

Kommt es nun zu zytotoxischem Stress, erhöht sich die intrazelluläre P53-Konzentration und -Aktivität. Dies wird gewährleistet durch einen verminderten Abbau des Proteins und somit einer verlängerten Halbwertszeit, sowie der Zunahme der p53-mRNA Translationsrate. Der Anstieg des P53-Levels ist dabei proportional zur Stärke des DNA-Schadens (Levine,

1997). Im Anschluss werden verschiedene zelluläre Prozesse, wie z.B. die Regulation des Zellzyklus, Apoptose, Seneszenz und DNA-Reparatur, ausgelöst (Sionov und Haupt, 1999).

Zellzyklusarrest. Die Induktion von p21 durch P53 führt zu einem Arrest in der G1-Phase (Seneszenz). Dieser wird durch die Hemmung der Cyklin-abhängigen Kinasen (CDKs) vermittelt, welche im aktiven Zustand das Retinoblastom-Protein phosphorylieren. In seiner hypophosphorylierten Form verhindert das Rb-Protein den Übergang von der G1 zur S-Phase (Meng und El-Deiry, 1998). Zusätzlich kann p21 durch Hemmung der DNA-Polymerase delta die DNA-Replikation verhindern (Li et al., 1994). Des Weiteren induziert P53 die Produkte der Gene von GADD45 und 14-3-3 sigma, welche ihrerseits einen G2-Arrest vermitteln (Hermeking et al., 1997).

Apoptose. Soll eine Zelle, z.B. auf Grund zu starker DNA-Schäden, den programmierten Zelltod (Apoptose) einleiten, so kann dies durch sequenzspezifische Transaktivierung (SST) sowie auch SST-unabhängig erfolgen (Ding und Fisher, 1998). Viele Gene, die Ziel der transkriptionellen Aktivierung durch P53 sind, sind im Einzelnen nicht in der Lage, einen signifikanten Zelltod auszulösen. Werden sie aber durch P53 gemeinsam aktiviert, kann dies zu einer apoptotischen Antwort der Zelle führen. So hemmt P53 die Expression des IGF1-Rezeptors, welcher seinerseits Überlebenssignale an die Zelle weitergibt. Zusätzlich werden wichtige Todesrezeptoren wie Fas/CD-95 und KILLER/DR5 aktiviert und die Expression von Bax verstärkt. Dieses Protein ermöglicht die Freisetzung von Cytochrom C und des Apoptosis-Inducing Factor (AIF) aus den Mitochondrien und löst somit eine Aktivierung der Caspase-Kaskade aus (Susin et al., 1999). Die Caspasen selbst spalten zelleigene Proteine wie Aktin und Laminin und aktivieren weitere Nukleasen, die die zelluläre DNA zerteilen. Verschiedene Studien belegen, dass P53 durch Transrepression unterschiedlicher Proteine die Apoptose auslösen kann. Das anti-apoptotische Protein Bcl-2 wird durch P53 gehemmt und verhindert seinerseits gleichzeitig die Freisetzung von Cytochrom C und AIF aus den Mitochondrien und den Import von P53 in den Zellkern. Weitere wichtige Proteine, die durch P53 unterdrückt werden, sind MAP4, IMPD und Presenilin-1. Zusätzlich unterdrückt P53 die Transkription ribosomaler Gene (Budd und Grummt, 1998).

Wie wichtig ein harmonisches Zusammenwirken all dieser Faktoren ist, zeigt sich umso mehr, wenn Veränderungen im P53-Pathway auftreten.

1.2.2 Ausgewählte Erkrankungen und Modelle

Anhand der nachfolgend ausgewählten Erkrankungen und Modelle lässt sich zeigen, welchen Effekt p53 auf den Organismus und dessen Alterung hat.

Tumor-Mutationen. Es konnte gezeigt werden, dass in über 50% der spontanen Tumoren das p53-Gen mutiert ist und somit keine adäquate Funktion der Tumorsuppression mehr gewährleistet ist (Hollstein et al., 1991). In den verbleibenden Tumoren, die Wildtyp-p53 besitzen, konnten überwiegend Veränderungen der Onkogene MDM2 und MDM4 nachgewiesen werden, welche im p53-Pathway sehr eng mit p53 verbunden sind und zu dessen Abschwächung führen (Riemenschneider et al., 1999) (siehe Kapitel 1.3).

Li-Fraumeni-Syndrom. Bei dem 1969 von LI und FRAUMENI beschriebenen autosomal-dominant vererbten Syndrom handelt es sich um eine heterozygote Keimbahnmutation des p53-Gens. Die Patienten erkranken frühzeitig an einer Vielzahl unterschiedlicher Tumoren, wie zum Beispiel Mamma-Karzinomen, Weichteil-Sarkomen, Hirntumoren, Osteosarkomen, Leukämien und anderen bösartigen Tumoren (Malkin et al., 1990).

p53-Knockout. Ein Knockout von p53 in Mäusen bewirkte zwar eine *normale* Embryonalentwicklung, aber zugleich ein *frühzeitiges* Wachstum von einer Vielzahl unterschiedlicher Tumoren und eine dadurch deutlich verkürzte Überlebenszeit (Donehower et al., 1992).

p53^{+/m}. Das *m*-Allel entstand zufällig durch ein Experiment, in dem die ersten sechs Exone von p53 deletiert wurden. Diese p53 Form erhöhte chronisch die Aktivität des Wildtyp-p53. Die mutierten Mäuse entwickelten weniger Lymphome als die Wildtyp-(p53^{+/+})-Kontrollen, was auf eine verstärkte Tumorsuppression hindeutet. Außerdem zeigte sich ein früheres Auftreten von *Alterserscheinungen*, welche eine reduzierte Lebenserwartung, Osteoporose und generalisierte Organatrophie beinhalten (Tyner et al., 2002). Diese Beobachtungen könnten durch die chronisch erhöhte p53-abhängige Apoptosetätigkeit und Seneszenz zustande kommen.

„Super p53“. Es wurden Mäuse erzeugt, die zusätzliche Kopien des p53-Gens beinhalten. Sie zeigten ebenfalls eine erhöhte P53-Aktivität, aber - im Gegensatz zum *m*-Allel - auf eine physiologisch normal regulierte Weise. Wie zu erwarten fand sich eine außerordentliche Krebsresistenz, jedoch *keine* Anzeichen eines beschleunigten Alterns (Garcia-Cao et al., 2002).

ARF/p53-Mäuse. Es wurden transgene Mäuse entworfen, die eine erhöhte Expression von p53 und seinem Regulator ARF zeigten, welche aber normal reguliert wurden. Bei ihnen beobachtete man nicht nur eine starke Krebsresistenz, sondern auch eine signifikant *erhöhte* Lebensdauer im Gegensatz zu den Wildtyp-Kontrollen (Matheu et al., 2007).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass P53 den Alterungsvorgang beschleunigen oder verlangsamen kann, je nach Aktivität des Proteins oder dessen Regulation. Doch auch wichtige Regulatoren von P53 haben Einfluss auf die Tumorentwicklung und den Alterungsprozess, allem voran die Onkogene MDM2 und MDM4, die im nächsten Abschnitt erläutert werden.

1.3 Der Effekt weiterer wichtiger Proteine auf P53

1.3.1 MDM2

Das Onkogen MDM2 (*murine double minute 2*) ist ein negativer Regulator von P53. Das Gen ist auf dem Chromosom 12q13-14 lokalisiert und bildet ein Protein aus 490 Aminosäuren. Durch Bindung an die N-terminale Region von P53 inhibiert es dessen transkriptionelle Aktivierung. Eine Überexpression von MDM2 führt zusätzlich zu einer Hemmung der Repressionsaktivität von P53 (Momand et al., 1992). Umgekehrt führt die Bindung von P53 an den P2-Promotor des MDM2-Gens zu einer verstärkten Expression von MDM2. Außerdem katalysiert es die P53-Ubiquitinierung und markiert P53 damit für den Abbau in den Proteasomen (Honda et al., 1997). Auf diese Weise bildet sich ein autoregulatorischer Prozess (siehe Abbildung 1.1).

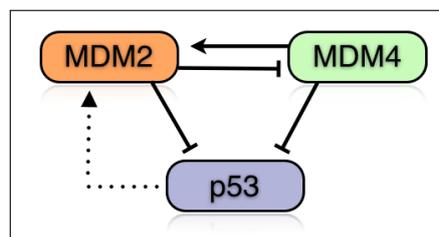


ABBILDUNG 1.1 – Regulatorischer Feedback-Loop. P53 aktiviert die Transkription von MDM2 (gepunktete Linie). Dieses steuert den Abbau von P53 und MDM4. MDM4 inhibiert die transkriptionelle Aktivität von P53 und unterstützt MDM2 bei dessen Abbau.

1.3.2 MDM4

Das Onkogen MDM4 (*murine double minute 4*, auch MDMX oder HDMX) besitzt eine hohe strukturelle Homologie zu MDM2 und ist auf dem Chromosom 1q32 lokalisiert. Auch MDM4 ist in der Lage, durch seine P53-Bindungsdomäne mit P53 zu interagieren und so dessen Aktivität zu hemmen (Shvarts et al., 1996). Doch MDM4 kann zudem gegensätzliche Funktionen in der Regulation von P53 übernehmen. Es wurde gezeigt, dass eine Überexpression von MDM4 den MDM2-abhängigen P53-Abbau hemmt und auf diese Weise P53 stabilisiert (Jackson und Berberich, 2000). Unter anderen Bedingungen wirkt MDM4 aber eher als Stimulator der E3-Ligase von MDM2 und führt somit zu einem Abbau von P53 und MDM2 selbst (siehe Abbildung 1.1) (Linares et al., 2003). Ebenso wie MDM2 enthält auch das MDM4-Gen einen Promotor im ersten Intron, der potentiell durch P53 aktivierbar ist (Phillips et al., 2010).

Durch spätere Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Proteine MDM2 und MDM4 Heterodimere bilden können und dadurch die Autoubiquitylierung von MDM2 unterdrücken. Dies führte zu einer Stabilisierung von MDM2 (Sharp et al., 1999). Trotz der hohen Homologie besitzt MDM2 ein funktionelles Kernlokalisierungssignal (NLS) und ein Kernexportsignal (NES), welche dem MDM4-Protein fehlen (Li et al., 2002). Das könnte bedeuten, dass MDM4 für den Kernimport zusätzlich an andere Proteine gebunden werden muss.

1.3.3 Die Proteinphosphatase 2A

Als weiteres wichtiges Protein hat sich die Proteinphosphatase 2A (PP2A) erwiesen, welche ebenfalls in den p53-Pathway eingreift. PP2A ist eine wichtige Serin/Threonin-Phosphatase, die eine Vielzahl unterschiedlicher Effekte in Zellen hat (Janssens und Goris, 2001). Sie besteht aus drei unterschiedlichen funktionellen Einheiten, die einen Holoenzymkomplex bilden. Typischerweise interagiert die katalytische Untereinheit (PP2Ac) mit der strukturellen Untereinheit (PP2Aa/PR65) und bildet somit den Kern des Enzyms. Die große Anzahl von regulatorischen (B)-Untereinheiten mit dem Enzymkern ist die Grundlage für die unterschiedlichen Enzymfunktionen. In diesem Zusammenhang ist Cyclin G in der Lage, sich an die regulatorische B' – Untereinheit zu binden. Cyclin G ist ein P53-abhängiges Genprodukt, das durch die Aktivierung von P53 bei DNA-Schäden induziert wird (Okamoto und Beach, 1994). Es ist bekannt, dass Cyclin G einen Beitrag zum G2/M Arrest von Zellen leistet (Shimizu et al.,

1998) und in manchen Zellen die apoptotische Antwort verstärkt (Okamoto und Prives, 1999). Mit Hilfe von Cyclin G kann das Holoenzym PP2A, welches dann entweder die regulatorische Untereinheit PR61 α oder PR61 β beinhaltet, einen Komplex mit der E3-Ligase MDM2 bilden (Okamoto et al., 2002). Das führt zu einer Dephosphorylierung von MDM2 an Thr216 und der anschließenden Aktivierung des Proteins. MDM2 bindet daraufhin an P53, ubiquitinyliert es, und der Abbau von P53 wird eingeleitet (Haupt et al., 1997). Somit lässt sich sagen, dass PP2A als negativer Regulator des Tumorsuppressors P53 wirken kann (siehe Abbildung 1.2).

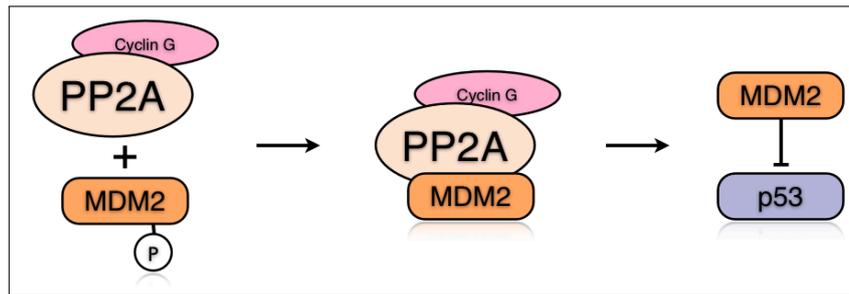


ABBILDUNG 1.2 – Die Proteinphosphatase PP2A bildet zusammen mit Cyclin G einen Holoenzymkomplex und dephosphoryliert MDM2. Dies führt zur Aktivierung des Proteins, welches seinerseits P53 ubiquitinyliert und somit dessen Abbau einleitet.

1.3.4 Ausgewählte Modelle

Wie die oben beschriebenen zellulären Prozesse sich auf den Organismus auswirken, zeigen nachfolgende experimentelle Untersuchungen.

MDM2-Knockout. Mäuse, die kein MDM2 mehr bilden konnten, starben früh während der Embryonalentwicklung durch exzessive Apoptose. Dies ist zurückzuführen auf die Unfähigkeit, die P53-vermittelte Suppression des Zellzyklus zu hemmen. Mäuse mit gleichzeitigem p53-Knockout entwickelten sich normal und waren lebensfähig (Jones et al., 1995).

MDM4-Knockout. Ähnliche Beobachtungen konnten bei einem MDM4-Knockout gemacht werden. Auch hier starben die Mäuse P53-abhängig in der embryonalen Entwicklung mit Defekten des Zellwachstums, *nicht* aber der Apoptose. Mäuse mit einem gleichzeitigen p53-Knockout waren wieder lebensfähig. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass MDM2 und MDM4 nichtüberlappende Aufgaben in der Regulation von P53 haben (Parant et al., 2001).

Cyclin G-Null Zellen. Zellen, die kein Cyclin G bildeten, zeigten eine höhere MDM2-Phosphorylierung durch verminderte PP2A-Aktivität. Dadurch wurde MDM2 weniger stark aktiviert,

und die P53-Proteinlevel stabilisierten sich. Dabei ist die Interaktion von Cyclin G mit der PP2A-Untereinheit PR61 abhängig von P53 (Okamoto et al., 1996).

P53-MDM2-MDM4-Knockout. Mäuse, die weder P53, noch MDM2 und MDM4 bilden konnten, hatten *identische* Überlebenskurven und das gleiche Tumorspektrum wie reine p53-Knockout-Mäuse (Barboza et al., 2008). Das beweist die grundlegende Eigenschaft von MDM2 und MDM4 als negative P53 Regulatoren.

1.4 Der Einfluss von Polymorphismen auf Signalwege des p53-Pathways

Ziel der vorliegenden Arbeit war es herauszufinden, ob ausgewählte Genpolymorphismen einen Einfluss auf die Überlebensdauer und damit eventuell indirekt auf den Alterungsprozess haben. Diese so genannten SNPs (single nucleotide polymorphisms) sind natürliche, im menschlichen Genom vorkommende Variationen einzelner Basenpaare in einem DNA-Strang. Dabei können SNPs in kodierenden Regionen eines Gens, aber auch in nicht-kodierenden Bereichen, wie Introns oder regulatorischen Elementen, liegen. Befinden sie sich im kodierenden Bereich, können sie eine Auswirkung auf die Aminosäurekette und damit auf die spätere Proteinstruktur und -funktion haben. Doch auch SNPs im Intron können beispielsweise über eine veränderte Bindung von Proteinen zu Promotoren die Expression bestimmter Gene modulieren. Gegenwärtig wurden bereits über 4,5 Millionen (Bond et al., 2005) unterschiedlicher SNPs im menschlichen Genom gefunden und für viele von ihnen auch ein Effekt auf den Organismus beschrieben. Dieser Effekt kann sich in einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber bestimmten Tumoren oder einer veränderten Antwort des Organismus auf Pathogene oder Medikamente ausdrücken. Allein in 82 Genen des p53-Pathways wurden 1335 SNPs identifiziert, wovon 977 in nichtkodierenden und 358 in kodierenden Regionen liegen (Bond et al., 2005).

1.4.1 Der p53 Codon 72-Polymorphismus (rs1042522)

Der Codon 72-Polymorphismus des p53-Gens wurde bereits 1988 zum ersten Mal von BUCHMAN und Kollegen (Buchman et al., 1988) beschrieben. Die Aminosäure, die durch den Polymorphismus kodiert wird, liegt in einer Prolin-reichen Sequenz von P53 zwischen der Transaktivierungs- und DNA-bindenden Domäne im Exon 4. Durch den Austausch der Ba-

se Guanin zu Cytosin wird im entsprechenden Protein an Position 72 eine Veränderung der Aminosäuresequenz von Arginin zu Prolin bewirkt. Diese Prolin-reiche Region ist wichtig für die Funktion von P53, die Apoptose zu induzieren (Sakamuro et al., 1997). Daher ist es nicht verwunderlich, dass sich die unterschiedlichen Genotypen verschieden auf die zellulären Vorgänge auswirken. So ist die Arg-Form besser in der Lage, eine Apoptose zu induzieren als die Pro-Variante. Auf der anderen Seite ist die Pro-Form besser im Stande, einen G1-Arrest zu erzeugen und hat damit eine eher wachstumshemmende Funktion (Pim und Banks, 2004). Auch konnte gezeigt werden, dass Zellen mit den verschiedenen Genotypen unterschiedlich auf eine Chemotherapie ansprechen. So war bei Zellkulturexperimenten die Arginin-Variante in der Lage, in deutlich mehr Zellen eine Apoptose unter Chemotherapie auszulösen (bis zu 8-fach höher) als das Prolin-Allel (Sullivan et al., 2004).

Weiterhin untersuchten viele Studien den Einfluss des Polymorphismus auf die Kanzerogenese. Die Studien sind teilweise sehr inkonsistent. So zeigten ROGLER et al., dass der Codon 72-SNP keinen Einfluss auf das Gesamtrisiko eines Prostata-Karzinoms hat, auf der anderen Seite aber die Patienten mit der Pro-Variante eher erkranken (Rogler et al., 2011). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass der Pro/Pro-Genotyp mit einem signifikant erhöhten Risiko für das Auftreten eines hepatozellulären Karzinoms assoziiert ist (Sümbül et al., 2012). Andere Studien zeigen, dass die Arginin-Variante unter anderem mit einem erhöhten Risiko des Auftretens von Magenkarzinomen (Shen et al., 2004) und Ovarialkarzinomen (Pegoraro et al., 2002) assoziiert ist. Gründe für diese unterschiedlichen Ergebnisse können zum einen die sehr komplexen zellulären Effekte des SNPs sein, aber auch die Tatsache, dass in den Studien häufig nur der Polymorphismus und nicht der Mutationsstatus von p53 bestimmt wurde.

Diese Beobachtungen werfen die Frage auf, inwieweit sich der Codon 72-Polymorphismus auf die Alterung des gesamten Organismus auswirkt und ob ein Allel einen gewissen Überlebensvorteil darstellt.

1.4.2 MDM2 und der SNP309 (rs2279744)

Das MDM2-Gen besitzt zwei Promotorregionen, die die mRNA-Level von MDM2 regulieren. Der zweite Promotor liegt dabei im ersten Intron des Gens und enthält eine P53-abhängige DNA-Sequenz, die die MDM2-Expression nach P53-Antwort erhöht (Zauberman et al., 1995). Innerhalb dieses Introns liegt an Position 309 ein Polymorphismus mit T zu G Basenaustausch

vor. Mit Hilfe von Computeralgorithmen wurde berechnet, dass ein T zu G Basenaustausch die Bindungsaffinität von SP1 verstärken könnte. Bei SP1 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, von dem bereits bekannt war, dass er unter anderem eine Bindestelle im MDM2-Promotor hat. In der Tat konnte *in vitro* nachgewiesen werden, dass SP1 vierfach besser an den G/G-Genotyp, als an den homozygoten T-Genotyp binden konnte. Zudem konnte das Medikament Mithramycin A, welches sich an SP1-Bindestellen lagert und somit die Transkription von SP1-abhängigen Genen hemmt, bevorzugt die Synthese von MDM2 in G/G-Zellen blockieren, verglichen mit der Synthese in T/T-Zellen. Somit wurde gezeigt, dass der G/G-Genotyp eine verbesserte SP1-Bindestelle erzeugt und damit die basalen Transkriptionslevel von MDM2 in diesen Zellen erhöht. Die höheren MDM2-Level hatten eine funktionelle Auswirkung auf die Zellen (Bond et al., 2004).

Zellen mit G/G-Genotyp und erhöhten MDM2-Proteinleveln hatten eine niedrigere Apoptoserate als T/T-Zellen. Ebenso waren in G/G-Zellen die mRNA-Level von Genen, die durch P53 nach DNA Schäden reguliert werden, viel niedriger als die mRNA-Level der gleichen Gene von T/T-Zellen. Diese Hemmung der Apoptose konnte rückgängig gemacht werden durch die Behandlung der Zellen mit Mithramycin A, welches die SP1-Funktion hemmt und die MDM2-Level erniedrigt. Außerdem wurde gezeigt, dass T/T-Zellen ihre P53-Proteinlevel nach Stress 5- bis 14-fach erhöhten, während G/G-Zellen nur einen 2- bis 3-fachen Anstieg zeigten.

Diese Experimente zeigen, dass die höheren MDM2-Proteinlevel bei G/G-Genotyp auch eine funktionelle Auswirkung haben. Es fanden sich reduzierte P53-Level, eine reduzierte P53-abhängige Transkription von Genen und eine reduzierte Apoptose nach DNA-Schäden. Dadurch werden sich mehr Zellen bei Stress vermehren und überleben, wenn sie einen G/G-Genotyp besitzen (Bond et al., 2004).

Diese *in vitro*-Ergebnisse wurden auch in Patientenstudien beobachtet. So untersuchte man Patienten mit LI-FRAUMENI-Syndrom, die, wie bereits beschrieben, eine Keimzellenmutation eines p53-Allels aufweisen. Dabei erkrankten Patienten mit T/T-Genotyp im Durchschnitt mit 27 Jahren an Krebs, während der Erkrankungsbeginn für T/G- und G/G-Genotypen bei 20 Jahren lag. Patienten mit niedrigen P53-Leveln und G/G-Genotyp entwickelten Krebs etwa zehn bis zwölf Jahre eher als Patienten mit T/T-Genotyp. Auch die Anzahl der primären Tumoren ist abhängig vom SNP309 Genotyp. So zeigen G/G-Patienten eine deutlich größere Anzahl an voneinander unabhängigen Weichteilsarkomen.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch in einer Studie bei Patienten mit *sporadischen* Weichteilsarkomen nachgewiesen. Das durchschnittliche Erkrankungsalter lag bei Patienten mit G/G-Genotyp bei 45 Jahren, während es bei T/T-Genotyp bei 57 Jahren lag (Bond et al., 2004).

Man kann daraus folgern, dass eine veränderte Balance zwischen P53 und seinem Regulator MDM2 tiefgreifende Auswirkungen auf die Kontrolle der Tumorgenese und somit möglicherweise die Langlebigkeit hat. So könnten sich pharmakologische Inhibitoren von MDM2 sowohl auf das Tumorstadium, als auch den Alterungsprozess auswirken. Eine Gruppe dieser Inhibitoren sind Nutline. Nutlin-3 führt zur Dissoziation von MDM2 von P53 und aktiviert die P53-vermittelte Apoptose. Mäuse, die oral mit Nutlin-3 behandelt wurden, zeigten eine 90%ige Verminderung des Tumorstadiums im Vergleich zur Kontrollgruppe (Vassilev et al., 2004). Man könnte davon ausgehen, dass die pharmakologische Hemmung von MDM2 die P53 Aktivität dramatisch erhöhen und Effekte wie ein MDM2-Knockout auslösen könnte. Doch es zeigte sich, dass es weder zu einem signifikanten Gewichtsverlust, noch zu weiteren Anzeichen beschleunigten Alterns kam. Das deutet darauf hin, dass Inhibitoren von MDM2 zwar einen Tumorschutz bieten, sich zugleich aber nicht auf das frühzeitige Auftreten von Alterungserscheinungen auswirken.

1.4.3 MDM4 und der SNP31826 (rs1563828)

Innerhalb des MDM4-Gens wurden bereits mehrere Polymorphismen beschrieben. Beim SNP31826 handelt es sich um einen Basenaustausch von C zu T. Dieser liegt an Position 31826 des MDM4-Gens in Intron 10.

In einer Studie mit 95 Ovarialkarzinompatienten, welche alle aus *Familien* mit extrem hohen Raten an Brust- und Ovarialkarzinomen stammten, fanden ATWAL et al. heraus, dass sich das Alter der Diagnosestellung zwischen den unterschiedlichen Genotypen des SNP31826 unterscheidet (Atwal et al., 2009). Dabei war das mediane Alter der Diagnosestellung mit 52 Jahren sehr früh. Frauen, die homozygote Träger des Hauptallels (C/C) waren, wurden im Durchschnitt mit 56 Jahren diagnostiziert, während Frauen, die das T-Allel trugen, 4 oder 5 Jahre früher diagnostiziert wurden. Diese Ergebnisse wurden durch Untersuchungen der Arbeitsgruppe BARTEL et al. bestätigt. Hierbei handelte es sich um 110 Patienten mit

sporadischen invasiven Ovarialkarzinomen. Homozygote Träger des T-Allels wurden 9 Jahre früher diagnostiziert als homozygote Träger des C-Allels (Atwal et al., 2009).

Auch eine andere Studie zeigte ähnliche Ergebnisse. Sie untersuchte den Einfluss des SNP31826 auf das Alter der Diagnosestellung von Brustkrebs in zwei unabhängigen Kohorten. In der ersten Kohorte mit 675 Patienten entwickelten jene, die homozygot für das T-Allel waren, 5 Jahre eher Östrogenrezeptor-negative Karzinome als Patienten, die Träger des C-Allels waren. Diese Ergebnisse konnten auch in der zweiten Kohorte bestätigt werden. Keine Effekte wurden allerdings in Östrogenrezeptor-positiven Karzinomen festgestellt, was darauf hindeutet, dass der SNP31826 nur in ER-negativem Brustkrebs eine funktionelle Beziehung hat (Kulkarni et al., 2009).

Die Arbeitsgruppe BARTEL et al. untersuchte zudem den Einfluss des SNP31826 auf das Gesamtüberleben von Frauen mit Ovarialkarzinomen. Dabei zeigten Patienten mit dem T-Allel und Östrogenrezeptor-negativen Tumoren insgesamt ein besseres Überleben als homozygote C-Allel Träger. Zudem hatten Patienten mit C/C-Genotyp ein 3,6-fach höheres Risiko, an dem Tumor zu versterben (Böhnke, 2010).

Diese Daten liefern Hinweise darauf, dass der SNP31826 die Tumorsuppression beeinflussen kann, wobei Träger des T-Allels zwar mit einem früheren Auftreten von Ovarial- und Mammakarzinomen assoziiert sind – insgesamt aber bei Ovarialkarzinomen ein längeres Überleben zeigen als C-Allel Träger.

1.4.4 MDM4 und der SNP34091 (rs4245739)

Ein weiterer, auch in dieser Arbeit betrachteter Polymorphismus (rs4245739) liegt im MDM4-Gen. Es handelt sich dabei um einen Basenaustausch von A zu C. Er befindet sich im 3'-UTR, 32 Nukleotide downstream des Stop-Codons und liegt an Position 34091. SNPs im 3'-UTR können potentiell die mRNA-Stabilität und Translation beeinflussen. Dieser Effekt wird zum Beispiel durch eine microRNA-vermittelte Störung der Genregulation hervorgerufen (Chen et al., 2008).

MicroRNAs (miRNA) sind kurze, ca. 18-25bp lange nichtkodierende RNAs, die die Genexpression durch eine Watson-Crick Basenpaarung an Ziel-mRNAs beeinflussen. Sie sind an vielen biologischen Vorgängen beteiligt, können aber auch bei pathologischen Prozessen, wie

zum Beispiel der Tumorgenese, eine Rolle spielen. Heutzutage geht man davon aus, dass mehr als 30% der mRNAs durch microRNAs reguliert werden (Lewis et al., 2005). Bindet sich eine microRNA an ihre passende Ziel-mRNA, kann sowohl das mRNA-Level als auch die Protein-Expression reguliert werden, indem die mRNA abgebaut wird. Diese Bindung kann unter anderem durch SNPs in der microRNA Bindungsregion beeinflusst werden. Es kann sowohl eine existierende Bindungsmöglichkeit aufgehoben oder aber eine inkorrekte Bindungsmöglichkeit geschaffen werden. Durch die veränderte Expression von microRNAs (und damit veränderter mRNA-Expression) kann es zu einer erhöhten Wachstumsrate eines Tumors (Tagawa und Seto, 2005) sowie zu einer stärkeren Chemoresistenz eines Tumors auf laufende Chemotherapie (Boren et al., 2009) kommen.

Desweiteren zeigten WYNENDAELE et al. in 2010, dass es durch den SNP34091 zu einer Bindungsmöglichkeit der hsa-miR-191 microRNA kommt (Wynendaele et al., 2010). Es handelt sich dabei um eine microRNA, die stark in normalem sowie in Tumorgewebe exprimiert wird. So wurde vermutet, dass diese microRNA die MDM4-mRNA mit dem C-Allel des SNP34091 reguliert, während das A-Allel nicht durch diese microRNA beeinflusst wird. Dadurch müsste bei vorhandenem C-Allel mehr MDM4 mRNA abgebaut und so die potentielle onkogene Wirkung abgeschwächt werden. In der Tat korrelierte das A-Allel mit einer signifikant erhöhten Expression der MDM4 mRNA und Proteinlevel in Ovarialkarzinomen. Außerdem zeigte sich, dass der Wildtyp-Genotyp (A/A) deutlich häufiger in Patienten mit high-grade Ovarialkarzinomen vertreten war. Desweiteren hatten Patienten mit Wildtyp SNP34091 (A/A), deren Tumoren keinen Östrogenrezeptor exprimierten, ein 4,2-fach erhöhtes Risiko der Rezidivierung und ein 5,5-fach erhöhtes Risiko durch den Tumor zu versterben (Wynendaele et al., 2010). Aufgrund oben beschriebener Beobachtungen ist von Interesse, inwieweit sich der SNP34091 des MDM4-Gens auf das menschliche Altern auswirkt.

1.4.5 PPP2R2B-Genpolymorphismus (rs319217)

Das PPP2R2B-Gen kodiert eine regulatorische Untereinheit der Proteinphosphatase 2A (PP2A). Bei dem untersuchten SNP handelt es sich um einen Basenaustausch von A zu G. Generell lässt sich sagen, dass eine Phosphorylierung von PP2A mit einer Progression von Brustkrebs vergesellschaftet ist (Wong et al., 2009). Zudem wurden SNPs in verschiedenen regulatorischen Einheiten von PP2A gefunden, die sich schützend auf die Entwicklung von

Brustkrebs auswirkten (Dupont et al., 2010). Es konnte nachgewiesen werden, dass das A-Allel des in dieser Arbeit untersuchten SNP (rs319217) mit einem besseren Ansprechen der Chemotherapie bei Brustkrebs assoziiert ist. So wiesen Träger des A-Allels sowohl in den vom Tumor abgeleiteten Zelllinien als auch in Brustkrebspatienten ein besseres Ansprechen auf die Standard-Chemotherapie auf. Zusätzlich wurde gezeigt, dass Brustkrebspatienten, die den G/G-Genotyp besitzen, 3,0 Jahre früher diagnostiziert wurden als Träger des A-Allels. Waren die Tumoren Östrogenrezeptor positiv, so vergrößerte sich der Unterschied auf 4,4 Jahre (Vazquez et al., 2011).

2

Kapitel 2

Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung von Polymorphismen in den Genen des p53-Pathways für das Altern aufzuklären. Dabei stand die molekulare Analyse der Polymorphismen von insgesamt 298 Probanden - zusammengesetzt aus 127 im hohen Lebensalter verstorbenen Menschen und 171 jungen Kontrollpersonen - im Vordergrund. Folgende fünf Polymorphismen wurden untersucht: p53 - Codon 72-SNP (rs1042522), MDM2 - SNP309 (rs2279744), MDM4 - SNP34091 (rs4245739), SNP31826 (rs1563828) und PPP2R2B (rs319217)

Im Folgenden sollte analysiert werden, ob innerhalb der Gruppe der alten Studienpopulation Menschen mit bestimmten Polymorphismen länger überlebten. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die physiologischen Alterungsvorgänge je nach Allelbesatz leicht verändert ablaufen.

Um eventuell auftretende Beobachtungen zu unterstützen, wurden im nächsten Schritt die Allelhäufigkeiten zwischen der *alten* Studienpopulation und einer *jungen* Kontrollpopulation miteinander verglichen. Sollte ein Allel tatsächlich einen Überlebensvorteil bringen, so müsste dieses innerhalb der alten Studienpopulation häufiger auftreten, als in der jungen Kontrollpopulation.

Die Untersuchungen könnten dazu beitragen, die molekularen Alterungsvorgänge besser zu verstehen. Speziell die Effekte von Tumorsuppressor- und Onkogenen sind dabei von besonderem Interesse, da bisher gezeigt werden konnte, dass genetische Varianten, die mit einer niedrigeren Aktivität von P53 - und damit einem erhöhten Tumorrisiko - assoziiert sind, mit einer längeren Lebenszeit korrelieren.

3.1 Material

3.1.1 Studien- und Kontrollpopulation

In dieser Arbeit wurden die fünf bereits erwähnten Genpolymorphismen (siehe Kap. 1.4) des p53-Pathways von 127 sehr alten Menschen (26 Männer, 101 Frauen) untersucht. Dabei sollte deren Lebenszeit mehr als 90 Jahre betragen. Der Mittelwert des Sterbealters lag bei 93,5 Jahren, was einem deutlich höheren statistischen Sterbealter entspricht, als dem der deutschen Normalbevölkerung (heute neugeborene Mädchen 82 Jahre, Jungen 77 Jahre). Eine Übersicht über die Anzahl der Verstorbenen geordnet nach dem jeweiligen Sterbealter zeigt Tabelle 3.1.

TABELLE 3.1 – Auflistung der Anzahl der Verstorbenen, geordnet nach jeweiligem Sterbealter

Sterbealter	Anzahl	Sterbealter	Anzahl
91	21	97	5
92	29	98	6
93	30	99	3
94	15	100	1
95	9	103	1
96	6		

Zusätzlich sollte keine maligne Tumorerkrankung die Ursache für deren Tod sein, da sich die Genpolymorphismen auch auf die Tumorentwicklung auswirken (siehe Wynendaele et al. 2010, Wong et al. 2009, Bond et al. 2004) und es so zu einer Verzerrung des Sterbealters durch eine verfrühte Tumormortalität kommen könnte. Aus diesem Grund stellte das Institut für Rechtsmedizin der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg freundlicherweise die DNA der sehr alten Patienten zur Verfügung. Es handelt sich hierbei um alle im Institut untersuchten Verstorbenen der Jahre 1996 bis 2009, die mit mehr als 90 Jahren verstorben waren. Bei allen alten Menschen lag eine *nicht-natürliche* Todesart vor. Hintergrund dieses Einschlusskriteriums war die Überlegung, dass Tumorerkrankungen zu einem großen Teil der Studienteilnehmer bereits zu Lebzeiten symptomatisch werden und somit bereits prä mortal eine Krebserkrankung diagnostiziert werden müsste. Diese wäre dann als Folge eine *natürli-*

che Todesart, also ein Tod aus innerer, körperlicher Ursache. Somit müssten innerhalb unserer Studienpopulation nur sehr wenige bis keine Tumorerkrankungen auftreten. In der Tat zeigte die Analyse der genaueren Todesursachen nur einen einzigen Fall (entspricht 0,8%), in dem ein Tumor als Todesursache festgestellt werden konnte. Es handelte sich dabei um den Tod im epileptischen Anfall bei einem intrakraniellen Tumor.

Die Haupttodesursachen der Studienpopulation sind somit Herz-Kreislauf-Erkrankungen, wie beispielsweise der Myokardinfarkt und das Linksherzversagen, und Infektionen - allem voran die Pneumonie (siehe Abbildung 3.1). Die Tumorerkrankungen machen im Gegensatz zur Mortalität der „Normalbevölkerung“ nur den geringsten Teil der Todesursachen aus.

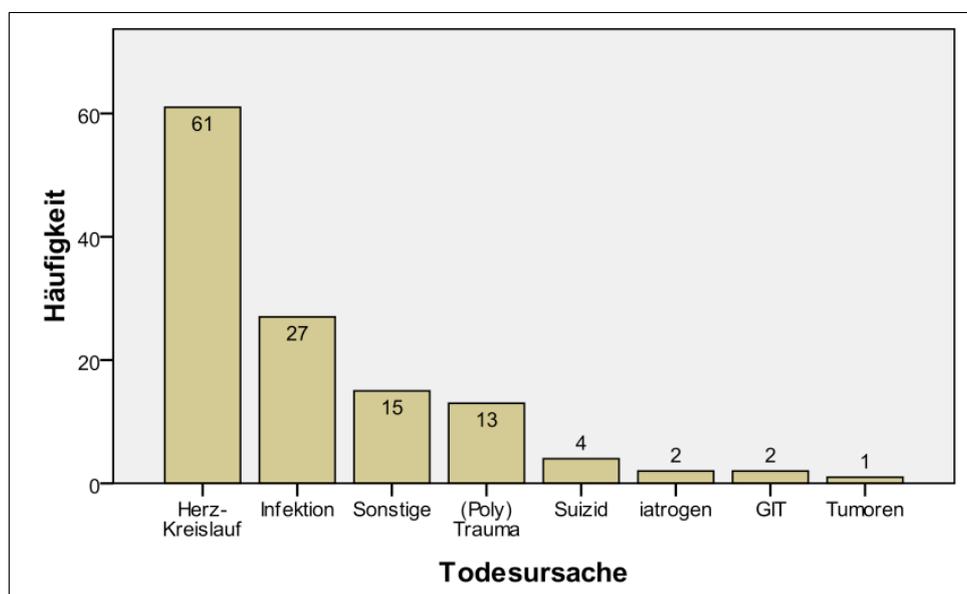


ABBILDUNG 3.1 – Auflistung der Todesursachen der 127 untersuchten Patienten der Studienpopulation.

Für die statistische Untersuchung wurde weiterhin vergleichendes Material von Kontrollpersonen benötigt. Da die Allelfrequenz der untersuchten Genpolymorphismen *populationsabhängig* ist, sollten die Kontrollpersonen ebenfalls aus dem mitteldeutschen Raum stammen. Außerdem sollten sie deutlich jünger sein, als das erreichte Lebensalter der Studienpopulation und damit der jungen gesunden Bevölkerung entsprechen. Hierzu stellte das Institut für Rechtsmedizin der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg ebenfalls 94 DNA-Kontrollen von jungen *männlichen* Individuen zur Verfügung, welche auf Grund eines Vaterschaftstests gewonnen wurden. Das Durchschnittsalter der Kontrollen betrug 24,5 Jahre. Diese Kontrollen stehen repräsentativ für die männliche mitteldeutsche Bevölkerung.

Zusätzlich wurden 77 DNA-Proben von *weiblichen* jungen Spendern untersucht. Diese wurden freundlicherweise vom HLA-Labor des Instituts für medizinische Immunologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zur Verfügung gestellt. Das Einschlusskriterium war ebenso ein deutlich jüngeres Lebensalter als das Sterbealter der alten Studienpopulation. Der Mittelwert des Alters der weiblichen Kontrollen lag bei 31,8 Jahren. Diese Kontrollen stehen repräsentativ für die weibliche mitteldeutsche Bevölkerung.

Die Studie besteht somit insgesamt aus 298 Menschen, zusammengesetzt aus 127 sehr alten Patienten und 171 Kontrollpersonen.

Im Folgenden wird bei der eigentlichen Studienpopulation der hoch betagt verstorbenen Menschen von „den alten Menschen“, bei der Kontrollpopulation von „den jungen Menschen“ gesprochen. Dies dient keinesfalls der Diskriminierung der hoch betagten Menschen, als vielmehr dem besseren Verständnis und der besseren Lesbarkeit der Arbeit.

3.1.2 Primer

Nachfolgend sind die in dieser Arbeit verwendeten Primer aufgeführt.

Name	Sequenz 5' → 3'	Orientierung	Referenzen
p53 Ex4fw	5'-CGTTCTGGTAAGGACAAGGGT-3'	sense	Reles et al., 2001
p53 Ex4rev	5'-AAGAAATGCAGGGGATAACGG-3'	antisense	Reles et al., 2001
199-p53	5'-ATCTACAGTCCCCCTTGCCG-3'	sense	Würl et al., 1996
P53Ex4 200	5'-GCAACTGACCGTGCAAGTCA-3'	antisense	Würl et al., 1996
XEx11-3fw	5'-GGAGGATTGCCAGAATCTCT-3'	sense	Wynendaele et al., 2010
XEx11-2rev	5'-ACATTCTCTGACAGGTTGGAAA-3'	antisense	Wynendaele et al., 2010
SNP309fw	5'-CGGGAGTTCAGGGTAAAGGT-3'	sense	Bond et al., 2004
SNP309b-bw	5'-TGAGTCAACCTGCCCACTG-3'	antisense	
SNP309c-bw	5'-AAAGCTGAGTCAACCTGC-3'	antisense	

3.1.3 TaqMan SNP Genotyping-Assays

Für die Polymorphismen *rs1042522* (P53 Codon 72), *rs1563828* (MDM4 SNP31826), *rs4245739* (MDM4 SNP34091) und *rs319217* (PPP2R2B) wurden bei der Firma Applied Biosystems Genotyping-Assays bestellt.

3.1.4 Verwendete Enzyme

GoTaq Green Master Mix	Promega, Heidelberg
Hot FIREPol	Solis Biodyne, Estland

3.1.5 Verwendete Kits

BigDye Terminator Sequencing Kit v1.1/v3.1	Applied Biosystem, USA
QIAamp® DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden

3.1.6 Eingesetzte Chemikalien

Agarose	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
DNA Standard (100 bp Leiter)	Invitrogen, Karlsruhe
dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Promega, Heidelberg
EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethanol (96%)	Merck, Darmstadt
Ethanol (70%)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Formamid	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
MgCl ₂	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Serva, Heidelberg

3.1.7 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Cubis (Analysewaage)	Sartorius AG, Göttingen
Fusion Fx7	Vilber Lourmat, Frankreich
Mettler AM 100 (Analysewaage)	Mettler, Giessen
Mikropipetten	Eppendorf, Hamburg
Peltier Thermal Cycler	Bio Rad, München
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg

Rotor Gene RG 3000

Qiagen, Hilden

Zentrifuge 5804 R

Eppendorf, Hamburg

3.1.8 Puffer und Lösungen

Auftragspuffer (Gelelektrophorese):

10 ml Formamid

10 mg Xylencyanol

10 mg Bromphenolblau

0,2 ml EDTA (0,5M, pH 8)

5x TBE Puffer:

54 g Tris-HCL

27,5 g Borsäure

20 ml EDTA (0,5M, pH 8)

Aqua bidest. auf 1L auffüllen

3.2 Methoden

3.2.1 DNA-Isolation

Die Isolation der genomischen DNA erfolgte für alle Proben aus peripherem Blut. Dazu wurde das QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, 2002) verwendet. Das Protokoll wurde dabei wie folgt modifiziert:

Das Blut in 1,5 mL-Röhrchen geben und wenn nötig zerkleinern. Anschließend 180 μ L Puffer ATL zugeben. Nun bei 85°C für 20 Minuten inkubieren. Darauf 20 μ L Proteinase K (20 mg/mL) zugeben und kurz vortexen. Die Probe 1,5 h - 2 h bei 56°C unter schütteln inkubieren. Anschließend 5 Sekunden bei 13.000 rpm zentrifugieren und 200 μ L Puffer AL zugeben. Wieder kurz vortexen (ca. 15 Sekunden) und bei 56°C für 10 Minuten inkubieren. Die Röhrchen wieder kurz zentrifugieren (ca. 5 Sekunden) und 200 μ L absoluten Ethanol (96 – 100 %) zugeben und kurz vortexen (ca. 15 Sekunden). Die Röhrchen kurz zentrifugieren (ca. 5 Sekunden). Anschließend die Lösung in die QIAamp® Spin Column (in 2 ml Collection tube) überführen und QIAamp® Spin Column bei 8.000 rpm 1 Minute zentrifugieren. Den

restlichen Teil der Lösung in Spin Column laden und bei 8.000 rpm 1 Minute zentrifugieren. Die QIAamp® Spin Column auf ein neues 2 mL Collection tube stecken, 500 μ L Puffer AW1 zugeben und bei 8.000 rpm 1 Minute zentrifugieren. Die QIAamp® Spin Column in ein neues 2 mL Collection tube stecken und das Collection tube mit dem Filtrat verwerfen. Nun 500 μ L Puffer AW2 zugeben und bei 14.000 rpm 3 Minuten zentrifugieren. Die QIAamp® Spin Column auf ein neues 2 mL Collection tube überführen und 150 μ L Puffer AE zugeben. Jetzt bei Raumtemperatur für 20 - 30 Minuten inkubieren. Anschließend nochmals bei 8.000 rpm 1 Minute zentrifugieren und die QIAamp® Spin Column verwerfen.

3.2.2 Polymerasekettenreaktion und DNA-Untersuchungen

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für alle zu untersuchenden Proben wurde der gleiche PCR-Ansatz mit Bestandteilen des GoTaq Green Master Mix der Firma Promega verwendet:

9,5 μ L H₂O

12,5 μ L Mix

je 1 μ L der beiden entsprechenden Primer (20 μ M)

ges. 24 μ L Reaktionsansatz

Zu dem Reaktionsansatz wurde 1 μ L der genomischen DNA hinzugefügt. Die PCR-Reaktion erfolgte nach folgendem Programm:

1. 95°C 15 min
 2. 95°C 20 sek
 3. 58°C 20 sek
 4. 72°C 30 sek
- Schritt 2 - 4 34 mal wiederholen
5. 72°C 5 min
 6. 4°C bis zur Entnahme

Agarose-Gelelektrophorese

Um zu überprüfen, ob durch die PCR-Reaktion die DNA erfolgreich vervielfältigt wurde, wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Da die zu erwartenden Fragmente eine konstante kleinere Größe haben, wurden 1%ige Agarosegele angefertigt. Dies entspricht einer Menge von 1g Agarose gelöst in 100 ml 0,5x TBE-Puffer, versetzt mit 5 μL Ethidiumbromid. Im Folgenden wurden jeweils 15 μL des PCR-Produkts auf das Gel aufgetragen. Für die Größenbestimmung des Produkts diente ein fester DNA-Längenstandard (Basenpaarleiter). Nun wurden die Fragmente bei ca. 80 Volt in den Gelkammern der Firma Bioplex mit 0,5x TBE-Laufpuffer aufgetrennt. Die anschließende Auswertung erfolgte unter UV-Licht. Die Banden wurden getrennt ausgeschnitten und konnten nun weiter bearbeitet werden.

Isolation der DNA aus Agarose-Gelen

Die Aufreinigung und Isolation der DNA aus den Gelen erfolgte unter Verwendung des Qiagen Gelextraktionskits nach den Angaben des Herstellers.

3.2.3 Sequenzierung und Fällung

Zur Sequenzierung der DNA wurden das Big Dye Terminator Kit 1.1 oder 3.1 der Firma ABI (Applied Biosystems, USA) verwendet. Der 20 μL Sequenzieransatz bestand aus 2 μL BigDyeSequencing Mix, 4 μL (3,2pmol/ μL) des jeweiligen spezifischen Primers, 3 μL des gereinigten zu sequenzierenden PCR-Produktes und 11 μL des Sequenzierpuffers. Die Reaktion lief in 0,5 mL Reaktionsgefäßen ab. Dazu wurde das folgende Programm verwendet:

1. 96°C 1 min
2. 96°C 10 sek
3. 50°C 5 sek
4. 60°C 4 min
- Schritt 2 - 4 25 mal wiederholen
6. 4°C bis zur Entnahme

Nun erfolgte die Fällung des Sequenzier-PCR-Produktes. Die Tubes sollten hierbei möglichst vor direkter Lichteinstrahlung geschützt sein. Zu jedem Ansatz wurden 2 μL 125 mM

EDTA, 2 μL 3M Natriumacetat und 50 μL 96% Ethanol hinzugegeben und anschließend für 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Daran schloss sich eine Zentrifugation bei 4°C und 6.000 rpm für 30 min und anschließende Abnahme des Überstandenes an. Im Weiteren folgte ein Waschschrift mit 70 μL 70%igem Ethanol und das Pellet wurde erneut für 10 min bei 4°C und 6.000 rpm zentrifugiert. Nach dem Abpipettieren des Ethanols wurde das Pellet bei 80°C für 10 min im Thermocycler getrocknet. Anschließend wurden die Proben zum Sequenzieren an das Zentrum für medizinische Grundlagenforschung des Universitätsklinikums Halle versendet.

Real-time PCR

Eine weitere in dieser Arbeit genutzte Möglichkeit der Genotypisierung der SNPs ist die Genotypisierung mittels real-time PCR. Hierzu wurden so genannte TaqMan-Sonden für die zu untersuchenden SNPs von der Firma Applied Biosystems verwendet. Ein TaqMan-Assay besteht aus einer FAM-markierten Sonde (Wildtyp-Allel) und einer VIC-markierten Sonde (mutiertes Allel). Ist nun die Probe homozygot für ein Allel, so erhält man bei der Amplifizierung nur das Signal eines Farbstoffes, während ein heterozygoter Genotyp mit einem Signal beider Farbstoffe einher gehen würde. Für den 20 μL PCR-Ansatz wurden folgende Komponenten verwendet:

- 12,6 μL H₂O
- 2 μL 10x Puffer B
- 2 μL MgCl₂ (25mM)
- 1,6 μL dNTPs (100mM)
- 0,5 μL TaqMan-Primer
- 0,3 μL Hotfire-Pol
- 1 μL DNA (20ng/ μL)

Die Vervielfältigung erfolgte mit folgendem Programm im real-time PCR-Gerät Rotorgene 3000 (Qiagen):

1. 95°C 15 min
2. 95°C 10 sek
3. 58°C 20 sek
4. 72°C 20 sek

Zusätzlich zu den zu testenden Proben erhielt jeder Testlauf drei bekannte Proben aller möglichen Allelverteilungen, die vorher durch Sequenzierung ermittelt wurden. Die Auswertung erfolgte mit der Software „Allelic Discrimination“ des Rotorgene 3000.

3.2.4 Statistische Analysen

Zur statistischen Analyse der erhobenen Daten wurde die Software SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) verwendet. Für alle eingesetzten statistischen Tests wurde ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ festgelegt. Das bedeutet, dass Ergebnisse, deren p-Werte kleiner als 0,05 sind, als „statistisch signifikant“ eingestuft werden und somit deren Nullhypothese abgelehnt wird. Des Weiteren wurden, wenn möglich, die 95%-Konfidenzintervalle berechnet, um die statistische Präzision eines beobachteten Effekts anzugeben.

Beim Vergleich der Allelfrequenzen der einzelnen Polymorphismen zwischen der alten Studienpopulation und der jungen Kontrollpopulation (Kreuztabellen) wurde der χ^2 -Test verwendet - bei einer erwarteten kleineren Anzahl ($n < 5$) von Beobachtungen der *exakte Test nach Fisher*.

Weiterhin wurden die Mittelwerte des *Sterbealters* der alten Studienpopulation in Bezug auf den jeweiligen Genotyp verglichen. Hierbei kam der *t-Test* zum Vergleich von zwei Mittelwerten (beispielsweise A-Allel (A/A- und A/C-Genotyp) gegen C/C-Genotyp) zum Einsatz. Sollten alle drei Genotypen (A/A- gegen A/C- gegen C/C-Genotyp) miteinander verglichen werden, so wurde der *F-Test* (zum Vergleich von mehr als zwei Mittelwerten) verwendet.

Zusätzlich wurden Überlebenszeitanalysen mittels *Kaplan-Meier-Analyse* (log-rank Test) durchgeführt. Hierbei wird die Zeit bis zum Eintreten eines bestimmten Ereignisses (im vorliegenden Fall der Tod durch nicht natürliche Todesart) zwischen zwei oder mehr Gruppen miteinander verglichen und graphisch in Form von Überlebenskurven aufgetragen.

4.1 Untersuchungen zum P53 Codon 72-Polymorphismus

4.1.1 Vergleich der Allelverteilung zwischen jungen und alten Menschen

Bereits vor einigen Jahren konnte gezeigt werden, dass hoch betagte Menschen, die einen Pro/Pro-Genotyp hatten, in einer prospektiven Studie ein deutlich längeres Überleben zeigten als Menschen mit dem Arg-Allel (van Heemst et al., 2005).

Die These war daher, dass es beim Vergleich der jungen Kontrollpopulation mit der alten Studienpopulation einen Unterschied zwischen der Allel-Verteilung geben müsste. Eine erste Analyse bestätigte dies jedoch nicht ($p=0.48$, χ^2 -Test). Insgesamt konnte bei 124 alten Menschen und 170 jungen Menschen der Codon 72-Genotyp bestimmt werden. Innerhalb der Gruppen zeigte sich, dass der Arg/Arg-Genotyp bei den jungen Menschen mit 55,3% und bei den alten Menschen mit 49,6% verteilt war. Der Arg/Pro-Genotyp war mit 38,2% zu 40,8% (jung zu alt) fast gleich verteilt, und auch beim Pro/Pro-Genotyp zeigte sich mit 6,5% zu 9,6% (jung zu alt) kaum ein Unterschied.

TABELLE 4.1 – Verteilung der Allele des P53 Codon 72-Polymorphismus nach Altersgruppe und Geschlecht. Bei den Frauen im hohen Lebensalter ist ein deutlicher Trend zum Pro/Pro-Allel im Vergleich zu den jüngeren Frauen sichtbar.

Geschlecht			P53 Codon72			Gesamt	Signifikanz
			Arg/Arg	Arg/Pro	Pro/Pro		
männlich	Jung	Anzahl	47	37	9	93	0.961
		%	50,5%	39,8%	9,7%	100%	
	Alt	Anzahl	13	10	3	26	
		%	50%	38,5%	11,5%	100%	
weiblich	Jung	Anzahl	47	28	2	77	0.108
		%	61%	36,4%	2,6%	100%	
	Alt	Anzahl	48	41	9	98	
		%	49%	41,8%	9,2%	100%	

Der nächste Schritt war die Aufteilung der Studienteilnehmer nach dem Geschlecht. Dabei begann sich ein erster Unterschied zwischen Frauen und Männern bemerkbar zu machen. Vergleicht man die männlichen und die weiblichen Probanden der Kontrollpopulation, so fällt auf,

dass die Allelfrequenz zwischen gesunden jungen Männern und Frauen unterschiedlich verteilt ist. So weisen die jungen weiblichen Probanden häufiger einen Arg/Arg-Genotyp auf (61%), bei den männlichen Probanden ist dieses Gleichgewicht jedoch zum Pro-Allel verschoben, und nur 50,5% weisen einen Arg/Arg-Genotyp auf (siehe Tabelle 4.1).

Stellt man nun die männlichen Studienteilnehmer (jung gegen alt) gegenüber, weisen diese eine fast identische Allelverteilung auf, so dass es offensichtlich keine altersabhängigen Unterschiede gibt ($p=0.961$). Die weibliche junge Kontrollpopulation weicht jedoch recht deutlich von der weiblichen alten Studienpopulation ab ($p=0.108$) (siehe Tabelle 4.1). Es ist zu erkennen, dass innerhalb der Kontrollpopulation der jungen Frauen der Arg/Arg-Genotyp mit 61% am häufigsten vertreten ist, während dieser bei den alten Frauen mit 49% deutlich niedriger liegt. Hier ist die Allelfrequenz zu Gunsten des homozygoten Pro-Allels (9,2%) verschoben.

Aus diesem Grund wurden daraufhin erneut die Allelfrequenzen in Bezug auf das Vorhandensein eines hetero- und homozygoten Pro-Allels (entspricht Arg/Pro- und Pro/Pro-Genotyp) mit dem Arg/Arg-Genotyp verglichen.

TABELLE 4.2 – Verteilung der Allele des P53 Codon 72-Polymorphismus nach Altersgruppe und Geschlecht. Bei den alten Frauen ist ein deutlicher Trend zum Pro-Allel im Vergleich zu den jungen Frauen sichtbar.

Geschlecht			P53 Codon72		Gesamt	Signifikanz
			Arg/Arg	Arg/Pro + Pro/Pro		
männlich	Jung	Anzahl	47	46	93	0.569
		%	50,5%	49,5%	100%	
	Alt	Anzahl	13	13	26	
		%	50%	50%	100%	
weiblich	Jung	Anzahl	47	30	77	0.075
		%	61%	39%	100%	
	Alt	Anzahl	48	50	98	
		%	49%	51%	100%	

Auch hier ist zu beobachten, dass sich zwischen den männlichen Probanden keine unterschiedliche Allelverteilung zeigt ($p=0.569$). Innerhalb der Gruppe der Frauen ist jedoch wieder eine Divergenz zu finden. Während bei der weiblichen jungen Kontrollpopulation das Pro-Allel zu 39% auftritt, findet es sich bei der alten Population mit 51% (siehe Tabelle 4.2). Diese Werte erreichen fast das Signifikanzniveau ($p=0.075$).

Des Weiteren fiel bei der Betrachtung der Allelfrequenzen zum jeweiligen Sterbealter auf, dass sich die Häufigkeit des Auftretens des Pro-Allels erst bei Patienten mit sehr hohem Lebensalter erhöht. So haben Patienten, die mit 92 Jahren verstorben sind, eine Allelhäufigkeit von 58,6% (Arg/Arg-Genotyp) zu 41,4% (Arg/Pro- und Pro/Pro-Genotyp), während Patienten, die 93 Jahre alt geworden sind, Frequenzen von 51,7% (Arg/Arg) zu 48,3% (Pro-Allel) aufweisen. Es findet also offensichtlich in Bezug auf das Sterbealter erst sehr spät eine Verschiebung der Allelfrequenzen zum Pro-Allel statt. Anders ausgedrückt weisen Patienten, die erst im sehr hohen Lebensalter verstorben sind, häufiger einen Pro-Genotyp auf. So haben von 16 Patienten, die zwischen dem 97. und 103. Lebensjahr verstorben sind, nur vier (25%) einen Arg/Arg-Genotyp. Die restlichen 75% sind zumindest hetero- oder auch homozygot für das Pro-Allel.

Daher wurde nochmals die junge Kontrollpopulation mit der alten Studienpopulation verglichen – allerdings erst mit Patienten, die älter als 93 Jahre alt geworden sind. Wieder war zwischen den Männern kein Unterschied beobachtbar ($p=0.533$). Die alten Frauen hingegen zeigten eine nochmalige Verschiebung der Allelfrequenz zu Gunsten des Pro-Allels, welches auf 55,2% im Vergleich zu 39% bei den jungen Frauen anstieg ($p=0.045$, siehe Abbildung 4.1).

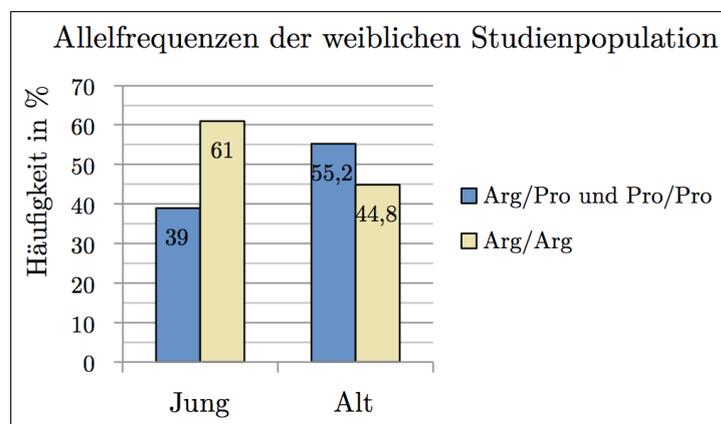


ABBILDUNG 4.1 – Verteilung der Allelfrequenzen zwischen der weiblichen jungen Kontrollpopulation und der weiblichen alten Studienpopulation. Bei den hoch betagten Frauen tritt das Pro-Allel häufiger auf als bei den jungen Frauen.

Diese Beobachtungen bestätigen indirekt die bereits publizierten Ergebnisse (van Heemst et al., 2005), dass Menschen mit einem Pro/Pro-Genotyp eine längere Lebenserwartung haben. In unserer Studie konnte jedoch zum ersten Mal nachgewiesen werden, dass dies nur für die weibliche Population zutrifft.

4.1.2 Vergleich der Überlebensdauer mit den Allelen

Da es in der Tat Unterschiede in der Allelfrequenz zwischen jungen und sehr alten Menschen gibt, sollte im nächsten Schritt geprüft werden, ob sich allelspezifische Unterschiede auch innerhalb der Gruppe der sehr alten Menschen wiederfinden. So müssten Menschen mit einem Pro-Allel ein späteres Sterbealter und damit eine längere Lebensdauer haben. Es sollte überprüft werden, ob die individuelle Allelausstattung mit der Überlebensdauer korreliert.

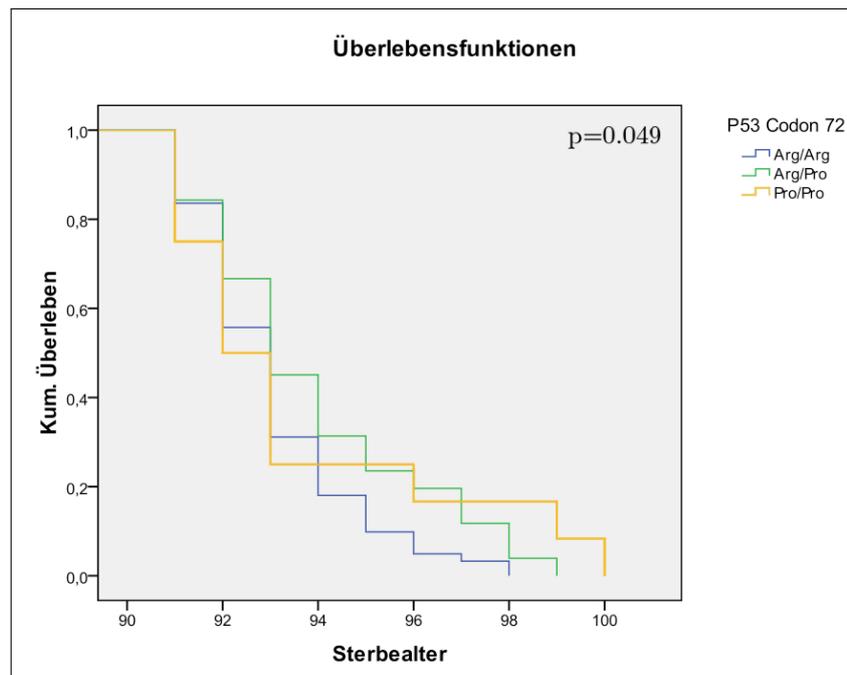


ABBILDUNG 4.2 – Kaplan-Meier-Kurve; Patienten mit Arg/Pro und Pro/Pro zeigen ein signifikant verlängertes Überleben im Vergleich zu Arg/Arg.

Die durchgeführte Kaplan-Meier-Analyse zeigt, dass alle alten Menschen, die mindestens ein Pro-Allel besaßen, später starben als Menschen mit Arg/Arg-Genotyp. Dieses Ergebnis ist nicht signifikant ($p=0.209$), und auch der durchgeführte F-Test zeigte keine Korrelation ($p=0.352$) (Daten nicht gezeigt). Offensichtlich schien jedoch ein Proband mit Arg/Arg-Genotyp stark aus der Reihe zu fallen, weshalb dieser testweise exkludiert wurde. Die erneut durchgeführte Kaplan-Meier-Analyse zeigte ein signifikant späteres Sterbealter bei Patienten mit mindestens einem Pro-Allel ($p=0.049$) (siehe Abbildung 4.2), wenngleich der F-Test weiterhin nicht signifikant war ($p=0.15$).

Im nächsten Schritt sollte der Arg/Arg-Genotyp mit dem Vorhandensein eines Pro-Allels (entspricht Arg/Pro- und Pro/Pro-Genotyp) verglichen werden. Die Kaplan-Meier-Analyse

zeigt ein signifikant längeres Überleben bei Vorhandensein eines Pro-Allels im Vergleich zum Arg/Arg-Genotyp ($p=0.035$) (siehe Abbildung 4.3). Der durchgeführte t-Test zum Vergleich der Mittelwerte des Sterbealters besagt, dass das durchschnittliche Sterbealter beim Arg/Arg-Genotyp bei 93,1 Jahren liegt, während es bei Vorhandensein mindestens eines Pro-Allels bei 93,8 Jahren liegt ($p=0.056$). Die Differenz liegt bei 0,74 [95%-KI -0,02; 1,51 Jahre]. Dies entspricht einem durchschnittlich um ein $\frac{3}{4}$ Jahr verlängertem Überleben bei einem Pro-Genotyp.

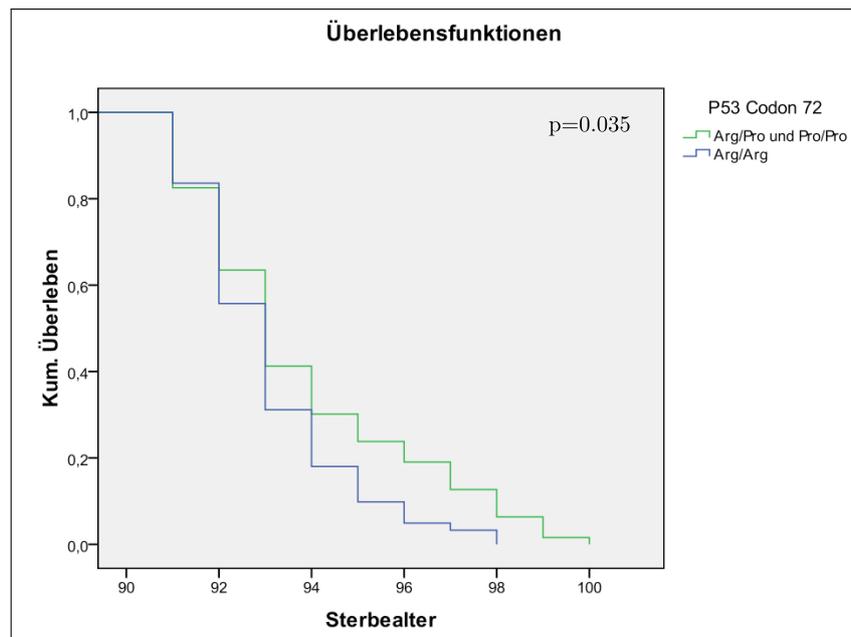


ABBILDUNG 4.3 – Kaplan-Meier-Kurve; Patienten mit mindestens einem Pro-Allel zeigen ein um 0,74 Jahre signifikant verlängertes Überleben im Vergleich zu Arg/Arg.

Wie bereits im vergangenen Kapitel 4.1.1 gezeigt, scheint die Allelfrequenz vom Geschlecht abhängig zu sein. Es wurde deshalb eine nach Geschlecht getrennte Kaplan-Meier-Analyse durchgeführt. Bei den männlichen Patienten ist kein Unterschied in der Überlebensdauer zwischen Arg/Arg- und Pro-Genotyp zu beobachten ($p=0.829$). Der durchgeführte t-Test zeigt eine leicht verlängerte Überlebensdauer bei Vorhandensein mindestens eines Pro-Allels (93,5 Jahre [95%KI 92,1; 94,8]) gegenüber dem Arg/Arg-Genotyp (93,4 Jahre [95%KI 92,2; 94,5]) (siehe Abbildung 4.4a). Dies entspricht einer verlängerten Überlebenszeit der Männer von 0,1 Jahren [95% KI -1,6; 1,7 Jahre] ($p=0.925$).

Die Kaplan-Meier-Analyse der weiblichen Probanden hingegen zeigt eine starke Korrelation zwischen den unterschiedlichen Genotypen ($p=0.025$, Daten nicht gezeigt). Der t-Test stellte einen erkennbaren Unterschied zwischen den mittleren Überlebenszeiten heraus. So liegt das durchschnittliche Sterbealter bei Patientinnen mit Arg/Arg-Genotyp bei 93 Jahren [95%

KI 92,5; 93,5]. Patientinnen, die mindestens ein Pro-Allel besaßen, starben im Durchschnitt mit 93,9 [95%KI 93,2; 94,6] Jahren (siehe Abbildung 4.4b). Somit lebten diese Frauen durchschnittlich 0,9 Jahre [95% KI 0,2; 1,8 Jahre] (entspricht ca. 11 Monaten) länger ($p=0.046$).

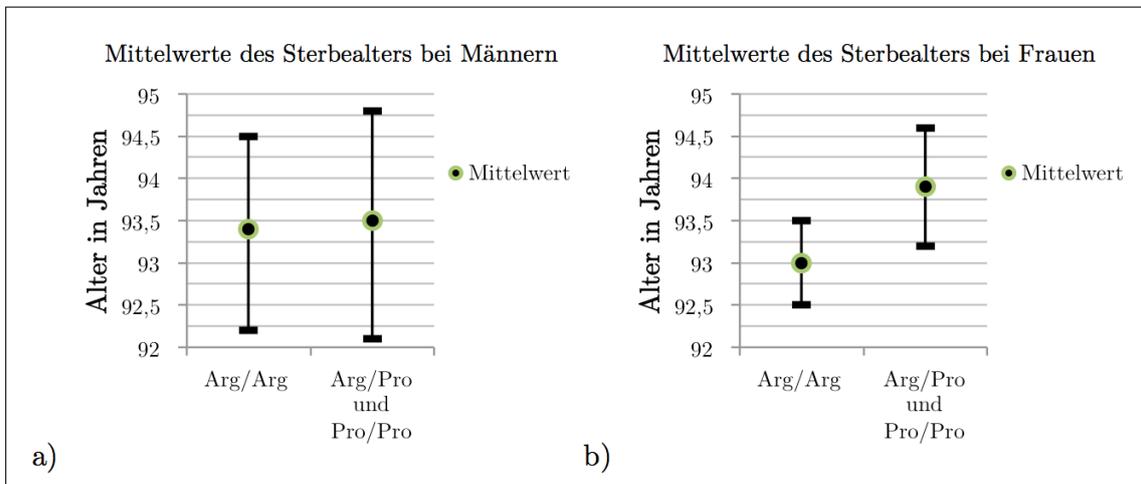


ABBILDUNG 4.4 – Mittelwerte des Sterbealters bei Männern (a) und Frauen (b) getrennt nach Genotyp des P53 Codon 72 mit ihren jeweiligen 95% Konfidenzintervallen.

Diese Ergebnisse bestätigen die bereits in Kapitel 4.1.1 dargestellten Beobachtungen, dass Frauen, die einen Arg/Arg-Genotyp besitzen, eine kürzere Lebenserwartung haben als Frauen die hetero- bzw. homozygot für das Pro-Allel sind.

4.2 Untersuchungen zum MDM2 SNP309-Polymorphismus

Es wurde bereits betont, dass MDM2 ein starker negativer Regulator von p53 ist. Der SNP309-Polymorphismus wirkt sich auf die Transkriptionsrate von MDM2 aus. Dabei wird bei Vorhandensein eines G-Allels MDM2 stärker exprimiert als bei Vorhandensein eines T-Allels (Bond et al., 2004). Es kommt so zu einer verminderten apoptotischen Antwort, mit der Konsequenz einer geringeren Gewebeatrophie und dem langsameren Verlust der Gewebsregeneration (Seneszenz). Daher müssten Menschen, die Merkmalsträger des G-Allels sind, langsamer altern und eine längere Lebenserwartung haben als T-Allel-Träger. Der SNP309-Status konnte in 126 der 127 alten Menschen und in 166 der 171 jungen Kontrollpersonen bestimmt werden.

4.2.1 Vergleich der Allelverteilung zwischen jungen und alten Menschen

Im ersten Schritt sollte geprüft werden, ob es zwischen der jungen Kontrollpopulation und der alten Studienpopulation einen Unterschied in der Allelfrequenz gibt. So müsste bei der Kontrollpopulation der hetero- bzw. homozygote G-Genotyp seltener vorkommen als bei den alten Menschen.

Eine erste Analyse bestätigte dies allerdings nicht. Es wurde kein Unterschied zwischen den Allelfrequenzen der jungen und alten Menschen sichtbar ($p=0.787$). Im Folgenden wurde wieder eine Trennung nach Geschlecht durchgeführt. In der Tat zeigten sich erneut geschlechtsabhängige Unterschiede. Während bei den männlichen jungen Kontrollpersonen mit 48,4% der T/G-Genotyp am häufigsten vertreten ist, tritt bei den weiblichen jungen Kontrollpersonen der T/T-Genotyp mit 50,7% am häufigsten auf (siehe Tabelle 4.3).

TABELLE 4.3 – Verteilung der Allele des MDM2 SNP309-Polymorphismus nach Altersgruppe und Geschlecht. Bei den Frauen im hohen Lebensalter ist ein Trend zum G-Allel im Vergleich zu den jüngeren Frauen sichtbar.

Geschlecht			MDM2 SNP309			Gesamt	Signifikanz
			T/T	T/G	G/G		
männlich	Jung	Anzahl	34	45	14	93	0.604
		%	36,6%	48,4%	15,1%	100%	
	Alt	Anzahl	11	13	2	26	
		%	42,3%	50%	7,7%	100%	
weiblich	Jung	Anzahl	37	29	7	73	0.182
		%	50,7%	39,7%	9,6%	100%	
	Alt	Anzahl	38	44	17	99	
		%	38,4%	44,4%	17,2%	100%	

Beim Vergleich der jungen und alten Frauen fällt auf, dass bei den Frauen im hohen Lebensalter ein Trend zum G-Allel sichtbar wird, wenngleich dieses Ergebnis nicht signifikant ist ($p=0.182$). So tritt der G/G-Genotyp bei den alten Frauen mit einer Häufigkeit von 17,2% auf; bei den jungen weiblichen Kontrollpersonen jedoch nur zu 9,6% (siehe Tabelle 4.3). Bei den männlichen Studienteilnehmern konnte diese Beobachtung nicht gemacht werden ($p=0.604$).

Im nächsten Schritt wurden daraufhin erneut die Allelfrequenzen in Bezug auf das Vorhandensein eines hetero- und homozygoten G-Allels (entspricht T/G- und G/G-Genotyp) mit dem T/T-Genotyp verglichen. Wieder ist zu erkennen, dass beim Vergleich der Frauen, das G-Allel bei der alten Studienpopulation mit 61,6% häufiger auftritt als bei der jungen Kon-

trollpopulation (49,3%). Dieses Ergebnis erreicht fast das Signifikanzniveau ($p=0.073$) (siehe Tabelle 4.4). Erstaunlicherweise lässt sich bei den männlichen Teilnehmern ein inverser Trend erkennen. So kommt das G-Allel bei den alten Männern mit 57,7% nicht etwa häufiger, sondern seltener vor als bei den jungen männlichen Kontrollen (63,4%), wengleich dieses Ergebnis nicht signifikant ist ($p=0.377$).

TABELLE 4.4 – Verteilung der Allele des MDM2 SNP309-Polymorphismus nach Altersgruppe und Geschlecht. Bei den alten Frauen ist ein deutlicher Trend zum G-Allel im Vergleich zu den jungen Frauen sichtbar.

Geschlecht			MDM2 SNP309		Gesamt	Signifikanz
			T/T	T/G + G/G		
männlich	Jung	Anzahl	34	59	93	0.377
		%	36,6%	63,4%	100%	
	Alt	Anzahl	11	15	26	
		%	42,3%	57,7%	100%	
weiblich	Jung	Anzahl	37	36	73	0.073
		%	50,7%	49,3%	100%	
	Alt	Anzahl	38	61	99	
		%	38,4%	61,6%	100%	

Desweiteren wurde in Analogie zum P53 Codon 72-Polymorphismus die unterschiedliche Allelfrequenz zum Sterbealter betrachtet. So trat bei Patienten, die mit 92 Jahren verstorben sind, das G-Allel zu 44,8% auf, während es bei Patienten, die mit 93 Jahren verstarben, schon zu 53,3% auftrat. Von den 31 Patienten, die zwischen dem 95. und 103. Lebensjahr verstarben, haben nur sechs Patienten den T/T-Genotyp. Die restlichen 25 Patienten (entspricht 81%) sind Träger mindestens eines G-Allels. Ab dem 99. Lebensjahr waren ausschließlich hetero- oder homozygote G-Allel-Träger vertreten (siehe Abbildung 4.5).

Es liegt also offensichtlich in Bezug auf das erreichte Lebensalter eine unterschiedliche Verteilung des G-Allels vor. Patienten, die erst im sehr hohen Lebensalter verstorben sind, weisen somit häufiger einen hetero- oder homozygoten G-Genotyp des SNP309 auf. Daher wurde nochmals geschlechtsabhängig die junge Kontrollpopulation mit der alten Studienpopulation verglichen, allerdings erst mit alten Menschen, die älter als 92 Jahre wurden. Wieder zeigte sich der inverse Trend der Männer, dass bei der jungen Kontrollgruppe das G-Allel häufiger auftrat als bei den alten Menschen (63,4% zu 58,8%) ($p=0.458$). Bei den Frauen war jedoch ein deutlicher Unterschied zu erkennen. So trat das G-Allel bei den jungen weiblichen Kontrollen mit 49,3% fast genau so häufig auf wie der T/T-Genotyp (50,7%), innerhalb der

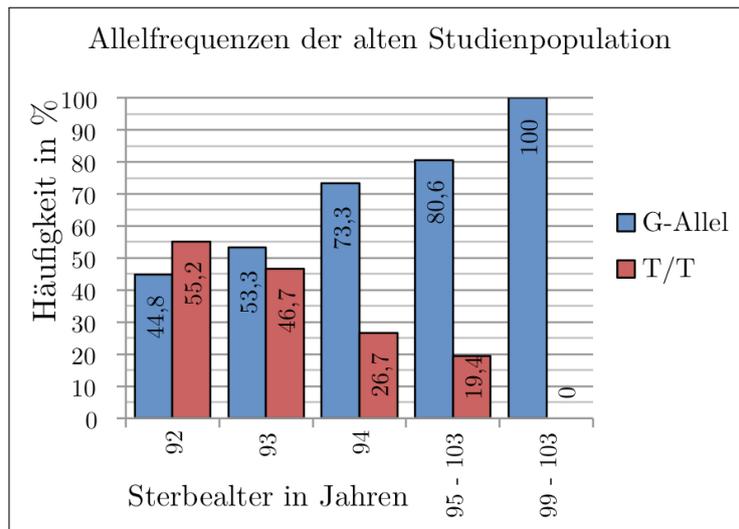


ABBILDUNG 4.5 – Verteilung der Allelfrequenzen des SNP309 der alten Studienpopulation zum jeweiligen Sterbealter. Umso höher das erreichte Lebensalter, desto häufiger die Frequenz des G-Allels.

weiblichen alten Studienpopulation war jedoch eine Häufigkeit des G-Allels von 71,2% zu beobachten. Es ist somit eine deutlich signifikante Divergenz zwischen den jungen und alten Frauen zu erkennen ($p=0.009$).

4.2.2 Vergleich der Überlebensdauer mit den Allelen

Im nächsten Schritt wurde eine Kaplan-Meier-Analyse der sehr alten Menschen in Bezug auf die einzelnen Genotypen durchgeführt. Sofort zeigte sich ein hoch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Genotyp und dem Sterbealter. So lebten die Träger beider G-Allele am längsten. Patienten mit T/G-Genotyp starben früher als Patienten mit G/G-Status, aber später als Patienten mit T/T-Genotyp (siehe Abbildung 4.6). Dieses Ergebnis ist hoch signifikant ($p=0.001$). Auch der durchgeführte F-Test bestätigte dieses Ergebnis ($p=0.003$).

Da dieser Effekt, wie bereits bei P53 Codon 72 beschrieben, vom Geschlecht abhängig sein kann, wurde auch hier eine Kaplan-Meier-Analyse durchgeführt. In der Tat zeigten sich auch beim SNP309 geschlechtsabhängige Unterschiede.

Die bei der männlichen sehr alten Studienpopulation durchgeführte Kaplan-Meier-Analyse zeigte keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Allel-Status und dem Sterbealter ($p=0.671$). Auch der F-Test konnte keinen Zusammenhang nachweisen ($p=0.952$). Sehr alte Männer, die Träger des T/T-Genotyps waren, starben im Durchschnitt mit 93,3 Jahren

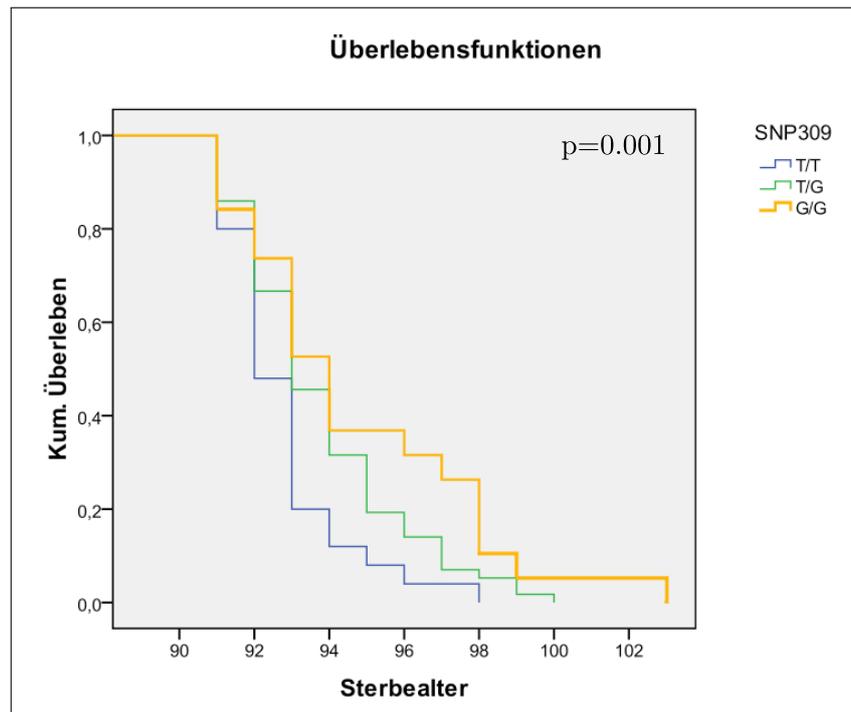


ABBILDUNG 4.6 – Kaplan-Meier-Kurve; Patienten mit T/G-Genotyp starben früher als Patienten mit G/G-Status, aber später als Patienten mit T/T-Genotyp.

[95% KI 92,0; 94,6]. T/G-Allelträger starben im Mittel mit 93,5 Jahren [95% KI 92,1; 95,0] und auch Männer mit G/G-Genotyp starben im Mittel mit 93,5 Jahren [95% KI 87,2; 99,9] (siehe Abbildung 4.7a). Es ergibt sich eine leicht verlängerte Überlebensdauer von ca. 0,3 Jahren [95% KI -1,4; 1,9 Jahre] bei Vorhandensein mindestens eines G-Allels ($p=0.75$) (siehe Abbildung 4.7b).

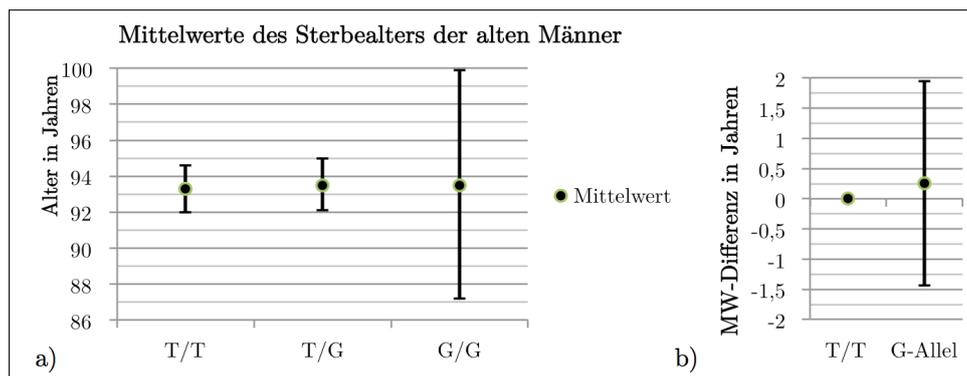


ABBILDUNG 4.7 – a) Mittelwerte des Sterbealters der sehr alten Männer getrennt nach Genotyp des SNP309 mit ihren jeweiligen 95% Konfidenzintervallen. b) Die Mittelwertdifferenz des Sterbealters zwischen dem T/T-Genotyp und dem G-Allel beträgt ca. 0,3 Jahre ($p=0.75$). Weiterhin sind das untere (-1,4 Jahre) und obere (1,9 Jahre) Konfidenzintervall zu erkennen.

Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse der Analyse bei den sehr alten Frauen. In der Kaplan-Meier-Analyse zeigte sich ein hoch signifikanter Zusammenhang zwischen dem SNP309-Genotyp und der Lebenserwartung ($p < 0.001$) (Daten nicht gezeigt). Auch beim durchgeführten F-Test konnte dieses Ergebnis bestätigt werden ($p = 0.003$). So starben Frauen mit T/T-Genotyp im Mittel mit 92,6 Jahren [95% KI 92,1; 93,1]. Waren die alten Frauen heterozygot, verstarben sie im Durchschnitt mit 93,8 Jahren [95% KI 93,2; 94,5]. Besaßen die Patientinnen einen G/G-Status so erreichten sie im Mittel 94,9 Jahre [95% KI 93,1; 96,7] (siehe Abbildung 4.8a).

Somit ergibt sich eine um 1,2 Jahre [95% KI 0,3; 2,1 Jahre] verlängerte Lebenszeit bei Frauen mit T/G-Status im Vergleich zum T/T-Genotyp ($p = 0.007$). Waren die Frauen Merkmalsträger beider G-Allele, lebten sie im Durchschnitt sogar 2,3 Jahre [95% KI 0,9; 3,6 Jahre] (entspricht 28 Monate) länger als Frauen mit T/T-Genotyp ($p = 0.002$) (siehe Abbildung 4.8b).

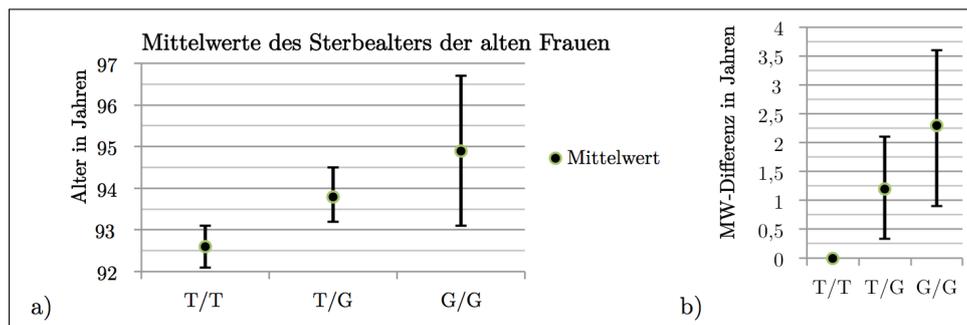


ABBILDUNG 4.8 – a) Mittelwerte des Sterbealters der sehr alten Frauen getrennt nach Genotyp des SNP309 mit ihren jeweiligen 95% Konfidenzintervallen. b) Die Abbildung zeigt die Mittelwertdifferenz des Sterbealters der alten Frauen zwischen T/G- oder G/G-Genotyp in Bezug auf den T/T-Genotyp. Diese Frauen lebten signifikant länger.

Die in den Kapiteln 4.2.2 und 4.2.1 dargestellten Ergebnisse machen klar, dass der SNP309 deutlich mit der Lebenszeit der weiblichen Individuen korreliert. Es liegt daher die Vermutung nahe, dass er durch seinen direkten Einfluss auf den p53-Pathway einen Effekt auf die physiologischen Alterungsvorgänge des Organismus hat.

4.3 Untersuchungen zum MDM4 SNP31826-Polymorphismus

Bereits in mehreren Studien konnte nachgewiesen werden, dass der SNP31826 des MDM4-Gens einen Einfluss auf unterschiedliche Tumoren hat. So sind Träger des T-Allels zwar mit einem früheren Auftreten von Ovarial- und Mammakarzinomen assoziiert (Atwal et al., 2009;

Kulkarni et al., 2009) – insgesamt zeigen sie aber bei Östrogenrezeptor-negativen Ovarialkarzinomen ein längeres Überleben als C-Allel Träger. Offensichtlich scheint die Tumorentwicklung und Tumorprogression nicht gleich reguliert zu sein. Es stellt sich daher die Frage, ob sich dieser Polymorphismus auch auf die Lebenserwartung auswirkt. Der Genotyp konnte bei 125 alten und 171 jungen Menschen bestimmt werden.

4.3.1 Vergleich der Allelverteilung zwischen jungen und alten Menschen

Im ersten Schritt sollten die Allelfrequenzen des SNP31826 der jungen und alten Menschen miteinander verglichen werden. Die Analyse zeigte keinen wesentlichen Unterschied zwischen den beiden Gruppen. So traten bei den alten Menschen der C/C-Genotyp mit 46,8% und der T/C-Status mit 46,0% etwas häufiger auf als bei der jungen Kontrollpopulation. Der T/T-Genotyp war dementsprechend bei den alten Menschen seltener vertreten. Diese Ergebnisse zeigten allerdings nur einen Trend ($p=0.426$) (Daten nicht gezeigt). Daraufhin wurde wieder eine Trennung nach dem Geschlecht vorgenommen.

TABELLE 4.5 – Verteilung der Genotypen des MDM4 SNP31826-Polymorphismus nach Altersgruppe und Geschlecht. Zwischen den jungen und alten Männern lässt sich eine unterschiedliche Allelverteilung erkennen.

Geschlecht			MDM4 SNP31826			Gesamt	Signifikanz
			C/C	T/C	T/T		
männlich	Jung	Anzahl	39	42	13	94	0.373
		%	41,5%	44,7%	13,8%	100%	
	Alt	Anzahl	12	13	1	26	
		%	46,2%	50%	3,8%	100%	
	Gesamt	Anzahl	51	55	14	120	
		%	42,5%	45,8%	11,7%	100%	
weiblich	Jung	Anzahl	37	33	7	77	0.961
		%	48,1%	42,9%	9,1%	100%	
	Alt	Anzahl	47	44	8	99	
		%	47,5%	44,4%	8,1%	100%	
	Gesamt	Anzahl	84	77	15	176	
		%	47,7%	43,8%	8,5%	100%	

Beim Vergleich der männlichen Studienteilnehmer fällt auf, dass sowohl C/C- (46,2%) als auch T/C-Träger (50%) in der alten Studienpopulation häufiger, der T/T-Genotyp (3,8%) jedoch seltener als in der jungen männlichen Kontrollpopulation auftritt. Dieses Ergebnis ist nicht signifikant ($p=0.373$), gibt aber einen Trend an (siehe Tabelle 4.5). Zwischen den weiblichen Gruppen sind allenfalls *geringe* Unterschiede in der Allelverteilung erkennbar.

Im nächsten Schritt wurden daraufhin, erneut nach Geschlecht getrennt, die Häufigkeiten der Allele in Bezug auf das Vorhandensein eines hetero- und homozygoten C-Allels (entspricht T/C- und C/C -Genotyp) mit dem T/T -Genotyp verglichen. So konnte beobachtet werden, dass das C-Allel mit 96,2% innerhalb der alten männlichen Studienpopulation häufiger auftritt als in der jungen Kontrollpopulation. Umgekehrt trat der T/T-Genotyp seltener auf (alt: 3,8%; jung: 13,8%) (siehe Tabelle 4.6). Der bereits beschriebene Trend tritt somit deutlicher hervor ($p=0.143$). Innerhalb der Gruppen der jungen und alten Frauen wiederum lassen sich ebenso minimale Unterschiede mit häufigerem Vorkommen des C-Allels in der Gruppe der alten Frauen erkennen ($p=0.51$).

TABELLE 4.6 – Verteilung der Genotypen des MDM4 SNP31826-Polymorphismus nach Altersgruppe und Geschlecht. In der Gruppe der alten Männer ist ein Trend zum C-Allel im Vergleich zu den jungen Männern erkennbar.

Geschlecht			MDM4 SNP31826		Gesamt	Signifikanz
			C/C und T/C	T/T		
männlich	Jung	Anzahl	81	13	94	0.143
		%	86,2%	13,8%	100%	
	Alt	Anzahl	25	1	26	
		%	96,2%	3,8%	100%	
	Gesamt	Anzahl	106	14	120	
		%	88,3%	11,7%	100%	
weiblich	Jung	Anzahl	70	7	77	0.510
		%	90,9%	9,1%	100%	
	Alt	Anzahl	91	8	99	
		%	91,9%	8,1%	100%	
	Gesamt	Anzahl	161	15	176	
		%	91,5%	8,5%	100%	

Aus den oben gemachten Beobachtungen ist ersichtlich, dass es keine wesentlichen Unterschiede beim Vergleich der alten Studienpopulation mit der jungen Kontrollpopulation gibt. Lediglich in der Gruppe der Männer lässt sich ein Trend mit gehäuftem Auftreten des C-Allels in der Gruppe der hoch betagten Menschen feststellen. Es stellte sich somit die Frage, ob sich innerhalb der Gruppe der alten Menschen Unterschiede in der Allelverteilung in Bezug auf das Sterbealter beobachten lassen.

4.3.2 Vergleich der Überlebensdauer mit den Allelen

Zunächst wurde ein F-Test zum Vergleich der Mittelwerte des Sterbealters der einzelnen Genotypen durchgeführt. Dabei hatten die alten Menschen, welche T/T-Träger waren, mit

92,8 Jahren [95% KI 91,1; 94,4 Jahre] das kürzeste Überleben. Menschen mit C/C-Genotyp lebten 93,4 Jahre [95% KI 92,8; 93,9 Jahre], und T/C-Träger überlebten mit 93,8 Jahren [95% KI 93,1; 94,4 Jahre] am längsten. Auch hier zeigte sich jedoch allenfalls ein minimaler Trend ($p=0.396$) (Daten nicht gezeigt).

Daraufhin wurde auch hier eine nach dem Geschlecht getrennte Analyse durchgeführt. In der Gruppe der hoch betagten Frauen spiegelte sich im F-Test ein ähnliches Ergebnis wieder. Auch hier lebten die Frauen mit T/T-Genotyp mit 93 Jahren [95% KI 91,1; 94,8 Jahre] am kürzesten, während T/C-Trägerinnen mit 93,8 Jahren [95% KI 93; 94,6 Jahre] am längsten überlebten. Homozygote C-Allel-Träger nahmen mit im Durchschnitt 93,5 Jahren [95% KI 92,8; 94,1 Jahre] eine Mittelstellung ein (siehe Abbildung 4.9a) ($p=0.648$).

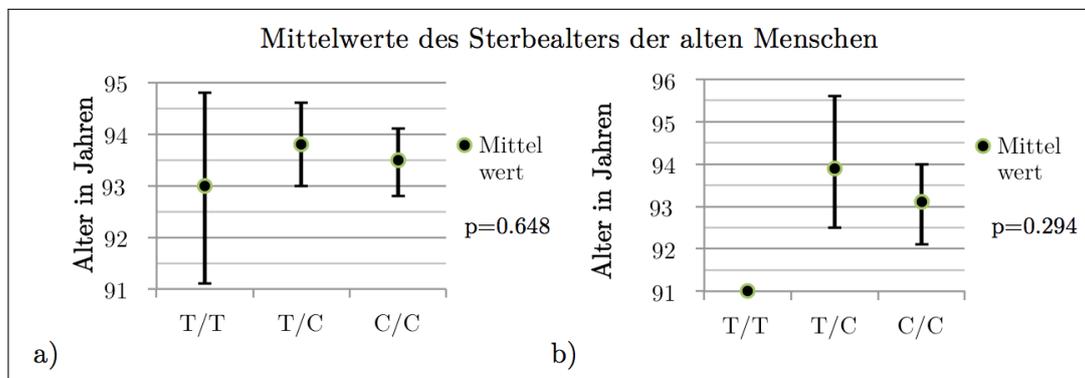


ABBILDUNG 4.9 – Mittelwerte des Sterbealters bei Frauen (a) und Männern (b) getrennt nach Genotyp des MDM4 SNP31826 mit ihren jeweiligen 95% Konfidenzintervallen

Frauen, die C/C-Träger waren, lebten somit im Durchschnitt 0,4 Jahre [95% KI -1,3; 2,2 Jahre] länger als homozygote T-Allel-Träger ($p=0.611$). Die Mitglieder der alten weiblichen Studienpopulation, welche heterozygot (T/C) waren, lebten 0,8 Jahre [95% KI -1,2; 2,7 Jahre] länger als homozygote Frauen mit T-Allel-Genotyp ($p=0.43$).

Ein ähnliches Ergebnis konnte auch bei der männlichen Population beobachtet werden. Mittels F-Test wurde gezeigt, dass Männer mit T/T-Status mit 91 Jahren am kürzesten, T/C-Träger mit 93,9 Jahren [95% KI 92,5; 95,6 Jahre] am längsten lebten. Die Mittelwerte des Sterbealters der C/C-Genotypen lagen auch hier wieder mit 93,1 Jahren [95% KI 92,1; 94 Jahre] in der Mitte ($p=0.288$) (siehe Abbildung 4.9b). Auch in der Kaplan-Meier-Analyse ist diese Beobachtung ersichtlich ($p=0.753$) (siehe Abbildung 4.10).

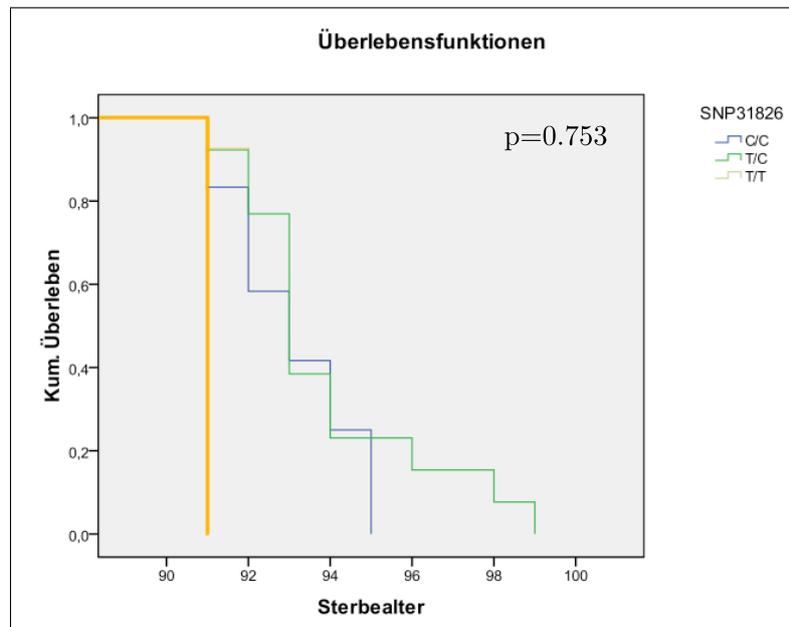


ABBILDUNG 4.10 – Kaplan-Meier-Kurve; Männer, die heterozygot für beide Allele waren, zeigten ein verlängertes Überleben im Vergleich zum T/T-Genotyp. Homozygote C-Allel-Träger nahmen einen Zwischenstatus ein.

Da offensichtlich das C-Allel mit einem längeren Überleben assoziiert ist, sollte im nächsten Schritt untersucht werden, wie sich das Sterbealter beim Vergleich vom T/T-Genotyp mit dem C-Allel (entspricht T/C- und C/C-Genotyp) verhält.

Die Analyse der alten Frauen ergab die gleiche bereits beschriebene Beobachtung, dass hetero- und homozygote C-Allel-Trägerinnen mit 93,6 Jahren [95% KI 93,1; 94,1] länger lebten als T/T-Trägerinnen mit 93 Jahren [95% KI 91,1; 94,8 Jahre] ($p=0.498$) (siehe Abbildung 4.11a). Somit ergibt sich ein um 0,6 Jahre [95% KI -1,2; 2,4 Jahre] verlängertes Überleben.

Auch bei den alten Männern konnte der gleiche Trend festgestellt werden. So lebten Männer, die Träger mindestens eines C-Allels waren im Durchschnitt 93,5 Jahre [95% KI 92,7; 94,6 Jahre], während T/T-Träger nur 91 Jahre lebten ($p=0.229$) (siehe Abbildung 4.11b). Es ist zu erkennen, dass diese Männer 2,5 Jahre [95% KI -1,7; 6,7 Jahre] früher starben als Träger des C-Allels.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl in der Gruppe der alten Frauen als auch in der der alten Männer ein gleicher Trend zur verlängerten Lebenserwartung bei Vorhandensein mindestens eines C-Allels feststellbar ist, wenngleich keines dieser Ergebnisse statistisch signifikant ist. Bei einer größeren Fallzahl der Studienpopulation könnte der Effekt aber deutlicher ausfallen. Auch wird die Beobachtung durch die in Kapitel 4.3.1 gewonnene Erkenntnis

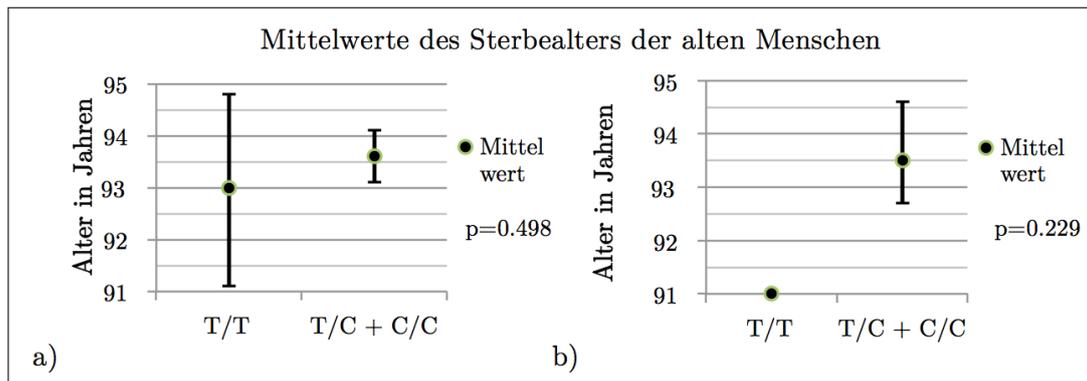


ABBILDUNG 4.11 – Mittelwerte des Sterbealters bei den alten Frauen (a) und Männern (b) getrennt nach Genotyp des MDM4 SNP31826 mit ihren jeweiligen 95% Konfidenzintervallen. In beiden Geschlechtern ist ein Trend zum längeren Überleben bei Vorhandensein mindestens eines C-Allels zu erkennen.

gestützt, dass das C-Allel in der Gruppe der alten männlichen Studienpopulation häufiger vorkommt als in der Gruppe der jungen männlichen Kontrollpopulation.

4.4 Untersuchungen zum MDM4 SNP34091-Polymorphismus

Wie bereits in Kapitel 1.4.4 beschrieben konnte gezeigt werden, dass auch der SNP34091 einen Effekt auf den Organismus hat. So unterliegt das C-Allel einer Regulation der microRNA hsa-miR-191, während das A-Allel nicht beeinflusst wird. Bei Vorhandensein eines C-Allels müsste MDM4 also vermindert exprimiert und so seine potentiell onkogene Wirkung abgeschwächt werden. In der Tat konnte beobachtet werden, dass der Wildtyp Genotyp (A/A) deutlich häufiger in Patienten mit high-grade Ovarialkarzinomen vertreten war (Wynendaele et al., 2010). Die Frage ist nun, ob sich der Polymorphismus auch in einem Unterschied der Lebenserwartung bemerkbar macht. In den untersuchten Probanden konnte bei 122 alten Menschen und bei 170 jungen Menschen der SNP34091-Status bestimmt werden.

4.4.1 Vergleich der Allelverteilung zwischen jungen und alten Menschen

Zunächst sollte überprüft werden, ob sich ein Unterschied in der Allelverteilung zwischen der jungen Kontrollpopulation und der alten Studienpopulation feststellen lässt. In der ersten Analyse waren die Allele in beiden Gruppen sehr ähnlich verteilt, so dass sich kein signifikanter

Unterschied feststellen ließ ($p=0.648$). Auch die Auftrennung nach dem Geschlecht änderte nichts an dieser Beobachtung.

TABELLE 4.7 – Verteilung der Genotypen des MDM4 SNP34091-Polymorphismus nach Altersgruppe und Geschlecht. Zwischen den Männern und Frauen ist eine unterschiedliche Allelverteilung erkennbar. Beim Vergleich der jungen und alten Menschen lässt sich kein wesentlicher Unterschied erkennen.

Geschlecht			MDM4 SNP34091			Gesamt	Signifikanz
			A/A	A/C	C/C		
männlich	Jung	Anzahl	45	37	11	93	0.451
		%	48,4%	39,8%	11,8%	100%	
	Alt	Anzahl	11	12	1	24	
		%	45,8%	50%	4,2%	100%	
	Gesamt	Anzahl	56	49	12	117	
		%	47,9%	41,9%	10,3%	100%	
weiblich	Jung	Anzahl	41	31	5	77	0.940
		%	53,2%	40,3%	6,5%	100%	
	Alt	Anzahl	54	37	7	98	
		%	55,1%	37,8%	7,1%	100%	
	Gesamt	Anzahl	95	68	12	175	
		%	54,3%	38,9%	6,9%	100%	

Auffällig ist jedoch, dass der SNP34091 zwischen den Geschlechtern anders verteilt ist. Bei der Gegenüberstellung aller Männer mit allen Frauen ist zu sehen, dass der A/A-Genotyp bei den Männern zu 47,9% vertreten ist, während dieser bei den Frauen eine Häufigkeit von 54,3% hat. Der A/C-Genotyp kommt bei beiden Geschlechtern in etwa gleich häufig vor (Männer: 41,9%; Frauen: 38,9%) und der C/C-Genotyp tritt bei den Männern (10,3%) häufiger auf als bei den Frauen (6,9%) (siehe Tabelle 4.7).

Beim Vergleich der jungen und alten Männer fällt auf, dass bei der alten Studienpopulation der A/C-Genotyp mit 50% häufiger auftritt als bei der jungen Kontrollpopulation (39,8%), während diese Beziehung beim C/C-Genotyp invers ist (jung: 11,8%; alt: 4,2%). Diese Beobachtung ist aber auf Grund der recht geringen Anzahl der Studienteilnehmer (24 alte Männer) nicht aussagekräftig ($p=0.451$) und zeigt allenfalls einen Trend an. Beim Vergleich der jungen weiblichen Kontrollpopulation mit der alten weiblichen Studienpopulation ist in Bezug auf die Allelfrequenzen kein wesentlicher Unterschied erkennbar ($p=0.94$).

Im nächsten Schritt wurden daraufhin erneut nach Geschlecht getrennt die Häufigkeiten der Allele in Bezug auf das Vorhandensein eines hetero- und homozygoten C-Allels (entspricht A/C- und C/C -Genotyp) mit dem A/A-Genotyp verglichen.

Wieder ist zu erkennen, dass beim Vergleich der Männer das C-Allel bei der alten Studienpopulation mit 54,2% etwas häufiger auftritt als bei der jungen Kontrollpopulation (51,6%) ($p=0.503$; siehe Tabelle 4.8). Bei den Frauen hingegen kam das C-Allel mit einer Häufigkeit von 44,9% bei der alten Studienpopulation etwas seltener vor als bei der jungen weiblichen Kontrollpopulation (46,8%) (siehe Tabelle 4.8), wenngleich auch dieses Ergebnis nicht signifikant war ($p=0.463$).

TABELLE 4.8 – Übersicht über die Verteilung der Allele des MDM4 SNP34091-Polymorphismus nach Altersgruppe und Geschlecht. Zwischen den Männern und Frauen ist eine unterschiedliche Allelverteilung erkennbar. Beim Vergleich der jungen und alten Menschen lässt sich kein wesentlicher Unterschied erkennen.

Geschlecht			MDM4 SNP34091		Gesamt	Signifikanz
			A/A	A/C + C/C		
männlich	Jung	Anzahl	45	48	93	0.503
		%	48,4%	51,6%	100%	
	Alt	Anzahl	11	13	24	
		%	45,8%	54,2%	100%	
	Gesamt	Anzahl	56	61	117	
		%	47,9%	52,1%	100%	
weiblich	Jung	Anzahl	41	36	77	0.463
		%	53,2%	46,8%	100%	
	Alt	Anzahl	54	44	98	
		%	55,1%	44,9%	100%	
	Gesamt	Anzahl	95	80	175	
		%	54,3%	45,7%	100%	

4.4.2 Vergleich der Überlebensdauer mit den Allelen

Nachfolgend wurde ein F-Test zum Vergleich des mittleren Sterbealters der alten Studienpopulation mit dem jeweiligen Genotyp durchgeführt. Hierbei zeigten die Patienten mit C/C-Genotyp das kürzeste Überleben (92,8 Jahre), während Menschen mit A/A-Status im Mittel mit 93,2 Jahren verstarben. Das höchste Sterbealter lag bei Patienten mit A/C-Genotyp (94,0 Jahre). Diese Ergebnisse waren sowohl im durchgeführten F-Test ($p=0.146$) als auch der Kaplan-Meier-Analyse ($p=0.41$) nicht signifikant. Im Weiteren sollte die mittlere Überlebenszeit der alten Menschen bei Vorhandensein eines hetero- oder homozygoten C-Allels (entspricht C/C- und A/C-Genotyp) mit der eines A/A-Genotyps verglichen werden. In der Kaplan-Meier-Analyse ist zu erkennen, dass Menschen mit mindestens einem C-Allel länger lebten als jene mit A/A-Genotyp ($p=0.146$) (siehe Abbildung 4.12).

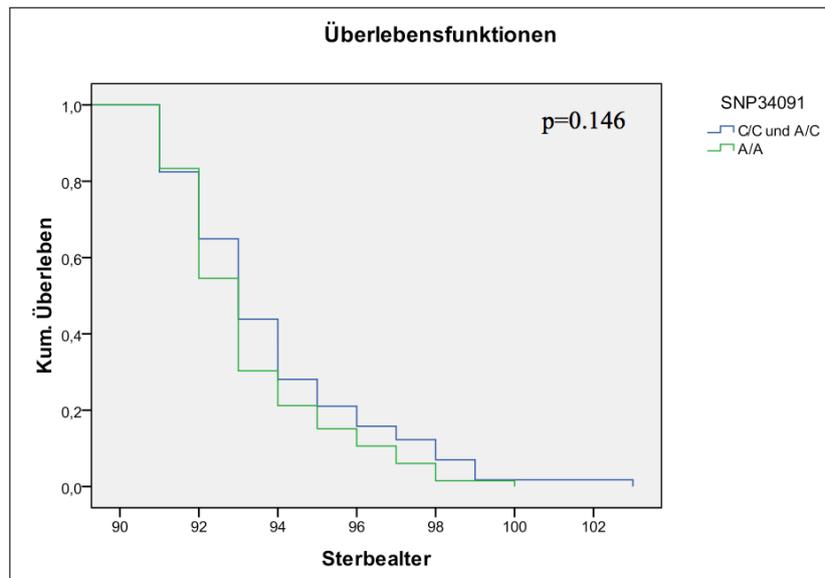


ABBILDUNG 4.12 – Kaplan-Meier-Kurve; Patienten mit mindestens einem C-Allel zeigen ein verlängertes Überleben im Vergleich zum A/A-Genotyp.

Auch der F-Test bestätigte dieses Ergebnis ($p=0.17$), wobei Menschen mit C-Allel im Durchschnitt 93,8 Jahre lebten und damit 0,6 Jahre (ca. 7 Monate) älter wurden als Menschen mit A/A-Allel (93,2 Jahre). Im Anschluss wurde eine nach Geschlechtern getrennte Analyse der Studienpopulation durchgeführt. Sowohl bei den Männern als auch bei den Frauen war der gleiche Trend erkennbar. Es konnte eine Verlängerung der Lebensdauer bei mindestens einem C-Allel beobachtet werden. So starben die alten Männer, die hetero- oder homozygot für das C-Allel waren, im Durchschnitt mit 93,8 [95% KI 92,4; 95,1] Jahren – die alten Frauen ebenfalls mit 93,8 [95% KI 93,1; 94,6] Jahren. War ein A/A-Genotyp vorhanden, so lebten die männlichen Studienteilnehmer im Mittel 92,9 [95% KI 92,1; 93,8] Jahre, während die alten Frauen mit 93,3 [95% KI 92,7; 93,9] Jahren verstarben (siehe Abbildung 4.13a und b). Bei Vorhandensein mindestens eines C-Allels starben die männlichen alten Studienteilnehmer im Durchschnitt 0,9 Jahre [95% KI -0,9; 2,6 Jahre] (ca. 11 Monate, $p=0.316$), die weiblichen Studienteilnehmer 0,5 Jahre [95% KI -0,5; 1,5 Jahre] (6 Monate, $p=0.294$) später als jene mit A/A-Genotyp. Diese Ergebnisse waren jedoch sowohl in der Kaplan-Meier-Analyse als auch im F-Test nicht signifikant. Alles in allem ist offensichtlich ein Trend erkennbar, der sich unter einer entsprechend größeren Studienpopulation wahrscheinlich deutlicher abzeichnen würde.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der SNP34091-Polymorphismus in beiden Geschlechtern unterschiedlich verteilt ist und es auch leichte Unterschiede der Allelhäufigkeiten zwischen jungen und alten Menschen gibt. Innerhalb der Gruppe der sehr alten Menschen

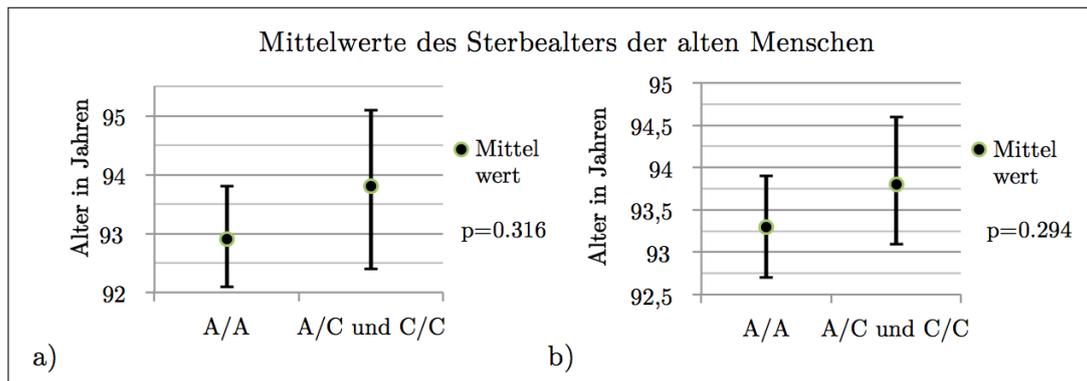


ABBILDUNG 4.13 – Mittelwerte des Sterbealters bei Männern (a) und Frauen (b) getrennt nach Genotyp des MDM4 SNP34091 mit ihren jeweiligen 95% Konfidenzintervallen.

konnte eine leicht verlängerte Lebenserwartung bei Vorhandensein eines C-Allels im Vergleich zum A/A-Status beobachtet werden. Der Polymorphismus spielt also allenfalls eine geringe untergeordnete Rolle in einer Veränderung der Lebenserwartung und des Alterns.

4.5 Untersuchungen zum rs319217-Polymorphismus im PPP2R2B-Gen

Bereits vor einigen Jahren konnte gezeigt werden, dass Untereinheiten des PP2A-Enzymkomplexes in einer Vielzahl von Tumoren, wie zum Beispiel primären Lungentumoren, Kolonkarzinomen, Melanomen und Non-Hodkin-Lymphomen, mutiert waren (Wang et al., 1998). Des Weiteren wurde beobachtet, dass bestimmte Aminosäuren des Proteins in Mamma-Karzinomen häufiger phosphoryliert waren (Wong et al., 2009). In einer Kohorte von Frauen mit Brustkrebs konnte nachgewiesen werden, dass der in der vorliegenden Arbeit untersuchte SNP (rs319217) mit einem unterschiedlichen Ansprechen der Chemotherapie sowie einem unterschiedlichen Zeitpunkt der Diagnosestellung assoziiert war. So wiesen Träger des A-Allels ein besseres Ansprechen der Chemotherapie auf. Zusätzlich wurden Frauen mit G/G-Genotyp 3 Jahre früher diagnostiziert als Träger des A-Allels (Vazquez et al., 2011).

Die Vermutung ist nun, dass sich dieser Polymorphismus auf die Alterungsvorgänge der Zellen und damit auch auf den gesamten Organismus auswirkt. Aus diesem Grund wurden zunächst die Allelfrequenzen der jungen Kontroll- mit denen der alten Studienpopulation verglichen. Hierbei konnte in 124 der alten und 170 der jungen Menschen der Genotyp des Polymorphismus bestimmt werden.

4.5.1 Vergleich der Allelverteilung zwischen jungen und alten Menschen

Ein erster Vergleich zwischen jungen und alten Menschen zeigte keine deutlichen Unterschiede ($p=0.288$). Lediglich der G/G-Genotyp trat bei der alten Studienpopulation etwas häufiger auf (Daten nicht gezeigt). Weiterhin wurde eine nochmalige nach Geschlecht getrennte Analyse durchgeführt (siehe Tabelle 4.9).

TABELLE 4.9 – Verteilung der Allele des PPP2R2B rs319217-Polymorphismus nach Altersgruppe und Geschlecht. Beim Vergleich der jungen und alten Männer lässt sich ein deutlicher Trend zu einem häufigeren Auftreten des G/G-Genotyps im hohen Alter erkennen.

Geschlecht			PPP2R2B rs319217			Gesamt	Signifikanz
			A/A	A/G	G/G		
männlich	Jung	Anzahl	45	43	5	93	0.066
		%	48,4%	46,2%	5,4%	100%	
	Alt	Anzahl	10	10	5	25	
		%	40%	40%	20%	100%	
weiblich	Jung	Anzahl	30	39	8	77	0.543
		%	39,0%	50,6%	10,4%	100%	
	Alt	Anzahl	46	42	11	99	
		%	46,5%	42,4%	11,1%	100%	

Es zeigt sich, dass in der männlichen Studienpopulation deutlich häufiger der G/G-Genotyp (20%) auftritt als in der männlichen Kontrollpopulation (5,4%). Dieses Ergebnis erreicht fast das Signifikanzniveau ($p=0.066$) (siehe Tabelle 4.9). Umgekehrt lässt sich feststellen, dass die jungen Männer zu 94,6% hetero- oder homozygot für das A-Allel sind, während dieses bei den alten Männern nur zu 80% auftritt ($p=0.02$) (siehe Abbildung 4.14). Der G/G-Genotyp scheint sich also positiv auf die Überlebensdauer bei Männern auszuwirken.

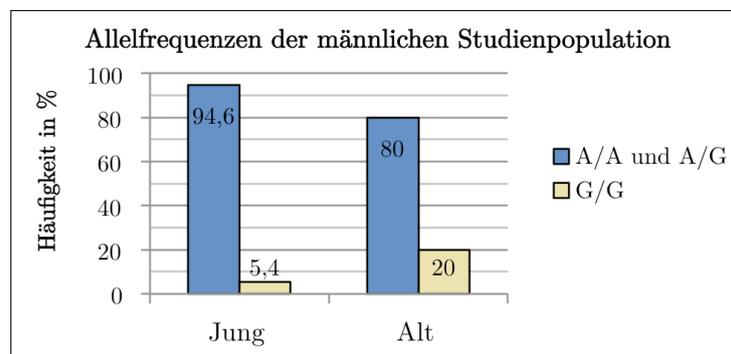


ABBILDUNG 4.14 – Verteilung der Allelfrequenzen zwischen der männlichen jungen Kontrollpopulation und der männlichen alten Studienpopulation. Bei den hoch betagten Männern tritt der G/G-Genotyp signifikant ($p=0.02$) häufiger auf als bei den jungen Männern.

Beim Vergleich der jungen und alten Frauen ist hingegen zu erkennen, dass der G/G-Genotyp in beiden Altersgruppen etwa gleich häufig vorkommt, was damit nicht den bei den Männern gemachten Beobachtungen entspricht. Paradoxerweise tritt sogar der A/A-Genotyp in der alten weiblichen Studienpopulation häufiger (46,5%) auf als bei der jungen weiblichen Kontrollpopulation (39%) (siehe Tabelle 4.9), wenngleich dieses Ergebnis nicht signifikant ist ($p=0.543$).

In der weiteren Analyse fiel auf, dass die Allele zum Sterbealter der Frauen unterschiedlich verteilt waren. So trat bei Patientinnen, die mit 92 Jahren verstorben sind, der A/A-Genotyp zu 30,4% auf, während dieser bei Patientinnen, die mit 93 Jahren verstarben, schon zu 39,1% auftrat. Von 25 Patientinnen, die zwischen dem 95. und 103. Lebensjahr verstarben, haben 15 Patientinnen diesen Genotyp, was einer Häufigkeit von 60% entspricht. Ab einem Sterbealter von 99 Jahren und älter trat ausschließlich das homozygote A-Allel auf (Daten nicht gezeigt). Es liegt also offensichtlich in Bezug auf das erreichte Lebensalter eine unterschiedliche Verteilung des A/A-Genotyps vor. Frauen, die erst im sehr hohen Lebensalter verstorben sind, weisen häufiger den homozygoten A/A-Genotyp auf.

Aus diesem Grund wurde eine nochmalige Analyse der jungen und alten Frauen durchgeführt. Dabei wurden nur die hoch betagten weiblichen Studienteilnehmer eingeschlossen, die älter als 93 Jahre geworden sind. In der Tat ließ sich deutlich erkennen, dass bei den jungen Frauen das hetero- und homozygote G-Allel zu 61% auftrat, während es bei den alten Frauen nur zu 36,1% vertreten war. Umgekehrt trat der A/A-Genotyp bei den alten weiblichen Studienteilnehmern signifikant ($p=0.011$) häufiger auf (63,9%) (siehe Abbildung 4.15).

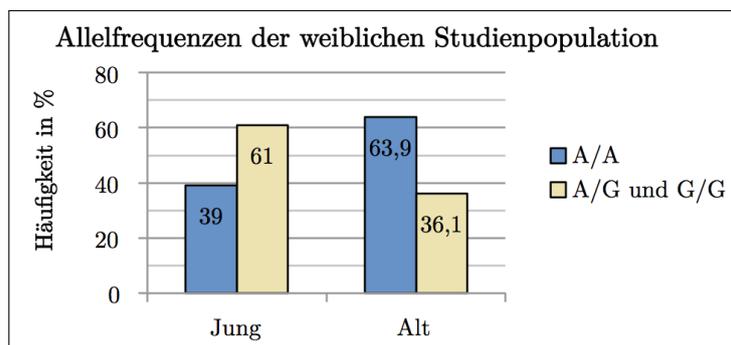


ABBILDUNG 4.15 – Verteilung der Allelfrequenzen zwischen der weiblichen jungen Kontrollpopulation und der weiblichen alten Studienpopulation (Sterbealter > 93). Bei den hoch betagten Frauen tritt der A/A-Genotyp signifikant ($p=0.011$) häufiger auf als bei den jungen Frauen.

4.5.2 Vergleich der Überlebensdauer mit den Allelen

Auf Grund der oben gemachten Beobachtungen war es von Interesse, ob sich die geschlechtsspezifischen Unterschiede auch innerhalb der Gruppe der alten Menschen erkennen lassen. Zunächst wurde ein F-Test zum Vergleich des mittleren Sterbealters der alten Studienpopulation mit dem jeweiligen Genotyp durchgeführt. Dieser zeigt ein im Trend ($p=0.19$) längeres Überleben bei Vorhandensein eines A-Allels (Mittelwerte in Jahren: A/A=93,9; A/G=93,4; G/G=92,7).

Der nächste Schritt war eine nach Geschlecht getrennte Analyse. Wie in Kapitel 4.5.1 beschrieben trat bei den alten männlichen Studienteilnehmern signifikant häufiger der G/G-Genotyp auf als bei der männlichen Kontrollgruppe. Diese Beobachtung müsste sich auch innerhalb der alten Studienpopulation durch ein längeres Überleben von Trägern dieses Genotyps bemerkbar machen.

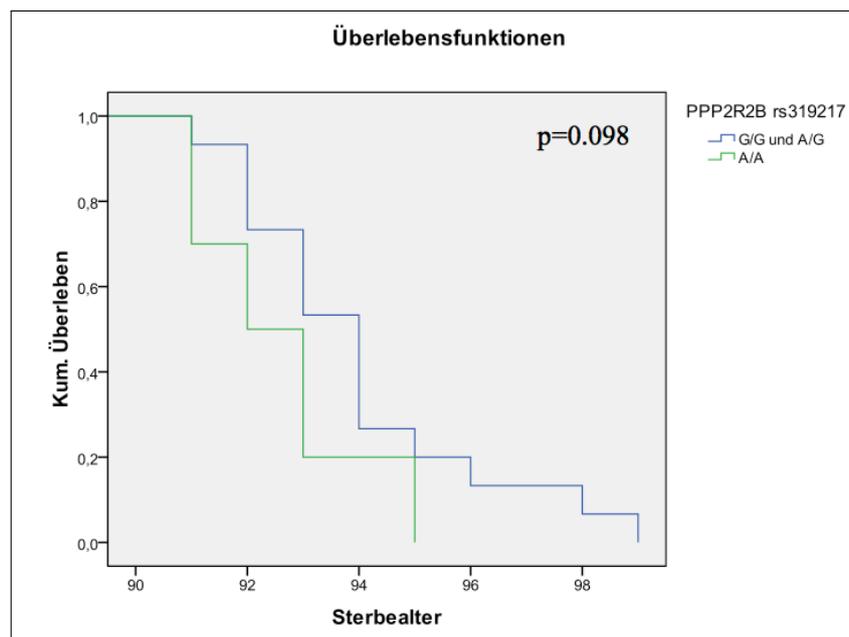


ABBILDUNG 4.16 – Kaplan-Meier-Kurve; Männer mit mindestens einem G-Allel zeigen ein verlängertes Überleben im Vergleich zum A/A-Genotyp.

In der Tat ist in der Kaplan-Meier-Analyse der Trend erkennbar, dass männliche Patienten, welche mindestens ein G-Allel besaßen, später verstarben als alte Männer mit A/A-Genotyp. Dieses Ergebnis war nicht signifikant ($p=0.098$), könnte bei einer größeren männlichen Studienpopulation aber wahrscheinlich deutlicher ausfallen (siehe Abbildung 4.16). Auch der durchgeführte t-Test zum Vergleich der Mittelwerte des Sterbealters lieferte ein ähnliches Er-

gebnis. So starben männliche Patienten mit mindestens einem G-Allel im Mittel mit 94 Jahren (95% KI 92,8; 95,2), während Patienten mit A/A-Genotyp im Durchschnitt bereits mit 92,6 Jahren (95% KI 91,5; 93,7) verstarben ($p=0.097$). Sie lebten somit statistisch 1,4 Jahre [95% KI -0,3; 3,1 Jahre] (ca. 17 Monate) kürzer als Männer mit mindestens einem G-Allel (siehe Abbildung 4.17a).

In Analogie dazu wurden die weiblichen alten Studienteilnehmer untersucht. Die Kaplan-Meier-Analyse zeigt, dass die alten Frauen, die Träger des A/A-Genotyps waren, länger lebten als Frauen, die hetero- oder homozygot für das G-Allel waren ($p=0.021$) (siehe Abbildung 4.18).

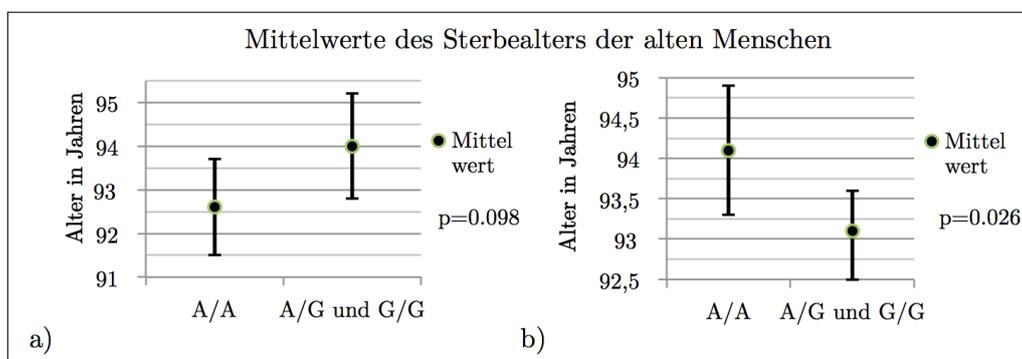


ABBILDUNG 4.17 – Mittelwerte des Sterbealters bei Männern (a) und Frauen (b) getrennt nach Genotyp des PPP2R2B rs319217-Polymorphismus mit ihren jeweiligen 95% Konfidenzintervallen.

Dieses Ergebnis ist somit genau entgegengesetzt zu den Beobachtungen der Männer, bei denen die Patienten mit A/A-Genotyp kürzer lebten. Es wird zusätzlich gestützt durch die in Kapitel 4.5.1 beschriebenen inversen Beziehungen zwischen Männern und Frauen. Im entsprechenden t-Test war erkennbar, dass Frauen, die hetero- oder homozygot für das G-Allel waren, im Mittel mit 93,1 Jahren (95% KI 92,5; 93,6) verstarben. Alte Frauen, die einen A/A-Genotyp besaßen, wurden im Durchschnitt 94,1 Jahre (95% KI 93,3; 94,9) alt ($p=0.026$) (siehe Abbildung 4.17b). Damit ergibt sich eine im Mittel um 1,1 Jahre [95% KI 0,1; 2,0 Jahre] verlängerte Lebenszeit bei Frauen mit A/A-Genotyp im Vergleich zu Frauen mit G-Allel ($p=0.026$).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der rs319217-Polymorphismus ein unterschiedlich gehäuftes Auftreten in den beiden Altersgruppen hat. Dieses Ergebnis ist abhängig vom Geschlecht. Es ist davon auszugehen, dass der Polymorphismus einen geschlechtsspezifischen Einfluss auf den p53-Pathway und damit möglicherweise auch auf die Alterungsvorgänge eines Organismus hat.

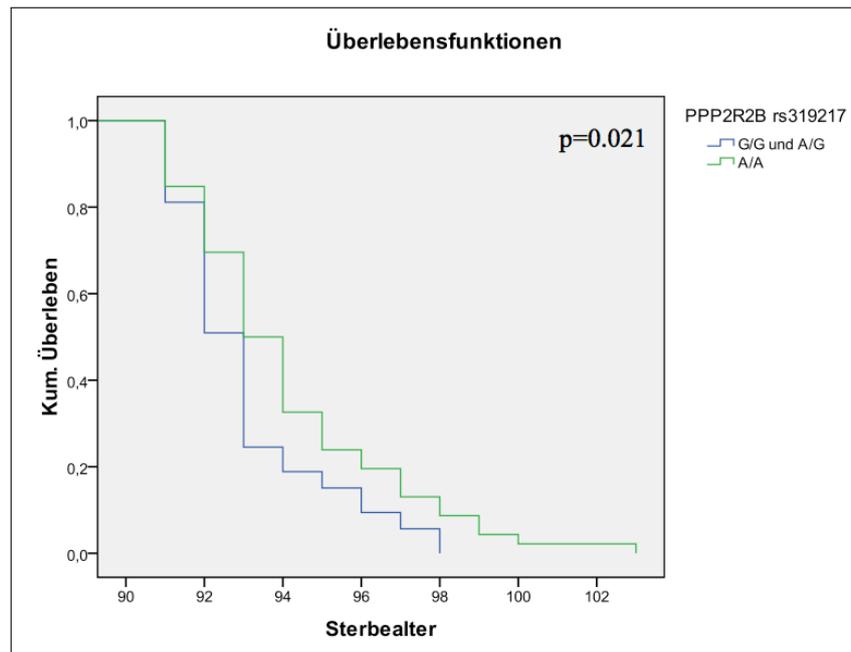


ABBILDUNG 4.18 – Kaplan-Meier-Kurve; Frauen mit einem A/A-Genotyp zeigen ein verlängertes Überleben im Vergleich zum Patientinnen mit mindestens einem G-Allel.

4.6 Untersuchungen zur Kombination mehrerer Polymorphismen

Wie in den vorherigen Abschnitten dieser Arbeit bereits beschrieben, wurde untersucht, ob die einzelnen fünf Polymorphismen einen Effekt auf die Überlebensdauer haben. Dabei ergaben sich teilweise signifikante Unterschiede. Es ist daher nun von Interesse, ob auch die Kombination der Allele von den beiden wichtigen Polymorphismen P53 Codon 72 und SNP309 eine veränderte Lebenserwartung der sehr alten Menschen zeigt.

4.6.1 Kombination von P53 Codon 72 und SNP309

Hierbei sollte der P53 Codon 72-Polymorphismus zusammen mit dem MDM2 SNP309 verglichen werden. Wie bereits in Kapitel 4.1.2 und Kapitel 4.2.2 beschrieben, konnte bei beiden SNPs vor allem bei den *weiblichen* alten Menschen ein Unterschied in der Überlebensdauer beobachtet werden, weshalb im Folgenden nur die weiblichen Studienteilnehmer betrachtet werden sollen. So lebten die Frauen, welche hetero- oder homozygot für das Pro-Allel des P53 Codon 72 waren, im Durchschnitt 0,9 Jahre länger als Arg/Arg-Träger. Beim MDM2 SNP309 ergibt sich eine um 1,2 Jahre verlängerte Lebenszeit bei Frauen mit T/G-Genotyp und eine um 2,3 Jahre verlängerte Lebenszeit bei Frauen mit G/G-Genotyp im Vergleich

zum T/T-Genotyp. Frauen, die Träger mindestens eines Pro-Allels (P53 Codon 72) und eines G/G-Genotyps (MDM2 SNP309) sind, sollten demnach eine längere Lebenserwartung haben als Trägerinnen des Arg/Arg- (P53 Codon 72) und T/T-Genotyps (MDM2 SNP309).

In der Tat war der durchgeführte F-Test zum Vergleich der Mittelwerte des Sterbealters mit $p=0.007$ deutlich signifikant. Im Weiteren wurden mehrere t-Tests zum Vergleich der Mittelwerte bei unterschiedlichem Allelbesatz durchgeführt. Alte Frauen mit Arg/Arg- und T/T-Genotyp (im Folgenden als Referenzgruppe 1 bezeichnet) lebten im Mittel 92,6 Jahre, während Frauen mit mindestens einem Pro-Allel (Arg/Pro oder Pro/Pro) und T/T-Genotyp ebenfalls mit 92,6 Jahren verstarben und sich somit kein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Gruppen ergibt ($p=0.899$). Verglichen mit der Referenzgruppe 1 lebten die alten Frauen (Arg/Pro oder Pro/Pro und T/G) mit 94,5 Jahren ca. 1,9 Jahre [95% KI 0,4; 3,3 Jahre; $p=0.015$] und die alten Frauen (Arg/Pro oder Pro/Pro und G/G) mit 95,3 Jahren im Mittel 2,7 Jahre [95% KI 0,9; 4,4 Jahre; $p=0.005$] länger (siehe Abbildung 4.19a).

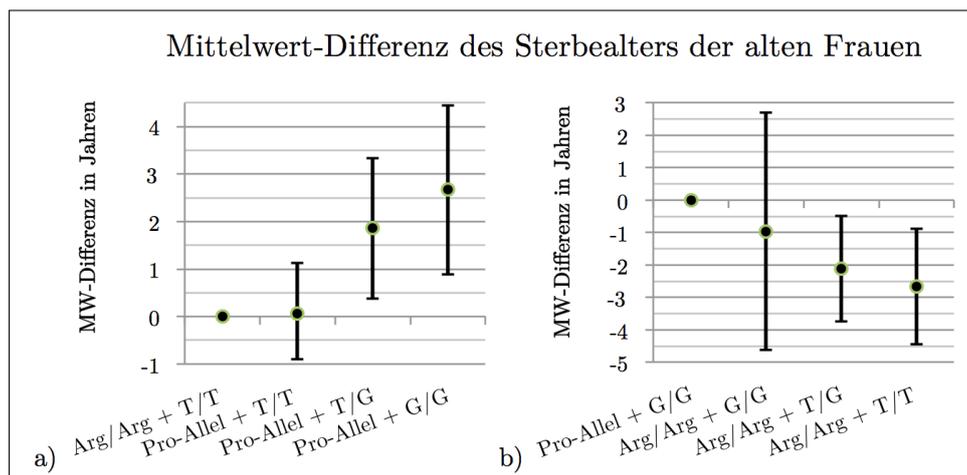


ABBILDUNG 4.19 – Mittelwertdifferenz (mit ihren jeweiligen 95% Konfidenzintervallen) des Sterbealters der alten Frauen in Bezug auf den P53 Codon 72- und MDM2 SNP309-Polymorphismus. (a) Der Genotyp Arg/Arg + T/T fungiert als Referenz. Es findet sich eine verlängerte Lebensdauer bei Vorhandensein eines Pro-Allels (P53 Codon 72) und eines T/G- oder G/G-Genotyps (MDM2 SNP309). (b) Der Genotyp Pro-Allel + G/G ist die Referenzgruppe. Es zeigt sich eine verkürzte Lebensdauer bei Vorhandensein eines Arg/Arg-Genotyps (P53 Codon 72) und eines T/G- oder T/T-Genotyps (MDM2 SNP309).

Des Weiteren wurde eine zweite Referenzgruppe (mindestens ein Pro-Allel (P53) und G/G-Genotyp (MDM2)) erstellt. Verglichen mit dieser Referenzgruppe lebten die alten Frauen mit Arg/Arg- und G/G-Genotyp ca. ein Jahr [95% KI 2,7; -4,6 Jahre; $p=0,586$] und Frauen mit Arg/Arg- und T/G-Genotyp sogar 2,1 Jahre [95% KI -0,5; -3,7 Jahre; $p=0,013$] kürzer.

Frauen, die einen Arg/Arg- und T/T-Genotyp aufwiesen, lebten 2,7 Jahre [95% KI -0,9; -4,4 Jahre; $p=0.005$] kürzer als die Frauen der Referenzgruppe 2 (siehe Abbildung 4.19b).

Es ist ersichtlich, dass die Kombination der zum Überleben vorteilhaften Allele beider Polymorphismen mit einer offensichtlich noch längeren Lebenserwartung korreliert als die Lebenserwartung der Einzelallele beider Polymorphismen. So überlebten sehr alte Frauen, die Träger mindestens eines Pro-Allels (P53 Codon 72) waren, 0,9 Jahre länger als die Vergleichsgruppe. Frauen mit G/G-Genotyp (MDM2 SNP309) lebten 2,3 Jahre länger. Die Kombination der beiden SNPs (Pro-Allel und G/G-Genotyp) verlängerte die Lebenserwartung der Frauen sogar um 2,7 Jahre (entspricht ca. 32 Monate).

5

Kapitel 5

Diskussion

Gegenwärtig geht man davon aus, dass Altern durch die Anhäufung von molekularen und zellulären Schäden erfolgt. Diese treten durch die zunehmenden Einschränkungen der Aufrechterhaltung von Zellfunktionen und der Reparatur von somatischen Zellen und Geweben auf (Kirkwood, 1996). Das Überleben vieler Organismen in der Natur ist durch eine Mortalität durch äußere schädliche Einflüsse (z.B. Prädation, Infektionen) eingeschränkt und weniger durch intrinsische Akkumulation von Schäden. Sie sterben somit aufgrund extrinsischer Ursachen lange bevor sich Alterserscheinungen überhaupt bemerkbar machen (Schmidt et al., 2007). Die menschliche Lebenserwartung hingegen (speziell die der Einwohner von Industriestaaten) hat sich in vergangenen Jahrhunderten drastisch erhöht, nicht zuletzt durch Verbesserungen in der medizinischen Versorgung, der Wohnbedingungen, der Ernährung und allgemeiner Lebensstandards. So steigt sie auch heute noch um drei Monate pro Jahr, beziehungsweise fünf Stunden pro Tag an - ohne dass bisher eine Verlangsamung des Anstiegs beobachtet wurde (Oeppen und Vaupel, 2002). Die menschliche Lebensdauer wird in der heutigen Zeit somit stärker durch intrinsische Seneszenz und die damit verbundenen Krankheiten (u.a. Frailty-Syndrom) begrenzt als der oben beschriebenen extrinsischen Mortalität anderer Organismen.

Die biologischen Grundlagen des Alterns zu entschlüsseln, ist damit eine wissenschaftliche Hauptaufgabe sowie eine große Herausforderung. Bis heute wurde eine nahezu unüberschaubare Vielfalt von molekularen Alterungsprozessen aufgeklärt. So wurde gezeigt, dass altersassoziierte Gewebedysfunktion durch eine Akkumulation von molekulären und zellulären Schäden verursacht wird (Hasty et al., 2003). Mutationen der DNA, die zur genomischen Instabilität führen, können zu einer solchen Funktionsstörung beitragen. Zusätzlich existieren Gene, die für den Zelltod und Zellzyklus verantwortlich sind. Zu ihnen gehören die klassischen Tumorsuppressor- und Onkogene (Campisi, 2003). Das mit Abstand wichtigste und bekannteste Tumorsuppressorgen ist p53. Die in dieser Arbeit betrachteten Polymorphismen liegen in den Genen von p53, MDM2, MDMX und PPP2R2B. Die durch diese Gene kodierten Proteine beeinflussen sich gegenseitig und spielen daher im p53-Pathway eine wichtige Rolle. Dass diese Proteine einen Einfluss auf den Organismus haben, zeigen eine Vielzahl von Tiermodellen

sowie klinische Studien zu malignen Tumoren. Nicht zuletzt macht sich diese Wirkung in einer p53-Keimbahnmutation, dem LI-FRAUMENI-Syndrom, bemerkbar (siehe Kapitel 1.2.2).

Die entscheidende Frage ist nun: wie wirkt sich die tumorsuppressive Wirkung von P53 auf die Alterungsvorgänge des *menschlichen* Organismus aus und haben auch die in dieser Arbeit untersuchten Polymorphismen einen Einfluss auf die Lebenserwartung und das Altern? Bereits an dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass es in der Literatur nur wenige Studien gibt, die den Einfluss der untersuchten Polymorphismen auf das Altern unabhängig von einer eventuellen Krebsmortalität analysierten. Dabei handelt es sich ausschließlich um Arbeiten zum P53 Codon 72-Polymorphismus. Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden zu den anderen betrachteten Polymorphismen keinerlei Studien dieser Art beschrieben.

5.1 P53 und der Codon 72-Polymorphismus

Eine Vielzahl von intrazellulären Stresssignalen bewirkt eine Aktivierung von P53 und damit die Möglichkeit, den Zellzyklusarrest, Seneszenz oder Apoptose einzuleiten. Die Art und Intensität dieser Signale beeinflusst, welche Zellantwort eingeleitet wird (Vogelstein et al., 2000). Mäuse, die kein oder vermindert P53 bilden können ($p53^{-/-}$ oder $p53^{+/-}$), sind sehr anfällig für die Entwicklung von Krebs (Donehower et al., 1992). Interessanterweise lebten allerdings die Mäuse ($p53^{+/-}$), die *keine* Tumoren entwickelten, ungewöhnlich lang (Donehower, 2002). Desweiteren zeigten Mäuse mit mutiertem p53 ($p53^{+/m}$) eine dauerhafte Aktivierung von P53 – und damit eine stark verminderte Krebsinzidenz, aber auch deutlich schneller Zeichen des Alterns, wie Gewichtsverlust und verminderte Zellzahl in Geweben (Tyner et al., 2002). Doch ist es auch möglich, dass einzelne Genpolymorphismen einen Einfluss auf das Altern haben?

Für eine große Zahl an unterschiedlichen Tumoren (siehe Kapitel 1.4.1) wurde bereits nachgewiesen, dass der Codon 72-Polymorphismus von P53 eine Auswirkung auf die Tumorentwicklung eines Organismus hat. Teilweise sind die Ergebnisse zwischen verschiedenen Arbeitsgruppen und Tumorarten aber recht uneinheitlich. Dies könnte letztendlich damit zusammenhängen, dass häufig nur der Polymorphismus und nicht der p53-Mutationsstatus bestimmt wurde. Allerdings konnten VAN HEEMST et al. 2005 durch eine große Metaanalyse von 61 Studienpopulationen zeigen, dass unter Pro/Pro-Trägern das Risiko, Krebs zu entwickeln, signifikant höher war als unter Arg/Arg-Trägern. Die Patienten mit homozygotem Pro-Status

starben signifikant früher in Folge der Tumorerkrankung als Arg-Träger (van Heemst et al., 2005).

Auf der anderen Seite zeigten VAN HEEMST et al. in einer prospektiven Studie mit 1226 Personen über 85 Jahren, dass das Überleben von Pro/Pro-Trägern 1.41-fach gegenüber Arg/Arg-Trägern *erhöht* ist. In dieser Studie konnte auch beobachtet werden, dass während des Follow-ups 29% der Pro/Pro-Träger an Krebs verstarben, während es bei Menschen mit Arg/Arg-Genotyp nur 14% waren. Homozygote Pro-Allel-Träger hatten demnach eine um den Faktor 2.54 erhöhte Krebsmortalität (van Heemst et al., 2005).

Diese Studie ist also *in Teilen* vergleichbar mit den im Rahmen dieser Dissertation gewonnenen Ergebnissen. So konnte hier ebenfalls nachgewiesen werden, dass sich in der sehr alten Studienpopulation ein signifikant längeres Überleben bei Vorhandensein mindestens eines Pro-Allels im Vergleich zum Arg/Arg-Genotyp ($p=0.035$) ergibt. Im Unterschied zur Studie von VAN HEEMST ist dieser Effekt in unserer Studie *geschlechtsabhängig*. Während bei den männlichen alten Studienteilnehmern *kein* Unterschied in der mittleren Überlebenszeit der Personen zu erkennen ist, lebten die weiblichen alten Probanden mit Pro-Allel ca. 11 Monate länger als Arg/Arg-Trägerinnen. Auch im Vergleich zu der jungen weiblichen Kontrollpopulation trat bei den sehr alten Frauen das Pro-Allel häufiger auf (39% vs. 55,2%)($p=0.045$), während sich bei den Männern zwischen Jung und Alt kein Unterschied bemerkbar machte (siehe Kap. 4.1).

Ferner ist der Studie von VAN HEEMST et al. nicht zu entnehmen, ob eine nach Geschlecht getrennte Analyse durchgeführt wurde. Zwar wurde die Cox-Regression nach dem Geschlecht adjustiert, eine eigenständige getrenntgeschlechtliche Analyse fehlt aber. In Unkenntnis der Rohdaten der Studie können genauere Aussagen über intersexuelle Unterschiede der Lebenserwartung in Bezug auf den Genotyp nicht ohne Weiteres gemacht werden.

Darüber hinaus ist bei VAN HEEMST et al. die genaue Zusammensetzung der Studienpopulation nicht mit angegeben. Es ist davon auszugehen, dass die alte Population einen höheren Frauenanteil hat (wie es auch in dieser vorliegenden Arbeit der Fall war), da Frauen im Allgemeinen eine höhere Lebenserwartung haben als Männer. Leider würde dieses Ungleichgewicht unter Umständen das Studienergebnis verfälschen, da die weiblichen Probanden in den Ergebnissen der Studie eine höhere Wertigkeit einnehmen. Auch dieser Umstand macht eine getrenntgeschlechtliche Betrachtung der Ergebnisse notwendig.

Ein weiterer Kritikpunkt an der Studie von VAN HEEMST ist, dass während des Follow-ups maligne Tumorerkrankungen auftraten. Zweifellos ist dies bei einer prospektiven Studie nicht zu umgehen. Die Autoren hätten in der Cox-Regression zumindest nach der Todesursache durch Krebs adjustieren müssen – davon ist dem Paper aber nichts zu entnehmen. Die Todesursache „Krebs“ tritt unter homozygoten Trägern des Pro-Allels signifikant häufiger auf als bei Arg/Arg-Status. Todesursachen wie Infektionen und kardiovaskuläre Erkrankungen unterschieden sich nicht signifikant innerhalb der Gruppen. Trotz der Tatsache, dass Pro/Pro-Träger häufiger an malignen Tumoren sterben, wurde nicht danach adjustiert. So kommt es zu einem Confounding in der Frage, ob das Pro-Allel mit einem längeren Überleben assoziiert ist, weil davon auszugehen ist, dass an Tumoren erkrankte Personen auch früher sterben (Tommiska et al., 2005). Aus diesem Grund wurden durch das Design der vorliegenden Studie (siehe Kapitel 3.1.1) explizit maligne Tumorerkrankungen ausgeschlossen, um einem Confounding zu entgehen. Alles in allem scheinen aber die positiven Effekte auf die Langlebigkeit des Pro/Pro-Genotyps gegenüber den negativen Effekten einer erhöhten Krebsinzidenz und -mortalität zu überwiegen. Dies deckt sich mit dem Modell der „caretaker“ und „gatekeeper“ Genen. Hierbei arbeitet das Arg-Allel, welches proapoptotisch ist, als „gatekeeper“ und schützt den Organismus vor Krebs, aber auf Kosten einer verkürzten Lebenszeit. Das Pro-Allel hingegen ist besser in der Lage einen G1-Arrest einzuleiten und die P53 abhängige DNA-Reparatur zu aktivieren und somit das Altern zu verzögern.

2002 publizierten BONAFÈ et al. eine Studie mit 1086 Italienern. Die Studienpopulation wurde in drei Gruppen (jung, alt, hundertjährige) eingeteilt und die Allelfrequenzen des Codon 72-Polymorphismus untersucht. Zwischen den Gruppen fand sich kein signifikanter Unterschied im Auftreten eines Genotyps (Bonafe et al., 2002). Falls das Pro-Allel einen Überlebensnachteil mit sich bringen sollte, so müsste zumindest die Pro-Allelfrequenz in der Gruppe der jungen Teilnehmer am höchsten sein. Allerdings wurden auch hier beide Geschlechter zusammen untersucht. Auch in unserer Studie ergibt sich unter diesen Umständen kein signifikanter Zusammenhang. Erst bei getrenntgeschlechtlicher Beobachtung wird dieser sichtbar (siehe Kapitel 4.1). Es reicht also offensichtlich nicht, die Population als Ganzes zu betrachten, sondern es muss eine gezielte getrenntgeschlechtliche Untersuchung vorgenommen werden. Die Polymorphismen sind innerhalb der Geschlechter anders verteilt und könnten sich daher geschlechtsspezifisch auch anders auswirken.

In einer erst vor kurzem veröffentlichten Studie von DI PIETRO et al. wurden 1072 Personen im Alter von 18 bis 106 Jahren ebenfalls auf den P53 Codon 72-Status untersucht. Anschließend wurden diese in drei Gruppen aufgeteilt und die Allelfrequenzen miteinander verglichen. Hierbei zeigten sich geschlechtsspezifische Unterschiede mit einem selteneren Auftreten des Pro-Allels in der Gruppe der sehr alten Frauen, während diese Beobachtung bei den Männern nicht gemacht werden konnte (DiPietro et al., 2012). Die unterschiedlichen Allel-Frequenzen, die in verschiedenen Studien beobachtet wurden, könnten das Resultat einer *populationsabhängigen* Balance zwischen einem erhöhten oder erniedrigten Risiko von lebensbedrohlichen Erkrankungen (wie Krebs oder Herz-Kreislauf-Erkrankungen) sein. Des Weiteren ist der Einfluss unterschiedlicher Studiendesigns (von Fall-Kontroll bis prospektiven Follow-Up-Studien) zu beachten. Deshalb müssen beim Interpretieren der vorliegenden Ergebnisse die Vor- und Nachteile jeder verwendeten Methode berücksichtigt werden.

Ein wichtiges Element, welches zu dem beobachteten geschlechtsspezifischen Effekt beiträgt, ist das Hormon Östrogen. So konnte eine starke Verknüpfung zwischen dem Östrogen-Signalweg und P53 beobachtet werden. Dabei interagierten der Östrogenrezeptor- α und P53 miteinander, was zu einer Inhibierung der P53-Funktion in Zellkulturen und Xenograft-Modellen führte (Konduri et al., 2010). Somit ist vorstellbar, dass bei Frauen die Hemmung von P53 stärker sein kann als bei Männern, speziell bei Codon 72-Pro-Allel-Trägern. Dies führt zu einer Abschwächung der apoptotischen Mechanismen. Dieser Zustand könnte mit einem erhöhten Krebsrisiko, Immunseneszenz und Autoimmunität assoziiert sein (Hsu et al., 2005). Dabei ist es erwähnenswert, dass Frauen häufiger an Autoimmunkrankheiten erkranken als Männer (Shoenfeld et al., 2012). Es wird zunehmend deutlich, dass das komplexe p53-Netzwerk sehr sorgfältig balanciert werden muss, um die P53-Funktion korrekt zu regulieren und eine geeignete Zellantwort einzuleiten (Oren et al., 2002).

Alles in allem lässt sich zusammenfassen, dass sich der Codon 72-Polymorphismus offensichtlich auf die Lebensdauer auswirkt. So konnte sowohl in der vorliegenden Studie, als auch in Studien anderer Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass das Pro-Allel mit einem längeren Überleben assoziiert ist. Die Abweichungen der Ergebnisse in verschiedenen Studienpopulationen könnten durch die *pleiotropen* Effekte von p53 und die potentiellen regionalen Unterschiede seiner funktionellen Varianten zustande kommen. Dabei ist auch wichtig zu erwähnen, dass sich die Mortalitätsraten von Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Infektionen *nicht* signifikant zwischen den Allelen unterscheiden. All diese Untersuchungen wurden jedoch an großen Popu-

lationen gemacht – Rückschlüsse auf den Effekt für das einzelne Individuum können dadurch nicht gezogen werden.

5.2 MDM2 und der SNP309

Für eine Vielzahl von unterschiedlichen Tumorarten konnte bereits ein Zusammenhang zwischen dem Genotyp (Vorhandensein eines G-Allels) und einem *früheren* Auftreten des Tumors gezeigt werden, unter anderem beim Kolonkarzinom (Cao et al., 2011) und beim Mammakarzinom (Zhao et al., 2011). Auf der anderen Seite wurde beobachtet, dass sich das Risiko, am Prostatakarzinom zu erkranken, bei G-Status *verminderte* (Sun et al., 2010). Die Ergebnisse sind also auch hier, ähnlich wie beim P53 Codon 72-Polymorphismus, aufgrund unterschiedlichen Studiendesigns, sowie Geschlechts- und Gewebespezifität inkonsistent.

BOND et al. konnten des Weiteren für B-Zell Lymphome und Weichteilsarkome nachweisen, dass das G-Allel des SNP309 mit einem früheren Erkrankungsalter bei Frauen, nicht aber bei Männern assoziiert war – der Effekt also offenkundig geschlechtsabhängig ist (Bond et al., 2006). Zusätzlich konnten BARTEL et al. zeigen, dass der Effekt auch von der Östrogenrezeptor-Expression abhängig ist. So war das G-Allel in Ovarialkarzinomen mit sehr starker ER-Expression mit einem frühen Diagnosealter verbunden, nicht aber bei ER-negativen Ovarialkarzinomen (Bartel et al., 2008). Offensichtlich interagieren also der Östrogen-Signalweg und MDM2 miteinander, und es gibt Hinweise darauf, dass das G-Allel einen intakten Östrogenrezeptor-Signalweg benötigt, um die Tumorentstehung zu beschleunigen. Zusätzlich ist der p53-Pathway mit anderen Signalwegen verbunden, die einen Einfluss auf das Altern haben, wie der IGF-1 und mTOR-Pathway (Levine et al., 2006). Gene in diesen Signalwegen reagieren auf metabolische sowie hormonelle Signale. So können die durch die Polymorphismen hervorgerufenen sehr subtilen Expressionsunterschiede *in vitro* kaum messbar sein, sich aber über einen langen Lebenszeitraum von mehr als 80 Jahren *in vivo* unterschiedlich auswirken. Diese Beobachtungen könnten die deutlichen geschlechtsspezifischen Unterschiede erklären.

In einigen Studien konnte nachgewiesen werden, dass Menschen (vor allem Frauen), die Träger des G-Allels sind, früher in Folge ihrer Tumorerkrankung verstarben als jene mit T/T-Genotyp. Eigene unabhängige Studien, die den Effekt des SNP309 auf das Altern und die Langlebigkeit untersuchen, fehlen aber bis heute. In der hier durchgeführten Studie ergibt

sich eine deutliche Korrelation zwischen dem Genotyp und der Überlebensdauer der sehr alten Menschen. Dieser Effekt ist ebenfalls geschlechtsabhängig. Während bei den alten Männern kein Unterschied erkennbar war, lebten die alten Frauen mit G/G-Genotyp 2,3 Jahre, und heterozygote Frauen 1,2 Jahre länger als T/T-Trägerinnen. Auch der Vergleich der jungen weiblichen Kontrollgruppe mit der alten weiblichen Studienpopulation zeigte in der älteren Gruppe eine signifikant höhere Frequenz des G-Allels – vor allem bei den *besonders* alten Frauen. Ursachen für diese unterschiedlichen Ergebnisse könnten zum einen ein geschlechtsspezifischer Hormonhaushalt (vermehrt Östrogene und Gestagene bei Frauen), zum anderen ein anderer Hormonrezeptorbesatz sein. Generell lässt sich der beobachtete Lebenszeitgewinn dadurch erklären, dass bei Vorhandensein eines G-Allels MDM2 stärker exprimiert wird und es so zu einer verminderten apoptotischen Antwort kommt. Die Konsequenz ist eine geringere Gewebeatrophie und ein langsamerer Verlust der Gewebsregeneration (Seneszenz).

Zusammengefasst scheint also die positive Wirkung des G-Allels auf ein längeres Überleben der negativen *prokanzerogenen* Wirkung bei Frauen zu überwiegen – ähnlich wie beim bereits beschriebenen P53 Polymorphismus. Der fehlende Effekt des G-Allels bei den sehr alten Männern wird durch die Studie von SUN et al. unterstützt, in der ein G/G-Genotyp beim Prostatakarzinom sogar eine protektive Wirkung gegenüber dem T-Allel hat (Sun et al., 2010). Interessanterweise fiel im Rahmen der vorliegenden Arbeit beim Vergleich der *männlichen* jungen und alten Population ebenfalls auf, dass nicht etwa das G-Allel innerhalb der alten Studienpopulation häufiger vertreten war, sondern der T/T-Genotyp (siehe Tabelle 4.3). Somit verhält sich die männliche Population hier ebenso invers wie in Studien von geschlechtsabhängigen Tumoren (Mammakarzinom und Prostatakarzinom).

5.3 MDM4 und der SNP31826

Bereits in mehreren Studien konnte der Einfluss von unterschiedlichen SNPs innerhalb des MDM4-Gens auf die Tumorphathologie nachgewiesen werden. Bei dem in dieser Arbeit untersuchten SNP31826 wurde bereits beobachtet, dass sich in einer Gruppe von Ovarialkarzinom-Patientinnen, welche aus *Familien* mit einer deutlichen Häufung von Mamma- und Ovarialkarzinomen stammten, das Alter bei Diagnosestellung deutlich zwischen den Genotypen unterscheidet. Dabei wurden Frauen, die das T-Allel trugen, im Durchschnitt 4 oder 5 Jahre früher diagnostiziert als C/C-Träger. In einer zweiten Studie mit *sporadischen* invasi-

ven Ovarialkarzinomen konnte ebenfalls beobachtet werden, dass homozygote Trägerinnen des T-Allels deutlich eher diagnostiziert wurden als Patientinnen mit C/C-Genotyp (Atwal et al., 2009). Auch für Brustkrebs konnte dieser Zusammenhang nachgewiesen werden, allerdings nur bei Patienten mit Östrogenrezeptor-negativen Mammakarzinomen (Kulkarni et al., 2009). Auf der anderen Seite wurde durch BÖHNKE et al. nachgewiesen, dass Patientinnen mit Östrogenrezeptor-negativen Ovarialkarzinomen und T-Allel-Status insgesamt ein besseres Überleben zeigten und ein niedrigeres Risiko am Tumor zu versterben hatten als homozygote C-Allel-Träger. Somit ergab sich bei Patientinnen mit T-Allel zwar ein früheres Tumoraufreten, aber insgesamt ein längeres Gesamtüberleben.

MILLER et al. beschrieben den Einfluss von MDM4 auf den Zellzyklus. So kommt es bei einer Überexpression von MDM4 zu einer Hemmung der zellulären Seneszenz. Dadurch könnte eine Tumorzellproliferation begünstigt werden (Miller et al., 2010). Auf der anderen Seite bewirkt genau diese verminderte Seneszenz ein längeres Überleben der Zellen und könnte daher auch mit einer verlängerten Überlebenszeit des gesamten Organismus assoziiert sein. Der SNP31826 scheint also, wie bereits in oben genannten Studien beschrieben, eine funktionelle Auswirkung auf den Zellzyklus zu haben. Diese Beobachtung könnte aber auch indirekt die Folge einer Kopplung mit dem SNP34091 sein und dadurch den Einfluss auf die MDM4-Expression erklären (Wynendaele et al., 2010).

In der hier untersuchten Studienpopulation lässt sich sowohl in der Gruppe der sehr alten Frauen als auch der sehr alten Männer ein gleicher *Trend* zum verlängerten Überleben bei Vorhandensein von mindestens eines C-Allels feststellen, wenngleich keines dieser Ergebnisse statistisch signifikant ist. Diese Beobachtung wird durch die Erkenntnis gestützt, dass das C-Allel in der Gruppe der alten männlichen Studienpopulation häufiger vorkommt als in der Gruppe der jungen männlichen Kontrollpopulation. Die Ergebnisse stehen im Widerspruch zu denen bei an Malignomen erkrankten Patienten, welche mit T-Allel-Status ein besseres Überleben zeigten. Es handelt sich dabei jedoch um tumorpathologische Vorgänge, die grundsätzlich anders ablaufen können als physiologische (Zell-)Alterungsvorgänge. Zusammengefasst scheint der betrachtete Polymorphismus also einen geringen Effekt auf die Regulation des Zellzyklus und somit möglicherweise auch auf das Gesamtüberleben zu haben, wobei das Ergebnis bei einer größeren Studienpopulation möglicherweise deutlicher ausfallen würde.

5.4 MDM4 und der SNP34091

Wie bereits in Kapitel 1.4.4 beschrieben liegt der SNP34091 im 3'-UTR des MDM4-Gens. Je nach Allelbesatz findet sich hier eine Bindungsmöglichkeit für die microRNA hsa-miR-191. So interagiert diese microRNA mit dem C-Allel des Polymorphismus, während das A-Allel nicht beeinflusst wird. In der Tat korrelierte das A-Allel mit einer erhöhten Expression der MDM4 mRNA und Proteinlevel in Ovarialkarzinomen. Außerdem war der A/A-Genotyp deutlich häufiger in high-grade Ovarialkarzinomen vertreten, und die Rezidivrate bei Östrogenrezeptor-negativen Tumoren war deutlich erhöht (Wynendaele et al., 2010).

Bei dem in dieser Arbeit untersuchten Kollektiv zeigte sich insgesamt eine um 7 Monate verlängerte Überlebenszeit bei Vorhandensein von mindestens einem C-Allel. Dieser Effekt war sowohl bei den alten Männern und Frauen sichtbar, wenngleich nicht signifikant. Dieses Ergebnis deckt sich mit der von BÖHNKE et al. gemachten Beobachtung, dass Patienten mit C-Allel-Status und Östrogenrezeptor-negativen Tumoren ein verlängertes Überleben zeigten (Wynendaele et al., 2010). Durch den vermehrten Abbau des MDM4 durch die microRNA bei C-Allel-Status, kann es zu einer verminderten onkogenen Wirkung des MDM4 kommen. Die so verstärkte Tumorsuppression schützt den Organismus vor Krebs und könnte so die Lebensdauer verlängern. Auf der anderen Seite wurde bereits darauf hingewiesen, dass eine erhöhte Tumorsuppression zu Lasten der Langlebigkeit gehen kann.

Obwohl subtile Veränderungen der MDM4 Expression die Aktivität des p53 Signalwegs und damit die Tumorbildung beeinflussen, scheinen andere Mechanismen diese Effekte in Bezug auf das Altern auszugleichen. Alles in allem sind die Ergebnisse somit teilweise widersprüchlich und zudem nicht signifikant, so dass man davon ausgehen kann, dass der hier betrachtete Polymorphismus allenfalls eine untergeordnete Rolle in einer Veränderung der Lebenserwartung und des Alterns spielt.

5.5 PP2A und die regulatorische PPP2R2B-Untereinheit

Die Proteinphosphatase PP2A hat eine Vielzahl von unterschiedlichen Effekten innerhalb der Zelle (Janssens und Goris, 2001). So greift PP2A in den Zellzyklus ein, indem es zum Beispiel das Protein c-Myc dephosphoryliert und damit die onkogenen Ras-Signale antagonisiert

(Mumby, 2007). Außerdem wurde gezeigt, dass die Phosphatase die nukleäre Telomerase von menschlichen Brustkrebszellen hemmt (Li et al., 1997). Als weitere wichtige Funktion wurde nachgewiesen, dass PP2A direkt mit dem p53-Signalweg interagiert, indem es Schlüsselstellen von P53 und MDM2 dephosphoryliert. So konnte beobachtet werden, dass die Dephosphorylierung von P53 an Serin 37 die Antwort von P53 auf DNA-Schäden verändert (Dohoney et al., 2004). Des Weiteren kann PP2A mit Hilfe von Cyclin G einen Komplex mit MDM2 bilden und dieses somit aktivieren (Okamoto et al., 2002).

Innerhalb des PPP2R2B-Gens, welches für eine regulatorische Untereinheit von PP2A kodiert, liegt der rs319217-Polymorphismus. So zeigten VAZQUEZ et al., dass das A-Allel mit einem besseren Ansprechen der Chemotherapie bei Mammakarzinomen assoziiert ist. Außerdem wurde beobachtet, dass die Brustkrebs-Patienten mit G/G-Genotyp 3 Jahre eher diagnostiziert wurden als jene mit A-Allel. Bei Östrogenrezeptor-positiven Tumoren vergrößerte sich dieser Abstand auf 4,4 Jahre (Vazquez et al., 2011). Des Weiteren wurde beobachtet, dass bestimmte Aminosäuren von PP2A in Mammakarzinomen häufiger phosphoryliert waren (Wong et al., 2009). Zusätzlich zeigten SUZUKI und TAKAHASHI, dass ein Verlust der PP2A-Expression in menschlichen Mammakarzinomen zu einer Endozytose von E-Cadherin führt. Dieser Zusammenhang könnte *in vivo* zu einem verstärkten metastatischen Potential von Mammakarzinomen führen (Suzuki und Takahashi, 2006).

Interessanterweise konnte für einen weiteren Polymorphismus, nun im PPP2R5E-Gen, welches für eine andere regulatorische Untereinheit von PP2A kodiert, ebenso nachgewiesen werden, dass sich das Alter bei Diagnosestellung und das Überleben bei Patienten mit Weichteilsarkomen für die genetischen Varianten unterscheidet (Grochola et al., 2009).

Es ist also zu erkennen, dass die Polymorphismen einen wichtigen Beitrag in der individuellen Tumorentwicklung leisten und damit auch einen Einfluss auf das Outcome der Patienten haben. Bisher wurde jedoch *keine* Studie durchgeführt, in der der Zusammenhang der genetischen Polymorphismen von PP2A, speziell des rs319217, und der Lebenserwartung untersucht wurde.

In der hier durchgeführten Studie machte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Geschlechtern bemerkbar. So lebten die alten Männer der Studienpopulation mit mindestens einem *G-Allel* 17 Monate länger als Träger des A/A-Genotyps ($p=0.098$). Beim Vergleich der jungen und alten Männer fiel ebenfalls auf, dass der G/G-Genotyp in der Gruppe der

männlichen alten Menschen signifikant häufiger auftrat als bei den jungen Männern ($p=0.02$). Im Gegensatz dazu stehen die alten Frauen, bei denen der *A/A-Genotyp* signifikant häufiger auftritt als bei den weiblichen Kontrollen ($p=0.011$). Auch starben die alten Frauen mit homozygotem A-Status 13 Monate später als G-Allel-Träger ($p=0.026$).

Diese geschlechtsspezifischen Unterschiede könnten durch den unterschiedlichen Hormonhaushalt erklärbar sein. In der Tat konnte bereits nachgewiesen werden, dass der Östrogenrezeptor- α ($ER\alpha$) direkt mit PP2A interagiert und auf diese Weise dephosphoryliert wird. Somit wird die Transkriptionsaktivität von $ER\alpha$ auf verschiedene Gene moduliert – und das sogar in Abwesenheit von Östrogen (Lu et al., 2003). Des Weiteren konnten KEEN et al. zeigen, dass PP2A die Östrogenrezeptorexpression durch Modulation der ER-mRNA-Stabilität reguliert (Keen et al., 2005). In der von VAZQUEZ et al. untersuchten Mammakarzinomkohorte trat bei einem G/G-Genotyp der Krebs deutlich eher auf (Vazquez et al., 2011), während in unserer Studie die alten Frauen häufiger einen A/A-Genotyp aufwiesen und mit diesem auch länger lebten. Der G/G-Genotyp könnte sich also innerhalb des weiblichen Geschlechts als Überlebensnachteil erwiesen und so in der Gruppe der alten Frauen selektioniert haben. Zusätzlich könnte aber auch ein direkter positiver Einfluss des A-Allels auf den Zellzyklus verantwortlich sein für die bei den Frauen beobachteten Ergebnisse.

Vor allem aber müssen die molekularen Auswirkungen des rs319217 genauer erforscht werden, um so die Effekte auf den Organismus besser erklären zu können. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten deuten darauf hin, dass der rs319217-Polymorphismus sowohl auf Alterungsvorgänge einen Einfluss hat als auch innerhalb der Geschlechter andere Effekte verursacht.

5.6 Betrachtungen zum Studiendesign

5.6.1 Gruppenzusammensetzung

Ein zunächst zu diskutierender Punkt in der hier durchgeführten Studie ist die Zusammensetzung der Studienpopulation. Die Studie besteht insgesamt aus 298 Teilnehmern, zusammengesetzt aus 127 sehr alten Patienten und 171 Kontrollpersonen. In der Gruppe der Frauen befinden sich 101 sehr alte Frauen und 77 junge Referenzteilnehmer. Die Gruppe der Männer setzt sich aus 26 sehr alten Menschen und 94 jungen Kontrollpersonen zusammen.

An den vorliegenden Daten ist zu erkennen, dass die Gruppe der sehr alten Männer mit 26 Personen recht klein für eine aussagekräftige Studie ist. Es könnte so zu Verfälschungen des Ergebnisses kommen. Dem gegenüber steht aber eine recht große Kontrollgruppe von 94 Personen. Falls es wirkliche Unterschiede bezüglich des Genotyps in der männlichen Studiengruppe gibt, sollte auch bei einer geringen Größe von 26 Männern bereits ein Trend erkennbar sein. Dieser kann in weiterführenden Arbeiten durch eine Erweiterung oder eine größer angelegte Studie bestätigt werden.

Die Gruppe der alten Frauen wird aus 101 Personen gebildet und ist damit wesentlich aussagekräftiger als die der Männer. Auf der anderen Seite besteht die weibliche Referenzpopulation nur aus 77 Personen. Die Richtgröße für eine angemessen große Kontrollgruppe beträgt aber das Zweifache der Studienpopulation – in diesem Fall also ca. 200 Personen. In allen durchgeführten Analysen stimmen aber die Einzelergebnisse der alten Frauen (Vergleich der Überlebensdauer mit den Allelen) mit den Ergebnissen des Vergleichs der jungen und alten Frauen (Allelhäufigkeiten) überein. Man kann daher davon ausgehen, dass die Ergebnisse trotz mangelnder Kontrollgruppengröße eine ausreichende Validität besitzen.

Insgesamt entspricht das ungleiche Verhältnis der alten Männer und Frauen (26 zu 101 Personen) in etwa dem der alten deutschen Bevölkerung. Im Jahr 2008 betrug der Anteil an Frauen über 90 Jahren in der Bevölkerung 75,5%. Die Männer machten in dieser Altersgruppe dementsprechend nur einen Anteil von 24,5% aus (Bundesamt, 2010).

5.6.2 Wahl der Kontrollpopulation

Ein weiterer Diskussionspunkt ist die Auswahl einer passenden Kontrollpopulation. In der vorliegenden Studie wird sie durch junge Personen aus dem mitteldeutschen Raum gebildet (siehe Kap. 3.1.1). Da die Frequenz der untersuchten Polymorphismen in Bevölkerungsgruppen regional unterschiedlich sein kann, wurde sich nicht bereits groß angelegter Sequenzierungen anderer Bevölkerungsgruppen (z.B. Kaukasier im HapMap-Projekt) bedient, sondern eine individuelle Kontrollgruppe geschaffen. Diese sollte von den Umweltbedingungen, der medizinischen Versorgung und den Lebensstandards regional bedingt der Studienpopulation gleichen, um auch hier das Risiko von externen Störfaktoren zu minimieren. Leider gibt es keine Informationen zur Lebensweise der alten Studien- und der jungen Kontrollpopulation. So könnte es sein, dass sich die Teilnehmer der Studienpopulation durch eine besonders gesun-

de Lebensweise auszeichnen, während der Anteil an rauchenden und Alkohol konsumierenden Personen in der Kontrollgruppe höher sein kann. Außerdem gibt es natürlicherweise auch in jungen Lebensjahren Todesfälle, so dass bereits bei einem Durchschnittsalter der Kontrollgruppe von 27,7 Jahren eine gewisse Selektion besteht. Darüber hinaus ist nicht klar, ob in der Kontrollgruppe auch Menschen enthalten sind, die irgendwann ein deutlich höheres Lebensalter als die Normalbevölkerung erreichen werden und damit dann Teilnehmern der alten Studienpopulation entsprechen.

Um eine Selektion durch die genannten Lebensumstände und Umweltfaktoren zu minimieren, ist eine Kontrollpopulation mit Individuen im Alter von 0 bis 10 Jahren denkbar. In dieser Lebensphase wird die körperliche Entwicklung noch nicht so maßgeblich durch externe Lebensstil-Faktoren beeinflusst wie es im späteren Lebensalter der Fall ist. Vielmehr liegt hier ein starker *genetischer* Einfluss während der Reifezeit vor, und viele Kinderkrankheiten sind genetisch determiniert. Würde man Kontrollpersonen aus dieser Lebensphase rekrutieren, käme es womöglich zu einer Verzerrung, da diese unter Umständen nicht einmal die Adoleszenz erreichen. Auf der anderen Seite bliebe auch hier unklar, ob in jener sehr jungen Kontrollgruppe Personen enthalten wären, die später deutlich länger als die Normalbevölkerung leben würden.

Auf der anderen Seite ist eine ältere Kontrollgruppe denkbar. Sie könnte sich aus Menschen zusammensetzen, die im Alter von 65 bis 80 Jahren verstorben sind. Man geht dabei davon aus, dass, analog zur eben beschriebenen sehr jungen Kontrollgruppe, der Einfluss von externen Lebensstil-Faktoren ab einem gewissen höheren Alter wieder in den Hintergrund tritt und die Überlebenszeit eher durch genetische Faktoren determiniert ist. Ein Vorteil dieser Kontrollgruppe wäre, dass das Sterbealter bereits bekannt ist. Allerdings muss auch bedacht werden, dass natürlicherweise vor oder während dieses Zeitraums von 65 bis 80 bereits Todesfälle aufgetreten sind und sich somit wiederum eine ungewünscht selektierte Kontrollgruppe ergibt. Ebenfalls ist zu fordern, dass das Sterbealter der Kontrollen nicht zu nah an das erreichte Lebensalter der eigentlichen alten Studienpopulation heranreicht, da somit eventuell vorhandene genetische Unterschiede durch Vermischung beider Gruppen verdeckt werden könnten.

Ein weiterer Aspekt wäre eine aus jungen Menschen bestehende Kontrollgruppe, die bereits in frühen Jahren an den *gleichen Todesursachen* verstorben sind wie die Teilnehmer der

Studienpopulation (um so den Effekt durch ein womöglich besonders langes Leben der Kontrollpersonen zu verkleinern) und die sich in der *Lebensweise nicht* von der alten Studienpopulation *unterscheiden*. Doch diese Argumentation erscheint nur auf den ersten Blick plausibel. Das Durchschnittsalter der jungen Kontrollpopulation beträgt 27,7 Jahre. Die Haupttodesursachen in der alten Studienpopulation waren Herz-Kreislaufkrankungen und Infektionen (siehe Kap. 3.1.1). Betrachtet man die Begleitumstände von jungen Menschen, die im Alter von 20 bis 35 Jahren an oben genannten Todesursachen sterben, so wird man folgendes feststellen:

Führt in Deutschland bereits in so jungen Jahren eine Herz-Kreislaufkrankung zum Tod, muss man zum einen davon ausgehen, dass entweder genetische Begleiterkrankungen, wie Thrombophilien oder Ionenkanalerkrankungen (z.B. Brugada-Syndrom), oder anatomische Anomalien des Gefäßsystems und Herzens vorliegen. Zum anderen können Herz-Kreislaufkrankungen in jungen Jahren durch eine extrem ungesunde Lebensweise, wie eine sehr schlechte Ernährung, wenig Sport, Alkohol, Nikotin und dadurch bedingte Komorbiditäten wie Diabetes mellitus Typ II, provoziert werden. Treten bereits tödliche Infektionserkrankungen in jungen Jahren auf, so handelt es sich meist entweder um angeborene Immundefekte (z.B. CVID) oder um erworbene Immundefekte, wie AIDS, Mangelernährung, iatrogene Immunsuppression oder Immundefekte als Nebenwirkung von Chemotherapeutika. Auch kann vor allem bei osteuropäischen Menschen eine aktive Tuberkulose Ursache für eine Immunschwäche und den Tod in jungen Jahren sein.

Es ist also zu erkennen, dass sich bei der Suche nach jungen Menschen mit den gleichen Todesursachen wie Menschen aus der alten Studienpopulation, erhebliche Unterschiede in den Begleitumständen ergeben würde. So könnte der genetische Background bei jungen Kontrollen ein anderer sein. Auch die Lebensweisen können sich stark unterscheiden (extrem ungesund vs. sehr gesund) und die Komorbiditäten (Diabetes mellitus, HIV, Autoimmunerkrankungen) können viel ausgeprägter sein als bei der alten Studienpopulation. Aus diesem Grund wird der in dieser Arbeit gewählte Studienaufbau bestehend aus einer jungen Kontrollpopulation, die der mitteldeutschen Normalbevölkerung entsprechen soll, sowie der sehr alten Studienpopulation (ebenfalls aus dem mitteldeutschen Raum) als durchaus angemessen eingestuft.

5.6.3 Todesursachen in der Studienpopulation

Ein weiterer möglicher Diskussionspunkt ist die Ursache des Todes bei Menschen der alten Studienpopulation. Durch die *nicht natürliche* Todesart sollte bewusst eine maligne Tumorerkrankung ausgeschlossen werden (siehe Kap 3.1.1). Dies ist in der Tat der Fall. Insgesamt starben die alten Menschen zu 48,8% an einer Herz-Kreislauf-Erkrankung und zu 21,6% an einer Infektion. Dies macht 70,4% aller Todesursachen aus. Des Weiteren entfallen 10,4% auf (Poly)Traumata, 5,6% auf Fettembolien, sowie 3,2% auf Ertrinkungsunfälle. Diese zuletzt genannten *nicht natürlichen* Todesursachen führen zu einem vorzeitigen Lebensende der Individuen. Es ist somit nicht klar, wie alt diese Menschen wirklich geworden wären und ob es dadurch zu einem *confounding* in Bezug auf die Überlebensdauer bei bestimmten Genpolymorphismen kommt.

Diese Überlegung ist jedoch nur zu Beginn plausibel, wenn man bedenkt, dass laut SCHMIDT et al. Altern definiert ist als “die ständige Abnahme der Überlebenswahrscheinlichkeit bewirkt durch intrinsische Prozesse” (Schmidt et al., 2007). Eben jene intrinsische Prozesse sind es, die eine immer weiter fortschreitende Abnahme der funktionellen Residualkapazität aller Organe und somit den Verlust der Homöostasefähigkeit bewirken. Es konnte gezeigt werden, dass sich mit steigendem Alter auch in gesunden Menschen die Herzfunktion verändert. So kommt es zu einer erhöhten linksventrikulären Wanddicke, einem verschlechterten linksventrikulären Auswurf und einer verminderten Herzfrequenz-Reservekapazität (als Antwort auf körperliche Belastungen). Außerdem traten vermehrt veränderte Herzrhythmen, wie supraventrikuläre Tachykardien, auf (Lakatta und Levy, 2003). Dadurch entsteht eine zunehmende Unfähigkeit, sich wechselnden Umweltbedingungen anzupassen. Zu genau diesen Umweltbedingungen gehören auch von außen herbeigeführte Erkrankungen. So ist es sehr wahrscheinlich, dass ein junger Mensch einen Sturz oder Verkehrsunfall besser tolerieren wird als ein sehr alter Mensch. Ebenso könnte sich eine junge Person besser vor dem Ertrinken retten als eine ältere, und auch eine durch einen unfallchirurgischen Eingriff ausgelöste Fettembolie wird diese eher überleben. In Analogie hierzu tolerieren jüngere Menschen eine Infektion oder einen Myokardinfarkt ebenso besser als ältere Menschen. Diese zuletzt genannten inneren Todesursachen würden jedoch niemals aus der Studie ausgeschlossen werden. Es ist somit aus Sicht des Autors ebenfalls gerechtfertigt, Menschen mit eben genannten Todesursachen in die Studie einzuschließen, da dies Folgen des natürlichen Alterungsprozesses sind.

6

Kapitel 6

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden fünf Genpolymorphismen des p53-Pathways untersucht. Dabei ist bekannt, dass jeder dieser SNPs einen Effekt auf das Entstehen und die Prognose von unterschiedlichen Tumoren hat. Interessant ist hierbei nun die Frage, ob sich auch Effekte auf physiologische Vorgänge, wie z.B. das Altern, bemerkbar machen. Dazu wurden die Allelfrequenzen der jungen Kontroll- mit denen der alten Studienpopulation verglichen. Anschließend wurden Überlebenszeitanalysen der sehr alten Menschen in Bezug zum Allelbesatz durchgeführt.

Dabei trat das Pro-Allel des p53-Polymorphismus in der Gruppe der Frauen, die älter als 93 Jahre geworden sind, mit 55,2% signifikant ($p=0.045$) häufiger auf als in der Gruppe der jungen weiblichen Kontrollen (39%). Eine ähnliche Beobachtung konnte auch beim MDM2-SNP309-Polymorphismus gemacht werden. Hier war das G-Allel mit 71,2% signifikant ($p=0.009$) häufiger vertreten als bei den jungen weiblichen Kontrollen (49,3%). Auch überlebten die alten Frauen, die Träger des Pro-Allels waren, durchschnittlich 0,9 Jahre länger als Arg/Arg-Trägerinnen ($p=0.046$). Betrachtet man den MDM2-SNP309, so fallen die Ergebnisse noch eindeutiger aus. Alte Frauen mit T/G-Status lebten im Durchschnitt 1,2 Jahre ($p=0.007$), Frauen mit G/G-Status sogar 2,3 Jahre ($p=0.002$) länger als T/T-Trägerinnen. Interessanterweise konnten bei den männlichen Studienteilnehmern keine vergleichbaren Resultate beobachtet werden. Es liegt somit ein eindeutiger geschlechtsspezifischer Dimorphismus vor, der durch den unterschiedlichen Hormonhaushalt von Männern und Frauen erklärt werden kann.

Auch bei der Analyse des PPP2R2B-Polymorphismus machten sich diese intersexuellen Unterschiede bemerkbar. Während bei den alten Frauen (63,9%) der A/A-Genotyp signifikant häufiger als bei den jungen Frauen (39%) vertreten war, trat bei den alten Männern mit 20% der G/G-Genotyp signifikant häufiger auf als bei den jungen Männern (5,4%). Innerhalb der Gruppe der alten Menschen lebten Frauen mit A/A-Status im Mittel 1,1 Jahre ($p=0.026$) länger als G-Allel-Träger. Die alten Männer hingegen lebten mit A/A-Genotyp 1,4 Jahre kürzer als jene mit mindestens einem G-Allel.

Die beiden Polymorphismen im MDM4-Gen sind hingegen nicht mit Langlebigkeit assoziiert. Erstens sind die Allelverteilungen von beiden SNPs vergleichbar zwischen der jungen Kontroll- und der alten Studienpopulation. Zweitens konnte kein Unterschied beim durchschnittlichen Sterbealter der alten Menschen in Bezug auf die einzelnen Allele beobachtet werden. Somit lässt sich feststellen, dass diese genetischen Varianten zwar einen Einfluss auf die Tumorentstehung haben, nicht jedoch auf das Altern.

Insgesamt konnte im Rahmen dieser Arbeit zum *ersten Mal* nachgewiesen werden, dass die Polymorphismen im MDM2- und PPP2R2B-Gen mit einer geschlechtsspezifischen Langlebigkeit assoziiert sind, während dies in den beiden MDM4-SNPs nicht der Fall ist. Die Beobachtungen zum P53 Codon 72-Polymorphismus unterstützen größtenteils die aktuellen Studienergebnisse, dass Pro-Allel-Träger eine längere Lebenserwartung haben.

Zusammengenommen geben die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen experimentellen Daten Hinweise darauf, dass durch die Polymorphismen hervorgerufene subtile Veränderungen im p53-Pathway einen Effekt auf physiologische Zellvorgänge und als Konsequenz auf das Altern haben. Weitere umfangreiche Untersuchungen werden allerdings notwendig sein, um die genauen molekularen Prozesse zukünftig besser zu verstehen und möglicherweise gezielt medikamentös in dieses Netzwerk eingreifen und damit die Alterungsvorgänge verlangsamen zu können.

7

Kapitel 7

Literaturverzeichnis

- Atwal, G. S., Kirchoff, T., Bond, E. E., Montagna, M., Menin, C., Bertorelle, R., und al. (2009). Altered tumor formation and evolutionary selection of genetic variants in the human mdm4 oncogene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(25):10236–10241.
- Barboza, J. A., Iwakuma, T., Terzian, T., El-Naggar, A. K., und Lozano, G. (2008). Mdm2 and mdm4 loss regulates distinct p53 activities. *Molecular Cancer Research*, 6:947–954.
- Bartel, F., Jung, J., Böhnke, A., Gradhand, E., Zeng, K., Thomssen, C., und 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.
- Böhnke, A. (2010). *Einfluss von Veränderungen im p53-Tumorsuppressorweg auf die Entstehung und Prognose von Ovarialkarzinomen*. PhD thesis, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Bojesen, S. E. und Nordestgaard, B. G. (2008). The common germline arg72pro polymorphism of p53 and increased longevity in humans. *Cell Cycle*, 7:158–163.
- Bonafe, M., Barbi, C., Storci, G., Salvioli, S., Capri, M., Olivieri, F., und al. (2002). What studies on human longevity tell us about the risk for cancer in the oldest old: data and hypotheses on the genetics and immunology of centenarians. *Experimental Gerontology*, 37:1263–1271.
- Bond, G. L., Hirshfield, K. M., Kirchoff, T., Alexe, G., Bond, E. E., Robins, H., und al. (2006). Mdm2 snp309 accelerates tumor formation in a gender-specific and hormone-dependent manner. *Cancer Research*, 66:5104–5110.
- Bond, G. L., Hu, W., Bond, E. E., Robins, H., Lutzker, S. G., Arva, N. C., und al. (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.
- Bond, G. L., Hu, W., und Levine, A. (2005). A single nucleotide polymorphism in the mdm2 gene: From a molecular and cellular explanation to clinical effect. *Cancer Research*, 65:5481–5484.
- Boren, T., Xiong, Y., Hakam, A., Wenham, R., Apte, S., Chan, G., und al. (2009). Micrnas and their target messenger rnas associated with ovarian cancer response to chemotherapy. *Gynecologic Oncology*, 113:249–255.
- Buchman, V., Chumakov, P., Niukina, N., Samarina, O., und Georgiev, G. (1988). A variation in the structure of the protein-coding region of the human p53 gene. *Gene*, 70:245–252.

- Budd, A. und Grummt, I. (1998). p53 represses ribosomal gene transcription. *Oncogene*, 19:1119–1124.
- Bundesamt, S. (2010). *Statistisches Jahrbuch 2010*. Statistisches Bundesamt.
- Bürkle, A. (2000). Poly(adp-ribosyl)ation, genomic instability, and longevity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 908:126–132.
- Campisi, J. (2003). Cancer and ageing: Rival demons? *Nature Reviews Cancer*, 3:339–349.
- Cao, X., Zhang, T., Zhao, Z., und Zhao, T. (2011). Mdm2 snp309 polymorphism and colorectal cancer risk: A meta-analysis. *DNA and Cell Biology*, 31:355–359.
- Chen, K., Song, F., A.Calin, G., Wei, Q., Hao, X., und Zhang, W. (2008). Polymorphisms in microRNA targets: a gold mine for molecular epidemiology. *Carcinogenesis*, 29:1306–1311.
- Crawford, L. V., Pim, D. C., Gurney, E. G., Goodfellow, P., und Taylor-Papadimitriou, J. (1981). Detection of a common feature in several human tumor cell lines—a 53,000-dalton protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78:41–45.
- DeLeo, A. B., Jay, G., Appella, E., Dubois, G. C., Law, L. W., und Old, L. J. (1979). Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76:2420–2424.
- Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., und al. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92:9363–9367.
- Ding, H. und Fisher, D. (1998). Mechanisms of p53-mediated apoptosis. *Critical reviews in oncogenesis*, 9:83–98.
- DiPietro, F., Dato, S., Carpi, F. M., Corneveaux, J. J., Serfaustini, S., und al. (2012). Tp53*p72 allele influences negatively female life expectancy in a population of central italy: Cross-sectional study and genetic-demographic approach analysis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 68:539–545.
- Dohoney, K. M., Guillermin, C., Whiteford, C., Elbi, C., Lambert, P. F., Hager, G. L., und al. (2004). Phosphorylation of p53 at serine 37 is important for transcriptional activity and regulation in response to dna damage. *Oncogene*, 23:49–57.
- Donehower, L., Harvey, M., Slagle, B., McArthur, M., Montgomery, C. J., Butel, J., und Bradley, A. (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature*, 356:215–221.
- Donehower, L. A. (2002). Does p53 affect organismal aging? *Journal of Cellular Physiology*, 192:23–33.

- Dupont, W. D., Breyer, J. P., Bradley, K. M., Schuyler, P. A., Plummer, W. D., Sanders, M. E., Page, D. L., und Smith, J. R. (2010). Protein phosphatase 2a subunit gene haplotypes and proliferative breast disease modify breast cancer risk. *Cancer*, 116:8–19.
- Finlay, C. A., Hinds, P. W., und Levine, A. J. (1989). The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell*, 57:1083–1093.
- Garcia-Cao, I., Garcia-Cao, M., Martin-Caballero, J., M.Criado, L., Klatt, P., M.Flores, J., und al. (2002). ‘super p53’ mice exhibit enhanced dna damage response, are tumor resistant and age normally. *The EMBO Journal*, 21(22):6225–6235.
- Graeber, T., Osmanian, C., Jacks, T., Housman, D., Koch, C., Lowe, S., und Giaccia, A. (1996). Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature*, 379:88–91.
- Green, D. R. und Kroemer, G. (2009). Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature*, 458:1127–1130.
- Grochola, L. F., Vazquez, A., Bond, E. E., Würfl, P., Taubert, H., Müller, T. H., und al. (2009). Recent natural selection identifies a genetic variant in a regulatory subunit of protein phosphatase 2a that associates with altered cancer risk and survival. *Clinical Cancer Research*, 15:6301–6308.
- Hasty, P., Campisi, J., Hoeijmakers, J., van Steeg, H., und Vijg, J. (2003). Aging and genome maintenance: Lessons from the mouse? *Science*, 299:1355–1359.
- Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., und Oren, M. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*, 387:296–299.
- Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., He, T.-C., Zhang, L., Thiagalingam, S., Kinzler, K. W., und Vogelstein, B. (1997). 14-3-3sigma is a p53-regulated inhibitor of g2/m progression. *Molecular Cell*, 1:3–11.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., und Harris, C. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science*, 253:49–53.
- Honda, R., Tanaka, H., und Yasuda, H. (1997). Oncoprotein mdm2 is a ubiquitin ligase e3 for tumor suppressor p53. *FEBS*, 420:25–27.
- Hsu, H.-C., Scott, D. K., und Mountz, J. D. (2005). Impaired apoptosis and immune senescence – cause or effect. *Immunological Reviews*, 205:130–146.
- Jackson, M. W. und Berberich, S. J. (2000). Mdmx protects p53 from mdm2-mediated degradation. *Molecular and Cellular Biology*, 20(3):1001–1007.

- Janssens, V. und Goris, J. (2001). Protein phosphatase 2a: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *The Biochemical Journal*, 353:417–439.
- Jones, S., Roe, A., Donehower, L., und Bradley, A. (1995). Rescue of embryonic lethality in mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature*, 378:206–208.
- Keen, J. C., Zhou, Q., Park, B. H., Pettit, C., Mack, K. M., Blair, B., und al. (2005). Protein phosphatase 2a regulates estrogen receptor alpha (er) expression through modulation of er mRNA stability. *The Journal of Biological Chemistry*, 280:29519–29524.
- Kirkwood, T. (1996). Human senescence. *Bioessays*, 18:1009–1016.
- Kirkwood, T. B. L. und Austad, S. N. (2000). Why do we age? *Nature*, 408:233–238.
- Konduri, S. D., Medisetty, R., Liu, W., Kaiparettu, B. A., Srivastava, P., und al. (2010). Mechanisms of estrogen receptor antagonism toward p53 and its implications in breast cancer therapeutic response and stem cell regulation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107:15081–15086.
- Kulkarni, D. A., Vazquez, A., G.Haffty, B., V.Bandera, E., Hu, W., Y.Sun, Y., und al. (2009). A polymorphic variant in human mdm4 associates with accelerated age of onset of estrogen receptor negative breast cancer. *Carcinogenesis*, 30:1910–1915.
- Lakatta, E. G. und Levy, D. (2003). Arterial and cardiac aging: Major shareholders in cardiovascular disease enterprises. *Circulation*, 107:346–354.
- Lane, D. und Crawford, L. V. (1979). T antigen is bound to a host protein in sv40-transformed cells. *Nature*, 278:261–263.
- Levine, A. J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 88:323–331.
- Levine, A. J., Feng, Z., Mak, T. W., You, H., und Jin, S. (2006). Coordination and communication between the p53 and igf-1-akt-tor signal transduction pathways. *Genes and Development*, 20:267–275.
- Lewis, B. P., Burge, C. B., und Bartel, D. P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 120:15–20.
- Li, C., Chen, L., und Chen, J. (2002). Dna damage induces mdmx nuclear translocation by p53-dependent and -independent mechanisms. *Molecular and Cellular Biology*, 22:7562–7571.
- Li, H., Zhao, L.-L., Funder, J. W., und Liu, J.-P. (1997). Protein phosphatase 2a inhibits nuclear telomerase activity in human breast cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 272:16729–16732.

- Li, R., Waga, S., Hannon, G., Beach, D., und Stillman, B. (1994). Differential effects by the p21 cdk inhibitor on pcna-dependent dna replication and repair. *Nature*, 371:534 – 537.
- Linares, L. K., Hengstermann, A., Ciechanover, A., Müller, S., und Scheffner, M. (2003). Hdmx stimulates hdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(21):12009–12014.
- Linzer, D. I. und Levine, A. J. (1979). Characterization of a 54k dalton cellular sv40 tumor antigen present in sv40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell*, 17:43–52.
- Lowe, S. W., Cepero, E., und Evan, G. (2004). Intrinsic tumour suppression. *Nature*, 432:307–315.
- Lu, Q., Surks, H. K., Ebling, H., Baur, W. E., Brown, D., Pallas, D. C., und Karas, R. H. (2003). Regulation of estrogen receptor alpha-mediated transcription by a direct interaction with protein phosphatase 2a. *The Journal of Biological Chemistry*, 278:4639–4645.
- Malkin, D., Li, F., Strong, L., Fraumeni, J. J., Nelson, C., Kim, D., Kassel, J., Gryka, M., Bischoff, F., und Tainsky, M. (1990). Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science*, 250:1233–1238.
- Matheu, A., Maraver, A., Klatt, P., Flores, I., Garcia-Cao, I., Borras, C., Flores, J. M., Vina, J., Blasco, M. A., und Serrano, M. (2007). Delayed ageing through damage protection by the arf/p53 pathway. *Nature*, 448:375–380.
- Menendez, D., Inga, A., und Resnick, M. A. (2009). The expanding universe of p53 targets. *Nature*, 9:724–737.
- Meng, R. D. und El-Deiry, W. S. (1998). Tumor suppressor gene therapy for cancer: from the bench to the clinic. *Drug Resistance Updates*, 1:205–210.
- Miller, K. R., Kelley, K., Tuttle, R., und Berberich, S. J. (2010). Hdmx overexpression inhibits oncogene induced cellular senescence. *Cell Cycle*, 9:3376–3382.
- Momand, J., Zambetti, G. P., Olson, D., George, D., und Levine, A. J. (1992). The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell*, 69:1237–1245.
- Mumby, M. (2007). Pp2a: Unveiling a reluctant tumor suppressor. *Cell*, 130:21–24.
- Oeppen, J. und Vaupel, J. (2002). Demography. broken limits to life expectancy. *Science*, 296:1029–1031.
- Okamoto, K. und Beach, D. (1994). Cyclin g is a transcriptional target of the p53 tumor suppressor protein. *The EMBO Journal*, 13:4816–4822.

- Okamoto, K., Kamibayashi, C., Serrano, M., Prives, C., Mumby, M., und Beach, D. (1996). p53-dependent association between cyclin g and the b' subunit of protein phosphatase 2a. *Molecular and Cellular Biology*, 16:6593–6602.
- Okamoto, K., Li, H., Jensen, M. R., Zhang, T., Taya, Y., Thorgeirsson, S. S., und Prives, C. (2002). Cyclin g recruits pp2a to dephosphorylate mdm2. *Molecular Cell*, 9:761–771.
- Okamoto, K. und Prives, C. (1999). A role of cyclin g in the process of apoptosis. *Oncogene*, 18:4606–4615.
- Oren, M., Damalas, A., Gottlieb, T., Michael, D., und Taplick, J. (2002). Regulation of p53: intricate loops and delicate balances. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 973:374–383.
- Parant, J., Chavez-Reyes, A., Little, N. A., Yan, W., Reinke, V., Jochemsen, A. G., und Lozano, G. (2001). Rescue of embryonic lethality in mdm4-null mice by loss of trp53 suggests a nonoverlapping pathway with mdm2 to regulate p53. *Nature Genetics*, 29:92–95.
- Pegoraro, R., Rom, L., Lanning, P., Moodley, M., Naiker, S., und Moodley, J. (2002). P53 codon 72 polymorphism and human papillomavirus type in relation to cervical cancer in south african women. *International Journal of Gynecological Cancer*, 12:383–388.
- Phillips, A., Teunisse, A., Lam, S., Lodder, K., Darley, M., und Emaduddin, M. (2010). Hdmx-1 is expressed from a functional p53-responsive promoter in the first intron of the hdmx gene and participates in an autoregulatory feedback loop to control p53 activity. *Journal of Biological Chemistry*, 285:29111–27.
- Pim, D. und Banks, L. (2004). p53 polymorphic variants at codon 72 exert different effects on cell cycle progression. *International Journal of Cancer*, 108:196–199.
- Riemenschneider, M. J., Büschges, R., Wolter, M., Reifenberger, J., Boström, J., Kraus, J. A., und al. (1999). Amplification and overexpression of the mdm4 (mdmx) gene from 1q32 in a subset of malignant gliomas without tp53 mutation or mdm2 amplification. *Cancer Research*, 59:6091–6096.
- Rogler, A., Rogenhofer, M., Borchardt, A., Lunz, J.-C., Knoell, A., Hofstaedter, F., und al. (2011). P53 codon 72 (arg72pro) polymorphism and prostate cancer risk: Association between disease onset and proline genotype. *Pathobiology*, 78:193–200.
- Sakamuro, D., Sabbatini, P., White, E., und Prendergast, G. C. (1997). The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest. *Oncogene*, 15:887–898.
- Schmidt, R. F., Lang, F., und Heckmann, M. (2007). *Physiologie des Menschen*. Springer, 30 edition.

- Sharp, D. A., Kratowicz, S. A., Sank, M. J., and George, D. L. (1999). Stabilization of the mdm2 oncoprotein by interaction with the structurally related mdmx protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 274:38189–38196.
- Shen, H., Solari, A., Wang, X., Zhang, Z., Xu, Y., Wang, L., Hu, X., Guo, J., and Wei, Q. (2004). P53 codon 72 polymorphism and risk of gastric cancer in a chinese population. *Oncology Reports*, 11:1115–1120.
- Shimizu, A., ichi Nishida, J., Ueoka, Y., Kato, K., Hachiya, T., Kuriaki, Y., and Wake, N. (1998). Cyclin g contributes to g2/m arrest of cells in response to dna damage. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 242:529–533.
- Shoenfeld, Y., Tincani, A., and Gershwin, M. (2012). Sex gender and autoimmunity. *Journal of Autoimmunity*, 38:J71–J73.
- Shvarts, A., Steengena, W. T., Riteco, N., van Laar, T., Dekker, P., Bazuine, M., and al. (1996). Mdmx: a novel p53-binding protein with some functional properties of mdm2. *The EMBO Journal*, 15(19):5349–5357.
- Sionov, R. V. und Haupt, Y. (1999). The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene*, 18:6145–6157.
- Sullivan, A., Syed, N., Gasco, M., Bergamaschi, D., Trigiantè, G., Attard, M., Hiller, L., Farrell, P. J., Smith, P., Lu, X., and Crook, T. (2004). Polymorphism in wild-type p53 modulates response to chemotherapy in vitro and in vivo. *Oncogene*, 23:3328–3337.
- Sümbül, A. T., Akkiz, H., Bayram, S., Bekar, A., Akgöllü, E., and Sandikci, M. (2012). p53 codon 72 polymorphism is associated with susceptibility to hepatocellular carcinoma in the turkish population: a case–control study. *Molecular Biology Reports*, 39(2):1639–47.
- Sun, T., Lee, G.-S. M., Oh, W. K., Pomerantz, M., Yang, M., Xie, W., Freedman, M. L., and Kantoff, P. W. (2010). Single-nucleotide polymorphisms in p53 pathway and aggressiveness of prostate cancer in a caucasian population. *Clinical Cancer Research*, 16:5244–5251.
- Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., and al. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, 397:441–446.
- Suzuki, K. und Takahashi, K. (2006). Induction of e-cadherin endocytosis by loss of protein phosphatase 2a expression in human breast cancers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 349:255–260.
- Tagawa, H. und Seto, M. (2005). A microrna cluster as a target of genomic amplification in malignant lymphoma. *Leukemia*, 19:2013–2016.

- Tommiska, J., Eerola, H., Heinonen, M., Salonen, L., Kaare, M., Tallila, J., und al. (2005). Breast cancer patients with p53 pro72 homozygous genotype have a poorer survival. *Human Cancer Biology*, 11:5098–5103.
- Tyner, S. D., Venkatachalam, S., Choi, J., Jones, S., Ghebraniouk, N., Igelmann, H., und al. (2002). p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature*, 415:45–53.
- van Heemst, D., Mooijaart, S. P., Beekman, M., Schreuder, J., de Craen, A. J., Brandt, B. W., Slagboom, P. E., und Westendorp, R. G. (2005). Variation in the human tp53 gene affects old age survival and cancer mortality. *Experimental Gerontology*, 40:11–15.
- Vassilev, L., Vu, B., Graves, B., Carvajal, D., Podlaski, F., Filipovic, Z., Kong, N., Kammlott, U., Lukacs, C., Klein, C., Fotouhi, N., und Liu, E. (2004). In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of mdm2. *Science*, 303:844–848.
- Vazquez, A., Kulkarni, D., Grochola, L. F., Bond, G. L., Barnard, N., Toppmeyer, D., und al. (2011). A genetic variant in a pp2a regulatory subunit encoded by the ppp2r2b gene associates with altered breast cancer risk and recurrence. *Int J Cancer*, 128:2335–43.
- Vogelstein, B., Lane, D., und Levine, A. J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature*, 408:307–310.
- Wang, S., Esplin, E., Li, J., Huang, L., Gazdar, A., Minna, J., und Evans, G. (1998). Alterations of the ppp2r1b gene in human lung and colon cancer. *Science*, 282:284–287.
- Wong, L., Chang, C., Koay, E., und Zhang, D. (2009). Tyrosine phosphorylation of pp2a is regulated by her-2 signalling and correlates with breast cancer progression. *International Journal of Oncology*, 34:1291–1301.
- Wynendaele, J., Böhnke, A., Leucci, E., Nielsen, S. J., Lambertz, I., Hammer, S., und al. (2010). An illegitimate microRNA target site within the 3' utr of mdm4 affects ovarian cancer progression and chemosensitivity. *Cancer Research*, 70:9641–9649.
- Zauberman, A., Flusberg, D., Haupt, Y., Barak, Y., und Oren, M. (1995). A functional p53 responsive intronic promoter is contained within the human mdm2 gene. *Nucleic Acids Research*, 23:2584–2592.
- Zhao, E., Cui, D., Yuan, L., und Lu, W. (2011). Mdm2 snp309 polymorphism and breast cancer risk: a meta-analysis. *Molecular Biology Reports*, 39:3471–7.

1. Jeder einzelne der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Genpolymorphismen des p53-Pathways hat einen Effekt auf das Entstehen und die Prognose von Tumoren. Die Wirkung auf das Altern ist jedoch weniger klar.
2. Das Pro-Allel des p53-Polymorphismus trat in der *alten* weiblichen Studiengruppe signifikant häufiger auf als in der *jungen* weiblichen Kontrollgruppe. Frauen, die Träger des Pro-Allels waren, lebten durchschnittlich 0,9 Jahre länger als Arg/Arg-Trägerinnen.
3. Das G-Allel des MDM2-SNP309-Polymorphismus ist in der *alten* weiblichen Studienpopulation signifikant häufiger vertreten als bei den weiblichen *jungen* Kontrollen. Alte Frauen mit T/G-Status lebten im Durchschnitt 1,2 Jahre, Frauen mit G/G-Status sogar 2,3 Jahre länger als T/T-Trägerinnen.
4. Bei Kombination des p53- und MDM2-Polymorphismus lebten Frauen mit Arg/Pro oder Pro/Pro (P53) und G/G (MDM2) im Mittel 2,7 Jahre länger als die Referenzgruppe (Arg/Arg und T/T).
5. Die beiden Polymorphismen im MDM4-Gen sind hingegen nicht mit Langlebigkeit assoziiert.
6. Bei der Analyse des PPP2R2B-Polymorphismus machten sich ebenfalls intersexuelle Unterschiede bemerkbar. Frauen mit A/A-Status lebten im Mittel 1,1 Jahre *länger* als G-Allel-Träger. Die Männer mit A/A-Genotyp lebten 1,4 Jahre *kürzer* als G-Allel-Träger.
7. Die experimentellen Daten geben Hinweise darauf, dass durch die Polymorphismen hervorgerufene subtile Veränderungen im p53-Pathway einen Effekt auf physiologische Zellvorgänge und als Konsequenz auf das Altern haben können.

Curriculum Vitae

Angaben zur Person

Nachname, Vorname	Groß, Sebastian
Adresse	Advokatenweg 45, 06114 Halle, Deutschland
Geburtsdatum	06.01.1988
Geburtsort	Ilmenau

Berufsbildung

03/2013-07/2013	Praktisches Jahr in Klinik für Innere Medizin am Triemli Spital Zürich
12/2012-03/2013	Praktisches Jahr in Klinik für Chirurgie am Krankenhaus Martha-Maria Dölau-Halle
08/2012-12/2012	Praktisches Jahr in Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin der Universitätsklinik Halle
Seit 2010	Promotion am Institut für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Herbst 2009	erfolgreich bestandener Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Seit 2007	Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther Universität (MLU) in Halle (Saale)
2006-2007	Studium der Bioinformatik an der Friedrich-Schiller Universität Jena

Schulbildung

1998-2006	Gymnasium „Am Lindenberg“ in Ilmenau
1994-1998	Grundschule „Am Stollen“ in Ilmenau

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt entnommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

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

Halle, den 17. März 2014

Sebastian Groß

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir die Realisierung dieser Arbeit ermöglicht haben.

Allen voran danke ich Herrn PD Dr. Frank Bartel für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung aller materiellen Voraussetzungen, sein stetiges Vertrauen in meine Arbeit und die umfangreiche und persönliche Unterstützung bei der Bearbeitung der Aufgabenstellungen.

Ich danke besonders Frau Dr. Anja Böhnke, Frau Stefanie Hammer und Frau Anja Wolf für ihre stetige Betreuung und Unterstützung während der experimentellen Arbeit im Labor. Sie erleichterten mir diese Arbeit durch ihre konstruktiven Hinweise sehr.

Weiterhin möchte ich bei Herrn Berger, Frau Ehrhardt, Frau Rolle, Frau Wiederhold, Frau Wypior und allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Pathologie für das angenehme Arbeitsklima sowie die Unterstützung bei den Versuchsdurchführungen bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Institute für Rechtsmedizin und Immunologie für das Bereitstellen der DNA bedanken, ebenso bei Fr. Dr. Darmer vom Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung für die Durchführung der unzähligen Sequenzierreaktionen.

Ich bedanke mich bei meinen Freunden, die mich stets aufbauten und für die erforderliche Abwechslung sorgten.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, ohne deren ausdauernde und vielseitige Unterstützung die Erstellung dieser Arbeit kaum möglich gewesen wäre.