

**Untersuchungen polymorpher Genloci der  
HLA-Klasse III und deren Assoziation mit dem sporadischen  
Ovarialkarzinom**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

Julia Schaarschmidt

aus Bonn

2014

Angefertigt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Frau Professor Dr. med. Katrin van der Ven
2. Gutachter: Herr Professor Dr. med. Dietrich Klingmüller

Tag der Mündlichen Prüfung: 26. Mai 2014

Aus der Abteilung für Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin

Direktor: Professor Dr. med. Hans van der Ven

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Abkürzungsverzeichnis .....	8
1. Einleitung .....	11
1.1 Das HLA-System des Menschen.....	12
1.1.1 Die MHC-Klasse-I-Moleküle.....	14
1.1.2 Die MHC-Klasse-II-Moleküle.....	15
1.1.3 Bedeutung der MHC-I- und II-Moleküle.....	16
1.1.4 Die MHC-Klasse-III-Moleküle.....	17
1.1.5 Bedeutung des HLA-Systems für die Tumorummunologie.....	17
1.2 Die TNF-„Familie“.....	18
1.2.1 Der Tumornekrosefaktor-alpha .....	19
1.2.2 Polymorphismen von <i>TNF<math>\alpha</math></i> .....	20
1.2.3 Lymphotoxin-alpha und -beta.....	21
1.2.4 Polymorphismen von <i>LT<math>\alpha</math></i> .....	22
1.2.5 Gemeinsamkeiten und Unterschiede von <i>TNF<math>\alpha</math></i> und <i>LT<math>\alpha</math></i> .....	22
1.2.6 Wirkungen von <i>TNF<math>\alpha</math></i> und <i>LT<math>\alpha</math></i> im Organismus und ihre Rolle bei der Entstehung von Krankheiten .....	23
1.2.7 Bedeutung der Polymorphismen von <i>TNF<math>\alpha</math></i> für die Pathogenese verschiedener Krankheiten.....	24

1.2.8 Rolle von <i>TNF<math>\alpha</math></i> und des G>A-Polymorphismus auf Position -308 bei der Krebsentstehung .....	25
1.2.9 Rolle des A>G-Polymorphismus von <i>LT<math>\alpha</math></i> auf Position +252 bei verschiedenen Krankheiten.....	27
1.3 Die Hitzeschockproteine .....	28
1.3.1 Struktur der HSP70-Gene und Proteine.....	29
1.3.2 Polymorphismen von <i>HSP70-2</i> und <i>HSP70-hom</i> .....	30
1.3.3 Rolle der <i>HSP70</i> -Polymorphismen bei der Entstehung von Malignomen .....	30
1.4 RAGE .....	32
1.4.1 Struktur des Gens und Proteins .....	32
1.4.2 Auftreten von <i>RAGE</i> im Organismus und Funktion bei Krankheiten.....	33
1.4.3 <i>RAGE</i> und Krebs .....	35
1.4.4 Polymorphismen von <i>RAGE</i> und ihre Bedeutung .....	37
1.5 Das Ovarialkarzinom .....	39
1.5.1 Epidemiologische Daten .....	39
1.5.2 Pathogenese und Risikofaktoren .....	39
1.5.3 Ätiologie des sporadischen Ovarialkarzinoms.....	40
1.5.4 Ätiologie des hereditären Ovarialkarzinoms.....	41
1.5.5 Klassifikation und klinische Stadieneinteilung .....	43
1.5.6 Prognosefaktoren.....	44
1.5.7 Therapieverfahren.....	45
2. Aufgabenstellung .....	45

3. Patientenkollektiv .....	46
4. Material und Methoden .....	47
4.1 Chemikalien, Enzyme und Geräte .....	47
4.2 DNA-Extraktion aus Vollblut .....	47
4.3 Konzentrationsbestimmung genomischer DNA .....	47
4.4 Die Polymerase-Kettenreaktion .....	48
4.4.1 Der PCR-Ansatz .....	48
4.5 Die Agarose-Gelelektrophorese .....	49
4.6 Typisierung für Tumornekrosefaktor-alpha .....	50
4.6.1 Das Prinzip der allelspezifischen PCR .....	50
4.6.2 Der PCR-Ansatz .....	51
4.6.3 Das PCR-Programm .....	52
4.7 Typisierung für Lymphotoxin-alpha .....	54
4.7.1 Identifizierung des A>G Polymorphismus an Position +252 mittels Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus.....	54
4.7.3 Das PCR-Programm .....	56
4.7.4 Der Restriktionsenzymverdau .....	56
4.8 Typisierung für <i>HSP 70-2</i> und <i>HSP 70-hom</i> .....	58
4.8.1 Identifizierung der Polymorphismen des <i>HSP70-2</i> -Gens und des <i>HSP70-</i> <i>hom</i> -Gens mittels Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen .....	58
4.8.2 Die PCR-Ansätze .....	58
4.8.3 Die PCR-Programme .....	59

4.8.4 Der Restriktionsenzymverdau .....	60
4.9 Typisierung für <i>RAGE</i> .....	63
4.9.1 Identifizierung des T>C Polymorphismus an Position -429 mittels Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus.....	63
4.9.2 Der PCR-Ansatz .....	64
4.9.3 Das PCR-Programm .....	64
4.9.4 Der Restriktionsenzymverdau .....	65
4.10 Statistische Methoden .....	67
5. Ergebnisse .....	67
5.1 Typisierung für <i>TNF<math>\alpha</math></i> .....	67
5.1.1 Allelfrequenzen von <i>TNF<math>\alpha</math></i> .....	67
5.1.2 <i>TNF<math>\alpha</math></i> -Genotypfrequenzen .....	68
5.2 Typisierung für <i>LT<math>\alpha</math></i> .....	69
5.2.1 Allelfrequenzen von <i>LT<math>\alpha</math></i> .....	69
5.2.2 <i>LT<math>\alpha</math></i> -Genotypfrequenzen .....	70
5.3 Typisierung für <i>HSP70-2</i> und <i>HSP70-hom</i> .....	70
5.3.1 <i>HSP70-2</i> -Allelfrequenzen.....	70
5.3.2 <i>HSP70-2</i> -Genotypfrequenzen.....	71
5.3.4 <i>HSP70-hom</i> -Genotypfrequenzen.....	72
5.4 Typisierung für <i>RAGE</i> .....	73
5.4.1 <i>RAGE</i> -Allelfrequenzen.....	73
5.4.2 <i>RAGE</i> -Genotypfrequenzen .....	74

6. Diskussion.....	75
6.1 Assoziation des Ovarialkarzinoms mit dem -308 <i>TNF<math>\alpha</math></i> -Polymorphismus .....	75
6.2 Assoziation des Ovarialkarzinoms mit dem -252 <i>LT<math>\alpha</math></i> -Polymorphismus .....	77
6.3. Assoziation des Ovarialkarzinoms mit dem 1267 <i>HSP70-2</i> - und dem 2437 <i>HSP70-hom</i> -Polymorphismus .....	77
6.4. Assoziation des Ovarialkarzinoms mit dem -429 RAGE-Polymorphismus .....	78
6.5. Ausblick .....	79
7. Zusammenfassung.....	80
8. Abbildungsverzeichnis .....	82
9. Tabellenverzeichnis .....	84
10. Literaturverzeichnis .....	86
11. Danksagung.....	112

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AGEs	advanced glycosylation end products of proteins
Aqua dest.	Aqua destillata
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.
bp	Basenpaare
BRCA	breast cancer susceptibility gene
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
dsDNA	Doppelstrang-Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
EGFR	epidermal growth factor receptor
esRAGE	endogenous secretory receptor for advanced glycosylation end products of proteins

et al.	et aliud
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
g	Gramm
G	Guanin
HLA	Human Leukocyte Antigen
HNPCC	Hereditäres non-polypöses kolorektales Karzinom
HSP	Hitzeschockprotein
kB	Kilobasenpaare
kDA	Kilodalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
L	Liter
LT $\alpha$	Lymphotoxin alpha
LT $\beta$	Lymphotoxin beta
MHC	major histocompatibility complex
$\mu$	Mikro ( $10^{-6}$ )
m	Milli ( $10^{-3}$ )
M	molar
min	Minute
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
n	Nano ( $10^{-9}$ )
NaCl	Natriumchlorid
NF- $\kappa$ B	nukleärer Transkriptionsfaktor kappa B

NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
p	pico ( $10^{-12}$ )
PBR	Peptid-bindende Region
PCR	Polymerasekettenreaktion
RAGE	receptor for advanced glycosylation end products of proteins
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
rpm	rounds per minute
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
sRAGE	soluble receptor for advanced glycosylation end products of proteins
Syn.	Synonym
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
TNF $\beta$	Tumornekrosefaktor beta
TNM	Klassifikation zur Stadieneinteilung von malignen Tumoren: Tumor, Nodus, Metastasen)
U	unit

## 1. Einleitung

Wie entsteht Malignität und wodurch wird die Vermehrung und Ausbreitung maligner Tumorzellen gefördert?

Die Antwort auf diese Frage ist sehr komplex und kann wohl nicht in einem Satz beantwortet werden. Festhalten lässt sich aber, dass der Transformation einer gesunden zu einer entarteten Zelle letztlich Mutationen im Erbgut der Zelle zu Grunde liegen, welche durch verschiedenste äußere und innere Faktoren hervorgerufen und beeinflusst werden können. Diese Mutationen betreffen in besonderem Maße solche Loci, die Informationen für Tumorsuppressorgene und (Proto-)Onkogene enthalten, aber auch Genorte für Antigene, die für die Immunität der Zelle wichtig sind. Die meisten Gene, die für diese Oberflächeneigenschaften von Zellen kodieren, finden sich im Bereich des Haupthistokompatibilitätskomplexes (Major Histocompatibility Complex, MHC). Ohne diese Antigene wäre eine Unterscheidung zwischen „fremd“ und „körpereigen“ unmöglich.

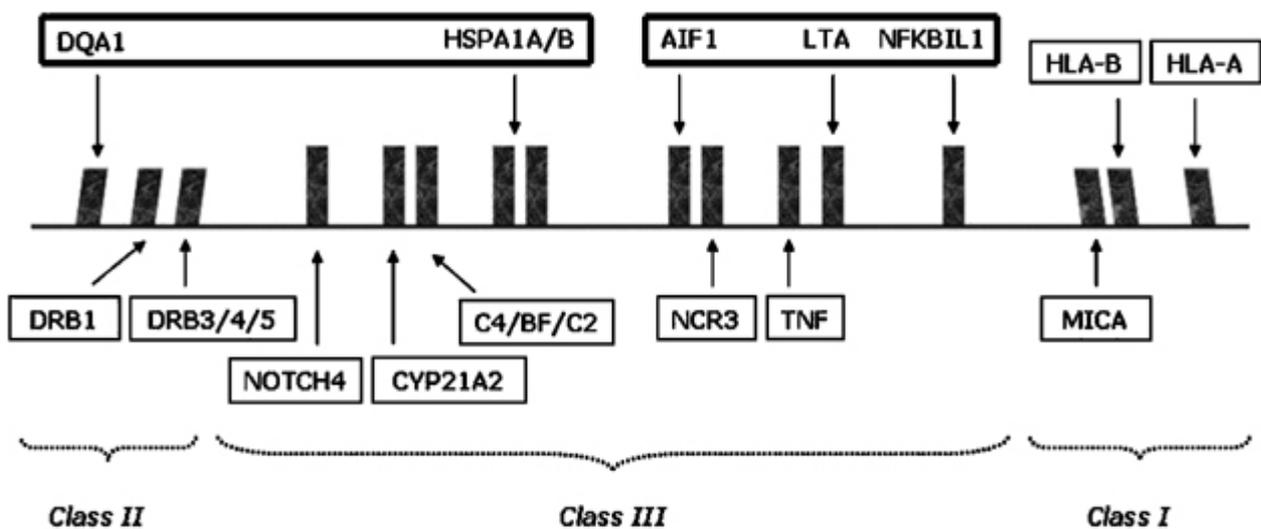
Was passiert nun aber, wenn Tumoren in der Lage sind, die Expression dieser Oberflächeneigenschaften auf ihren Zellen zu verändern? Zahlreiche Studien untersuchten den Zusammenhang zwischen verschiedenen Ausprägungen der Moleküle des MHC und dem Auftreten von Krebserkrankungen. Auf einige wichtige von ihnen wird im weiteren Verlauf näher eingegangen.

Das eigentliche Augenmerk dieser Arbeit liegt auf einer heterogenen Gruppe von Molekülen des MHC, bei denen man vermutet, dass entweder sie selbst die Entstehung eines malignen Tumors beeinflussen könnten oder aber andere Gene, die sich in enger chromosomaler Nachbarschaft zu ihnen befinden. Es wird der Frage nachgegangen, inwieweit bestimmte Polymorphismen im Bereich der jeweiligen Genloci einen Risikofaktor für die Entwicklung eines Ovarialkarzinoms darstellen oder als Marker für ein erhöhtes Risiko dienen können.

## 1.1 Das HLA-System des Menschen

Der menschliche Haupthistokompatibilitätskomplex ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 (6p23.1-3) lokalisiert und erstreckt sich über eine Länge von etwa drei bis vier Megabasenpaaren (Carroll et al., 1987; Dunham et al., 1987). Er enthält mehr als 200 Gene, die zum Teil sehr unterschiedliche, bisweilen auch bisher unbekannte Funktionen im menschlichen Körper ausüben. Entdeckt wurde er im Jahre 1936, als Peter A. Gorer herausfand, dass Transplantate problemlos zwischen verschiedenen, genetisch nahezu identischen Mäusen eines Stammes übertragen werden können, es jedoch bei der Transplantation auf nicht-erbgleiche Individuen zu einer Abstoßungsreaktion binnen weniger Tage kommt (Gorer, 1936). Entscheidend für dieses Geschehen sind Antigene auf den Oberflächen der Zellen, welche beim Menschen auch als „Human Leukocyte Antigenes“ (HLA) bezeichnet werden, da sie auf der Oberfläche von Leukozyten leicht nachweisbar sind. Dausset definierte 1958 das erste HLA-Molekül, welches er als Mac-2 bezeichnete (Dausset, 1958). Dieses ist heute unter dem Namen HLA-A2 bekannt. Insgesamt wurden bis dato mehr als 40 Gene identifiziert, die für solche HLA-Moleküle kodieren (Klein und Sato, 2000).

Man unterscheidet drei MHC-Klassen: Die von den Genen der HLA-Klassen I und II kodierten Moleküle sind heterodimere Glykoproteine der Zelloberfläche, die eine große Bedeutung haben für die Immunregulation und die Interaktion zwischen T-Lymphozyten und deren Zielzellen (Davis und Bjorkman, 1988). Auf Grund ihrer Struktur werden sie zur Superfamilie der Immunglobuline gezählt. Zudem gibt es eine dritte Gruppe, in welcher sehr unterschiedliche Gene zusammengefasst werden, die teilweise eine Rolle für den Ablauf von Immunreaktionen spielen, von denen manche aber gänzlich andere, zum Teil noch unbekannte Funktionen im Organismus besitzen. Die Anordnung der einzelnen MHC-Klassen und ihrer Genloci veranschaulicht die folgende Abbildung:



**Abb. 1:** Konservierte extended haplotypes des menschlichen Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) auf Chromosom 6. Man erkennt in Klasse III den Locus *HSPA1*, in dem sich die Gene von *HSP70-2* und *HSP70-hom* befinden, sowie die Loci von *LTα* und *TNFα*. Alle Loci befinden sich in unmittelbarer Nachbarschaft (Dorak et al., 2006)

Das HLA-System ist hoch polymorph, d.h. für die meisten Genorte existieren zahlreiche genetische Varianten und jedes Individuum exprimiert gleichzeitig mehrere dieser Allele (Bjorkman et al., 1987; Robinson et al., 2003). Meist liegen den Varianten Veränderungen einzelner Basen, sogenannte Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs), zu Grunde. Eine bestimmte Kombination von Allelen wird als sogenannter Haplotyp (Ceppellini, 1967) von jedem Elternteil im Gesamten an die Nachkommen vererbt, wobei es sich um einen ko-dominanten Erbgang handelt (Dawkins et al., 1983). Darüber hinaus liegen nicht nur Allele einzelner Genloci gekoppelt vor, auch bestimmte Haplotypen, die sich über eine Länge von mehreren Megabasenpaaren, d.h. über ganze Chromosomenabschnitte, erstrecken können, treten gehäuft gemeinsam auf. Man bezeichnet diese fixe Kombination von Allelen aller Loci des MHC auch als extended haplotypes (Price et al., 1999). Ein Beispiel dafür ist der 8.1 Ancestral Haployp, ein Chromosomenabschnitt mit hoch konservierten Haplotypen und einer Ausdehnung über zwei Megabasenpaare (Aissani et al., 2009). Er beinhaltet unter anderem die Allele *HLA-A1*, *B8*, *Cw7*, *DQB1\*0201* (*DQ2*), *DRB1\*0301* (*DR3*), *DQA1\*0501*, *TNF2*, *C4A\*Q0*, *RAGE -429C* sowie *HSP70-2 -1267 G* und findet sich bei einem Großteil der kaukasischen Bevölkerung mit dem HLA-Merkmal *B8* (Candore et al., 2002; Caruso et

al., 2000; Laki et al., 2007; Price et al., 1999). Individuen mit diesem Haplotyp zeigen ein verändertes Zytokinprofil mit einer vermehrten Produktion von TNF $\alpha$ , einem erhöhten Autoantikörperspiegel und verstärkt zirkulierenden Immunkomplexen im Serum (Laki et al., 2006). Für zahlreiche Erkrankungen wie AIDS, Insulin abhängiger Diabetes mellitus, Systemischer Lupus Erythematoses oder auch Myasthenia gravis konnte ein Zusammenhang mit diesem Haplotyp und einem höheren Erkrankungsrisiko sowie einem schlechteren Verlauf hergestellt werden (Dawkins et al., 1983; Price et al., 1999). Gleiches gilt für diverse Krebserkrankungen. Dies wird weiter unten näher ausgeführt.

Die Tatsache, dass eine bestimmte Kombination von Allelen gekoppelt vererbt wird, muss man bedenken, wenn man für verschiedene Erkrankungen Assoziationen mit *einzelnen* Loci untersuchen möchte. Es kann die Antwort auf die Frage erschweren, ob nun dieser eine Locus oder vielleicht ein mit ihm gekoppelter letztlich die Pathogenese beeinflusst.

### 1.1.1 Die MHC-Klasse-I-Moleküle

Am telomerischen Ende von 6p befindet sich die MHC-Klasse I-Region, welche mindestens 18 Gene enthält, die in enger Verbindung zueinander stehen. Insbesondere liegen hier die Genorte für die klassischen Transplantationsantigene *HLA-A*, *HLA-B* und *HLA-C* (Strachan, 1987). Diese sind Glykoproteine der Zelloberfläche und werden auf nahezu allen kernhaltigen Zellen des menschlichen Körpers exprimiert. Ausgenommen sind Erythrozyten und Trophoblastzellen (Milford, 2004). Ebenfalls der MHC-Klasse I zugehörig sind die Genloci *HLA-E*, *HLA-F* und *HLA-G*, deren Funktion noch nicht bekannt ist. Ihre Genprodukte werden als nicht-klassische MHC-I-Moleküle bezeichnet. Die MHC-I-Moleküle sind Heterodimere bestehend aus zwei Teilen: Die schwere  $\alpha$ -Kette setzt sich aus fünf Domänen zusammen.  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  formen durch  $\alpha$ -Helix- und antiparallele  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen eine Mulde, in welcher Peptide gebunden werden können (Bjorkman et al., 1987). Die  $\alpha 3$ -Domäne ist Immunglobulin-ähnlich und der Bereich, an welchem die T-Lymphozyten mit ihrem CD8-Rezeptor binden können. Desweiteren findet sich eine hydrophobe Domäne, die die Zellmembran durchspannt, und eine fünfte, die das im Zytosol gelegene Ende bildet (Klein und Sato, 2000).

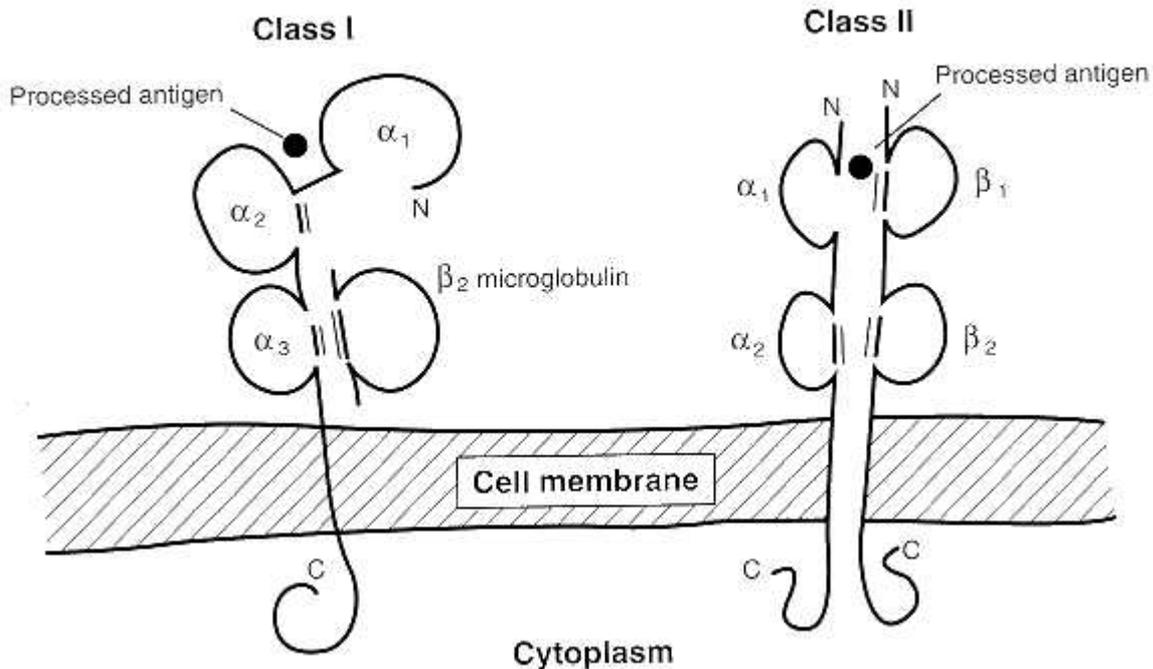
Die  $\alpha$ -Kette liegt in nicht-kovalenter Bindung mit einer leichten, nicht-polymorphen  $\beta$ -Kette vor. Diese wird, auch als  $\beta_2$ -Mikroglobulin bezeichnet, nicht von einem Gen innerhalb des MHC, sondern von einem Locus auf Chromosom 15 kodiert (Bjorkman et al., 1987). Eine Abbildung der Struktur findet sich auf Seite 18 (Abb. 2). MHC-I-Moleküle haben eine entscheidende Bedeutung für die Abtötung infizierter oder entarteter Zellen durch zytotoxische CD8+ T-Lymphozyten sowie für den Schutz gesunder Zellen vor einer solchen Zerstörung (Horton et al., 2004). Dies geschieht dadurch, dass intrazellulär prozessierte Peptide über den HLA-I-Proteinkomplex den Killerzellen präsentiert werden. Diese erkennen, ob es sich um körpereigene oder körperfremde Peptide, wie zum Beispiel Viruspeptide, handelt (Trowsdale, 1993).

### 1.1.2 Die MHC-Klasse-II-Moleküle

Am zentromerischen Ende des MHC ist die Klasse II mit dem Genbereich *HLA-D* lokalisiert. Dieser gliedert sich wiederum in die 4 Unterregionen *DP*, *DQ*, *DR* und *DZ/DO*, von denen besonders die ersten drei gut untersucht sind (Trowsdale, 1987). Die Genprodukte der "klassischen" HLA-Klasse II-Gene *HLA-DR*, *HLA-DQ* und *HLA-DP* bestehen aus zwei nicht-kovalent assoziierten, membranverankerten Polypeptidketten, einer schweren  $\alpha$ - und einer leichten  $\beta$ -Kette (Springer et al., 1977). Diese werden wiederum in vier Domänen unterteilt: Zwei Domänen ( $\alpha 1$  und  $\beta 1$ ) formen die Peptidbindende Region (PBR), die zwei anderen Domänen ( $\alpha 2$  und  $\beta 2$ ) ähneln der konstanten schweren Kette von Immunglobulinen und liegen nahe der Zellmembran (Brown et al., 1993; Roucard et al., 1996). MHC-II-Moleküle sind auf antigenpräsentierenden Zellen wie peripheren B-Lymphozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen oder aktivierten Lymphozyten nachweisbar. Sie sind, wie jene der Klasse I, wichtig für die Antigenpräsentation, allerdings dienen sie der Präsentation extrazellulärer, per Endozytose oder Phagozytose aufgenommener Peptide. Diese werden von CD4+ T-Helfer-Zellen erkannt, woraufhin es zu einer Stimulation von B-Lymphozyten und somit zur Bildung von spezifischen Antikörpern kommt.

Durch den anfangs erwähnten Polymorphismus des HLA-Systems ist es dem Organismus möglich, auf eine Vielzahl verschiedener Pathogene zu reagieren. So gibt es beispielsweise allein für den *HLA-DR $\beta$* -Locus mehr als 100 verschiedene Allele. Da

der Mensch in der Regel heterozygot für diese Loci ist und die Genprodukte der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Domänen miteinander kombiniert werden können, erhöht sich das Spektrum der MHC-Moleküle eines Individuums nochmals. Die folgende Abbildung veranschaulicht noch einmal die Struktur der MHC-Moleküle der Klassen I und II:



**Abb. 2:** Schematische Struktur der Klasse-I- und II-Moleküle des menschlichen Haupt-Histokompatibilitätskomplexes (Goldman, 1996), erkennbar sind die neben des im Zytoplasma gelegenen Abschnitts der die Zellmembran durchspannende Bereich sowie extrazellulär die Antigen-bindende Region

### 1.1.3 Bedeutung der MHC-I- und II-Moleküle

Wie gezeigt werden konnte, beinhaltet der MHC zahlreiche Gene für Peptide wie die Transplantationsantigene oder für bestimmte Oberflächenrezeptoren, die die Interaktionen zwischen den verschiedenen Zellen des Immunsystems wie Lymphozyten, Makrophagen und Antigen-präsentierenden Zellen vermitteln. Er ist somit in entscheidender Weise an der Erkennung und Unterscheidung von „Selbst“ und „Nicht-Selbst“ beteiligt. Die Typisierung eines Individuums für seine jeweiligen HLA-Merkmale spielt folglich für die Transplantations- und Transfusionsmedizin eine große Rolle. Hier ist insbesondere auch die Knochenmark- und Stammzellspende zu nennen. Ist der

Mechanismus der Diskrimination zwischen eigenen und fremden Antigenen defekt, so kann dies fatale Konsequenzen für den Organismus haben.

Inzwischen wurde für verschiedenste Erkrankungen infektiöser, autoimmuner und auch maligner Genese ein Zusammenhang mit dem Immunsystem und insbesondere mit der Ausprägung bestimmter HLA-Haplotypen untersucht. Hier sollen exemplarisch nur zwei von ihnen genannt werden. Besonders gut erforscht und schon seit über dreißig Jahren bekannt ist beispielsweise der Zusammenhang zwischen der Expression von *HLA-B27*, welches der HLA-Klasse-I zugehörig ist, und der Entwicklung einer Spondylitis ankylosans (Syn. Morbus Bechterew). Bis zu 96 % der Betroffenen sind positiv für *HLA-B27* (Brewerton et al., 1973; Khan et al., 2007; McMichael und Bowness, 2002). Auch zwischen dem HLA-Merkmal *DR4* und der Rheumatoiden Arthritis konnte in vielen Studien eine Assoziation beobachtet werden (Kapitany et al., 2005; Ness und Cottreau, 1999; Roudier, 2000).

#### 1.1.4 Die MHC-Klasse-III-Moleküle

Zwischen Klasse I und II liegt eine weitere Gruppe heterologer Gene, welche als MHC-Klasse III zusammengefasst werden. Diese erstreckt sich über eine Länge von 1000 kb (Dunham et al., 1987) und enthält neben den Komplementfaktoren C2, Faktor B und C4A und B (Carroll et al., 1984) und der mikrosomalen Cytochrom P-450-abhängigen Steroid-21-Hydroxylase (Carroll et al., 1985) auch Gene für Zytokine wie den Tumornekrosefaktor-alpha und -beta, für die Hitzeschockproteine der *HSP70*-Familie und auch für den „receptor for advanced glycosylation end products of proteins“ (abgekürzt RAGE) (Carroll et al., 1987; Dunham et al., 1987; Sargent et al., 1989).

Auf die genannten Genloci, ihre Polymorphismen sowie die Struktur der jeweiligen Genprodukte wird im Folgenden näher eingegangen und ein Zusammenhang zu dem Auftreten des sporadischen Ovarialkarzinoms untersucht.

#### 1.1.5 Bedeutung des HLA-Systems für die Tumorummunologie

Interessanterweise konnten in experimentell und spontan entstandenen Tumoren ein Selektionsvorteil für solche Varianten gezeigt werden, denen die MHC-I-Moleküle fehlen. Der Grund hierfür liegt an der Tatsache, dass auf den Oberflächen von Tumor-

zellen dadurch keine antigenen Peptide mehr präsentiert werden können und sie so der Lyse durch zytotoxische T-Zellen entgehen können (Hicklin et al., 1999).

Unabhängig von solchen strukturell bedingten Beeinträchtigungen in der Tumorzellvernichtung finden sich bei malignen Erkrankungen auch auffällig oft bestimmte MHC-Haplotypen, deren Einfluss auf das Tumorgeschehen nicht so einfach hergeleitet werden kann. Es besteht die Vermutung, dass es eine Kopplung von Genen, die den Zellzyklus und die Tumorentstehung beeinflussen, mit den Genen des MHC geben könnte. Allele des bereits erwähnten 8.1 Ancestral Haplotype fanden sich signifikant häufiger bei Patienten mit einem kolorektalen Karzinom als bei einem hinsichtlich Geschlecht und Alter entsprechenden Kontrollkollektiv (Toth et al., 2007). Kübler et al. konnten einen Zusammenhang zwischen einem Haplotyp der MHC-Klasse-II (*DRB1\*0301-DQA1\*0501-DQB1\*0201*) und einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines Ovarialkarzinoms zeigen (Kubler et al., 2008). Für das Mammakarzinom konnten bestimmte Allele der Klasse II (HLA *DQB\*03032* und HLA *DRB1\*11*) mit einem geringeren Risiko, andere (HLA *DRB 1\*12*) mit einem höheren Risiko zu erkranken assoziiert werden (Chaudhuri et al., 2000; Ghaderi et al., 2001). Auch genetische Veränderungen in der MHC-Klasse-III wurden bezogen auf ihren Einfluss auf maligne Erkrankungen untersucht. Ergebnisse dieser Studien sind in den Abschnitten zu den einzelnen Genloci aufgeführt.

## 1.2 Die TNF-„Familie“

Die Gene der TNF-Familie sind im Bereich des Major Histocompatibility Complex (MHC) auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 lokalisiert und werden zur HLA-Klasse III gerechnet (Spies et al., 1986). Sie liegen telomerisch zu den Genen der HLA-Klasse II und zentromerisch zur HLA-Klasse I. Zur TNF-Familie gehören die Gene für den Tumornekrosefaktor-alpha, zu Beginn auf Grund seiner Fieber- und Kachexie-induzierenden Eigenschaft auch Cachektin genannt, für Lymphotoxin-alpha (früher *TNFβ*) und Lymphotoxin-beta (Browning et al., 1993) sowie das Gen für das leucocyte specific transcript-1 (*LST-1*), welches das menschliche Äquivalent zum B144-Transkript der Maus darstellt (Holzinger et al., 1995). Auf Struktur und Funktion von *TNFα* und *LTα* soll im Weiteren näher eingegangen werden.

### 1.2.1 Der Tumornekrosefaktor-alpha

Der Tumornekrosefaktor-alpha (*TNF $\alpha$* ) spielt als Zytokin eine wichtige Rolle bei systemischen Entzündungen und der Aktivierung von Akute-Phase-Reaktionen. Ursprünglich wurde *TNF $\alpha$*  auf Grund der Tatsache entdeckt, dass es bei Individuen mit einer bakteriellen Infektion, insbesondere bei einer mit gramnegativen Keimen, zu einer Nekrotisierung von Tumoren kam. Dieser Effekt konnte nicht dem Endotoxin selbst, also dem Lipopolysaccharid der Bakterien, sondern einem anderen, hitzelabilen Protein zugeschrieben werden. Bestätigt wurde dies in einem Versuch, in dessen Verlauf im Serum von Mäusen, die mit *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) behandelt worden waren, ebenfalls ein Tumoren-nekrotisierender Faktor nachgewiesen werden konnte (Carswell et al., 1975; Old, 1985). Dieser wurde, seiner Funktion zufolge, als „Tumornekrosefaktor“ bezeichnet. Kawakami und Cerami konnten 1981 nachweisen, dass dieses Protein von Makrophagen gebildet wird, nachdem sie mit Lipopolysaccharid stimuliert wurden (Kawakami und Cerami, 1981).

Das menschliche Gen für *TNF* wurde zum ersten Mal im Jahre 1985 sequenziert (Marmenout et al., 1985; Shirai et al., 1985). Es befindet sich im Bereich des Chromosomenabschnittes 6p21.3 (Nedwin et al., 1985). Mit einer Länge von etwa drei Kilobasenpaaren enthält das Gen vier Exons sowie drei Introns, wobei das vierte Exon für 80-89 % des fertigen Proteins kodiert (Vilcek und Lee, 1991). *TNF $\alpha$*  wird v.a. von Makrophagen und/oder Monozyten als Reaktion auf Verletzungen verschiedenster Zellen zunächst als Prohormon synthetisiert und freigesetzt, wobei aber auch andere Zellen wie Lymphozyten, Mastzellen, Endothelzellen, Herzmuskelzellen, Fibroblasten und neuronales Gewebe zu seiner Bildung befähigt sind (Beutler und Cerami, 1989). Das Molekül besitzt neben einem hydrophilen Anteil auch eine hydrophobe N-terminale Domäne, mit der es als klassisches Typ-II-Membranprotein in der Zellmembran verankert ist. Es ähnelt damit anderen Produkten aktivierter Makrophagen wie z.B. dem Interleukin-1 (Nedwin et al., 1985). Nach proteolytischer Abspaltung von 76 Aminosäuren am intrazellulären N-terminalen Ende durch die Metalloprotease *TNF-alpha converting enzyme* (TACE) (Black et al., 1997) besteht das Molekül in seiner endgültigen Form aus 157 Aminosäuren und ist aufgebaut aus drei identischen, nicht-glykosilierten Untereinheiten, die über nicht-kovalente Bindungen das

fertige Zytokin, ein Homotrimer, bilden. Jedes der drei Monomere hat ein Molekulargewicht von ca. 17 kDa und weist größtenteils eine  $\beta$ -Faltblatt-Struktur auf (Beutler und Cerami, 1989). Wie Kriegler et al. 1988 zeigten, kann nicht nur das freigesetzte Molekül an Rezeptoren binden, sondern auch die membrangebundene Form auf Monozyten und/oder Makrophagen scheint in der Lage zu sein, *TNF*-empfindliche Tumorzellen zu lysieren (Kriegler et al., 1988). Dies wurde 1990 von Perez et al. bestätigt, die zeigten, dass eine nicht-sezernierbare Mutante des *TNF $\alpha$*  ebenfalls befähigt ist, das Absterben von Tumor- oder virusinfizierten Zellen herbeizuführen (Perez et al., 1990).

### 1.2.2 Polymorphismen von *TNF $\alpha$*

Mehrere Polymorphismen des *TNF $\alpha$* -Gens wurden bislang entdeckt und liegen in der Mehrzahl der Fälle im Bereich der Promotorregion. D'Alfonso und Richiardi fanden auf Position -238 einen Basenaustausch von Guanin gegen Adenin (D'Alfonso und Richiardi, 1994), Wilson und Mitarbeiter konnten eine gleiche Mutation an Position -308 des *TNF $\alpha$* -Promotors nachweisen (Wilson et al., 1992), welche in dieser Arbeit näher untersucht werden soll. Sie benannten das häufigere Wildtyp-Allel mit der Base Guanin als *TNF1* und das seltenere Allel mit der Base Adenin als *TNF2*. Insgesamt sind 60 bis 70 % der weißen Bevölkerung homozygot für das *TNF1*-Allel, 30 bis 40 % heterozygot und nur 1,5 bis 3 % homozygot für das *TNF2*-Allel (Demeter et al., 1997; Wihlborg et al., 1999).

Durch Veränderung einer Base im Bereich der Promotorregion, auch Einzelbasenpolymorphismus (engl. single nucleotide polymorphism, SNP) genannt, kann die Promotoraktivität und so auch die Transkriptions- und Translationsaktivität beeinflusst und verändert werden. Interessanterweise konnten Wilson et al. 1993 zeigen, dass das *TNF2*-Allel Teil des *extended MHC haplotype HLA-A1-B8-DR3-DQ2* ist (Wilson et al., 1993), welcher wiederum mit einer erhöhten *TNF $\alpha$* -Produktion einhergeht (Abraham et al., 1993; Jacob et al., 1990). Dies geschieht auf Grund der Tatsache, dass das *TNF2*-Allel ein wesentlich potenterer Transkriptionsaktivator ist als das Wildtyp-Allel (Wilson et al., 1993).

Insgesamt führen die *DR3*- und *DR4*-Haplotypen zu einer erhöhten *TNF $\alpha$* -Produktion (Abraham et al., 1993; Jacob et al., 1990), während der *DR2*-Haplotyp zusammen mit

verminderten *TNF $\alpha$* -Spiegeln auftritt (Bendtsen et al., 1988; Jacob et al., 1990). Auf Grund des starken Kopplungsungleichgewichts im Bereich des MHC bleibt die Frage, ob die Assoziation bestimmter Haplotypen mit verschiedenen *TNF $\alpha$* -Phänotypen auf einem Polymorphismus im Bereich des *TNF $\alpha$* -Gens beruht, oder ob es sich vielmehr um ein anderes, in der Nähe lokalisiertes Gen handelt, das die *TNF $\alpha$* -Expression reguliert (Wilson et al., 1997).

### 1.2.3 Lymphotoxin-alpha und -beta

Das Gen für *LT $\alpha$*  befindet sich, wie oben beschrieben, ebenfalls auf Chromosom sechs und liegt nur 1100 Basenpaare entfernt vom kodierenden Bereich für *TNF $\alpha$*  (Nedospasov et al., 1985). Es ist sehr ähnlich aufgebaut, weist ebenfalls vier Exons mit drei dazwischen liegenden Introns auf und ist mit einer Gesamtlänge von 3 Kilobasenpaaren auch gleich lang. Das fertige *LT $\alpha$*  ist ein glykosiliertes Protein, bestehend aus 171 Aminosäuren, und ist wie *TNF $\alpha$*  aus drei gleichen Monomeren mit einem Molekulargewicht von jeweils 25 kDa aufgebaut (Nedwin et al., 1985). Anders als bei *TNF $\alpha$*  wird die Bildung von *LT $\alpha$*  in zytotoxischen T-Lymphozyten durch die MHC-abhängige Präsentation eines Antigens oder einen mitogenen Stimulus induziert (Paul und Ruddle, 1988) und es entfaltet seine Wirkung nur in sezernierter Form. Es ähnelt dabei anderen, von T-Zellen synthetisierten Lymphokinen wie z.B. dem Interferon-gamma (Gray et al., 1982). Passend dazu besitzt es eine kurze und sehr hydrophobe Signalsequenz mit einer Länge von 34 Aminosäuren (Gray et al., 1984; Nedwin et al., 1985).

1993 beschrieben Browning et al. ein 33 kDa Glykoprotein, welches als Typ II-Transmembranprotein einen Komplex mit *LT $\alpha$*  auf der Oberfläche von Lymphozyten bildet. Auf Grund der starken räumlichen Nähe zu den Genloci der anderen Moleküle der TNF-Genfamilie (das Gen liegt zwischen dem für *TNF $\alpha$*  und *B144*) und seinem gemeinsamen Auftreten mit *LT $\alpha$*  nannten sie es Lymphotoxin-beta. Sie mutmaßten, dass dieser *LT $\alpha$* -*LT $\beta$* -Komplex über Zell-Zell-Kontakte eine entscheidende Rolle in der Regulation des Immunsystems innehaben könnte (Browning et al., 1993). So fanden dann auch Crowe et al. 1994 einen für *LT $\beta$* -spezifischen Rezeptor, was bedeuten könnte, dass zellgebundenes, im Komplex mit *LT $\beta$*  vorliegendes *LT $\alpha$*  andere Funktionen

haben könnte als das gelöste (Crowe et al., 1994). Darüber hinaus beschrieben Fu und Chaplin 1999, dass Mäuse, die auf Grund eines genetischen Defektes kein *LTβ* oder keinen *LTβ*-Rezeptor aufweisen, keine sekundären lymphatischen Organe wie Lymphknoten oder die Peyerschen Plaques ausbilden (Fu und Chaplin, 1999). Dies veranschaulicht die Bedeutung des *LTβ* im Komplex mit *LTα*.

#### 1.2.4 Polymorphismen von *LTα*

Der in dieser Arbeit untersuchte Polymorphismus von *LTα* befindet sich im ersten Intron des Gens auf Position +252 und besteht in einem Austausch der Base Adenin gegen Guanin. Dies hat zur Folge, dass eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *NcoI* entsteht, was man auch als Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) bezeichnet. Es war die Arbeitsgruppe um Messer, die diesen *NcoI*-Polymorphismus zum ersten Mal im Bereich des *LTα*-Gens lokalisieren konnte; vorher war man der Meinung gewesen, er befinde sich in der kodierenden Region von *TNFα* (Messer et al., 1991). Das durch diese Mutation entstehende Allel *LTα* (5.5 kB) führt im Gegensatz zum ungeschnittenen Allel *LTα* (10.5 kB) zu einer höheren Produktion von *LTα*. Wie auch das *TNF2*-Allel konnte für *LTα* (5.5 kb) eine enge Assoziation mit dem HLAA1, -B8, -DR3- Haplotypen gezeigt werden (Fugger et al., 1989). In der weißen Bevölkerung sind 40 bis 45 % homozygot für das Wildtyp-Allel *LTα* (10.5 kB), 40 bis 45 % sind heterozygot und nur 15 % sind homozygot für das veränderte Allel *LTα* (5.5 kB) (Stanulla et al., 2001).

#### 1.2.5 Gemeinsamkeiten und Unterschiede von *TNFα* und *LTα*

*TNFα* und *LTα* sind in etwa 30 % ihrer Aminosäuresequenz identisch (Pennica et al., 1984). Interessanterweise stimmen insbesondere die jeweils letzten Exons beider Gene, die, wie schon oben beschrieben, für mehr als 80 % des fertigen Proteins kodieren, in 56 % ihrer Struktur überein (Nedospasov et al., 1986). Dies legt die Vermutung nahe, dass das letzte Exon beider Gene durch Duplikation aus einem gemeinsamen Vorläufergen entstanden ist und dass die an dieser Stelle konservierten Aminosäuren eine entscheidende Rolle für die gemeinsame zytotoxische Wirkung haben könnten (Nedwin et al., 1985; Vilcek und Lee, 1991). Zudem entfalten beide Moleküle ihre

Wirkung über die gleichen Oberflächenrezeptoren (Aggarwal et al., 1985). Somit ist es nicht verwunderlich, dass sie sehr ähnliche Funktionen im Körper ausüben.

### 1.2.6 Wirkungen von *TNF $\alpha$* und *LT $\alpha$* im Organismus und ihre Rolle bei der Entstehung von Krankheiten

*TNF $\alpha$*  wirkt über zwei Rezeptoren: Der TNF-R1 befindet sich auf den meisten Zellen und kann sowohl von der membrangebundenen als auch von der gelösten Form des *TNF $\alpha$*  aktiviert werden. Über diesen Rezeptor erfolgt der Großteil der TNF-Wirkung. Im Gegensatz dazu wird der TNF-R2 nur auf den Zellen des Immunsystems exprimiert und spricht auch nur auf die membrangebundene Form an, seine Rolle ist noch nicht genau bekannt. Bindet *TNF $\alpha$*  an den Rezeptor, so wird über verschiedene Signaltransduktionswege letztlich der nukleäre Transkriptionsfaktor *NF- $\kappa$ B* aktiviert, was zu Zellaktivierung und -differenzierung, Zytokinproduktion und Hemmung des programmierten Zelltodes führt (Chen und Goeddel, 2002; Wajant et al., 2003). Andere Stimuli für die Initiierung des *NF- $\kappa$ B* sind darüber hinaus auch Schädigungen der Zelloberfläche, zum Beispiel durch das Eindringen von Viren oder Bakterien. Über den TNF-R1 kann durch *TNF $\alpha$*  alternativ auch eine Induktion der Apoptose eingeleitet werden, was aber im Vergleich zu seiner Rolle im Entzündungsprozess eine untergeordnete Rolle spielt und meist von der anti-apoptotischen Wirkung des *NF- $\kappa$ B* überlagert wird (Gaur und Aggarwal, 2003).

Beide, *TNF $\alpha$*  und *LT $\alpha$* , können in vitro die Lyse von Tumorzellen bewirken und haben antiproliferative Wirkungen auf Tumorzelllinien (Nedwin et al., 1985). Zusammen mit Interferon-alpha bzw. -gamma zeigt *TNF $\alpha$*  eine synergistische Zytotoxizität (Spriggs et al., 1988). Darüber hinaus wirken beide Zytokine als wichtige Stimulatoren der Immunabwehr: Bei Mäusen, die einen Mangel an *TNF $\alpha$*  oder *LT $\alpha$ / $\beta$*  aufwiesen, fand man in der Milz eine gestörte Follikelarchitektur der B-Zellen sowie fehlorganisierte T-Zonen (Ngo et al., 1999). *TNF $\alpha$*  ist darüber hinaus entscheidend an der Entstehung eines septischen Schocks beteiligt: Er wirkt auf Endothelzellen und führt hier zu einer vermehrten prokoagulatorischen bei gleichzeitig verminderter Protein-C-Aktivität (Nawroth und Stern, 1986), stimuliert Makrophagen zur Produktion von Interleukin-1 und Prostaglandin E2 sowie Neutrophile zur Phagozytose (Klebanoff et al., 1986; Shalaby et al., 1985;

Tsujimoto et al., 1986). Auch induziert er über seine Wirkung auf den Hypothalamus Fieber und hemmt den Appetit.

Für  $LT\alpha$  konnte nachgewiesen werden, dass es, von virusspezifischen T-Zellen produziert, in hohem Maße an der Abwehr von Virusinfektionen beteiligt zu sein scheint (Ruddle et al., 1983) und Virus-infizierte Zellen mit höherer Effizienz lysiert als normale Zellen (Aderka et al., 1985). Darüber hinaus spielt es auch bei der Abwehr parasitärer Infektionen eine wichtige Rolle: Malaria-infizierte Erythrozyten induzieren die  $LT\alpha$ -Produktion (Ruddle et al., 1983) und  $LT\alpha$  ist in der Lage, über eine Aktivierung von Makrophagen die Zerstörung der Schistosomula von *Schistosoma mansoni* zu bewirken (Esparza et al., 1987). Verschiedene Autoren stellten für diverse Krankheiten einen Zusammenhang mit einer Produktion von  $LT\alpha$  fest, wie z.B. beim Myokardinfarkt (Mirrakhimov et al., 1984) oder bei der rheumatoiden Arthritis (Burmester et al., 1981), wobei es im Einzelfall schwer fällt zu unterscheiden, ob nun  $TNF\alpha$  oder  $LT\alpha$  ursächlich beteiligt ist. Auch im Rahmen von HIV und AIDS scheint  $LT\alpha$  von Bedeutung zu sein: Es wird von HIV-infizierten Blutleukozyten produziert (Ratner et al., 1987) und könnte so zu deren Zerstörung beitragen (Ruddle, 1986). Pujol-Borrell et al. konnten zudem zeigen, dass die  $LT\alpha$ - und  $INF\gamma$ -induzierte Expression von Genen der MHC-Klasse II auf der Oberfläche von  $\beta$ -Zellen der Langerhansinseln im Pankreas eine Abtötung derselben zu Folge haben kann, was zur Ausbildung eines Diabetes mellitus führt (Pujol-Borrell et al., 1987).

### 1.2.7 Bedeutung der Polymorphismen von $TNF\alpha$ für die Pathogenese verschiedener Krankheiten

Auf Grund seiner vielfältigen Wirkungen im Organismus und der genetischen Lokalisation inmitten der HLA-Klasse-III-Region liegt es nahe anzunehmen, dass Polymorphismen in diesem Bereich mit autoimmunen und infektiösen Erkrankungen, wie beispielsweise der rheumatoiden Arthritis (Di Giovine et al., 1988; Mulcahy et al., 1996) oder Malaria (Kwiatkowski et al., 1990), assoziiert sein könnten, indem sie sich, wie oben beschrieben, auf das Ausmaß der  $TNF\alpha$ -Produktion auswirken (Jacob, 1992). So scheint das  $TNF2$ -Allel mit einem schlechteren Outcome bei zerebraler Malaria (McGuire et al., 1994) und der Leishmaniose (Cabrera et al., 1995) in Verbindung zu

stehen. Sharma et al. fanden eine Korrelation von beiden oben erwähnten *TNF $\alpha$* -Polymorphismen, -238 und -308, mit der Entwicklung einer Sarkoidose (Sharma et al., 2008). Im Rahmen des Systemischen Lupus Erythematodes (SLE) konnte eine erhöhte Produktion von *TNF $\alpha$*  mit der Prädisposition zur Entwicklung einer Nephritis assoziiert werden (Jacob et al., 1990). Auch bei Patienten mit Asthma, welches in der Mehrzahl der Fälle auf einem allergischen Geschehen beruht, konnte das *TNF2*-Allel mit einem höheren Erkrankungsrisiko in Verbindung gebracht werden (Kumar et al., 2008; Moffatt und Cookson, 1997). Passend dazu konnte der homozygote *TNF2*-Genotyp auch bei Patienten mit irritativer Kontaktdermatitis vermehrt detektiert werden und könnte so vielleicht in Zukunft einen nicht-atopischen genetischen Marker für ein Screening darstellen (Allen et al., 2000). Bei der chronisch-entzündlichen Darmerkrankung Morbus Crohn scheinen erhöhte Spiegel von *TNF $\alpha$*  eine ganz entscheidende Rolle zu spielen, was man sich in der Therapie seit Jahren zu Nutze macht. 1993 veröffentlichten Derkx und Mitarbeiter den Fall einer jungen Patientin, die schwer an M. Crohn erkrankt war. Unter der Behandlung mit Antikörpern gegen *TNF $\alpha$*  kam es zu einer Remission (Derkx et al., 1993). Heute ist diese Therapieform anerkannt bei Kortikosteroid-resistenten Schüben der Erkrankung und man erzielt damit hohe Erfolgsraten von näherungsweise 80 % (Herold, 2010).

### 1.2.8 Rolle von *TNF $\alpha$* und des G>A-Polymorphismus auf Position -308 bei der Krebsentstehung

Yan et al. fassen in ihrer Veröffentlichung von 2006 zusammen, wie *TNF $\alpha$*  die Entstehung eines Entzündungs-assoziierten Malignoms begünstigt. Dies kann, soweit bisher bekannt, auf drei Wegen geschehen:

1. Durch Aktivierung des *NF- $\kappa$ B* (s. oben) wird der Zelltod von präkanzerösen oder bereits transformierten Zellen verhindert (Luo et al., 2004).
2. *TNF $\alpha$*  fördert die Tumorentstehung über einen Proteinkinase C- und Aktivatorprotein-1 abhängigen Signalpfad (Arnott et al., 2002).
3. *TNF $\alpha$*  wirkt als Mutagen ähnlich wie ionisierende Strahlung und führt durch Bildung reaktiver Sauerstoffspezies zu Schädigungen der DNA (Yan et al., 2006)

Gleichzeitig konnte durch die Verabreichung von Antioxidantien wie Vitamin E eine Reduktion der durch *TNF-alpha* induzierten genetischen Veränderungen erreicht werden.

Passend dazu konnten bei Krebspatienten in mehreren Studien auffällig hohe *TNF $\alpha$* -Spiegel festgestellt werden. So fanden Gadducci und Mitarbeiter beispielsweise bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom erhöhte präoperative Serumspiegel für *TNF $\alpha$*  und lösliche *TNF*-Rezeptoren, was die Frage nach einem vermehrten Auftreten des *TNF2*-Allels, verbunden mit einer erhöhten *TNF $\alpha$* -Produktion, nahelegt (Gadducci et al., 1995). Partanen et al. konnten bei Patienten mit Asbest-assoziiertem Lungenkrebs ebenfalls erhöhte Werte für *TNF $\alpha$*  messen (Partanen et al., 1995).

Diese Ergebnisse führten dazu, dass zunehmend das Auftreten des -308-Polymorphismus bei Malignomen im Hinblick auf eine fragliche Häufung des *TNF2*-Allels untersucht wurde. Dies ergab zum Teil Widersprüchliches: Während Patienten mit Prostatakrebs in mehreren Studien auffällig oft homozygot für *TNF2* oder zumindest heterozygot waren (Oh et al., 2000; Saenz-Lopez et al., 2008), wurden bei Brustkrebs-Patientinnen uneinheitliche Ergebnisse erzielt. Einige Autoren konnten eine Verbindung zwischen dem *TNF2*-Allel und der Erkrankung feststellen (Chouchane et al., 1997; Mestiri et al., 2001; Vidovic, 2008), andere fanden jedoch keine nennenswerte Korrelation (Azmy et al., 2004; de Jong et al., 2003). Chouchane et al. untersuchten den -308-Polymorphismus neben dem Mammakarzinom auch bei Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphomen und anderen Tumoren und fanden dort ebenfalls eine signifikante Häufung des *TNF2*-Allels (Chouchane et al., 1997). Als negativen prognostischen Faktor bei kindlichem Burkitt-Lymphom und akuter lymphoblastischer B-Zell-Leukämie bewerteten auch Seidemann et al. das Auftreten des *TNF $\alpha$* -Polymorphismus; so zeigten Patienten mit dem *High-Producer Haplotype*, gekennzeichnet durch Homozygotie für das Allel *TNF2*, deutlich öfter eine Tumorprogression und starben häufiger vor Beginn der Chemotherapie an ihrer Krankheit (Seidemann et al., 2005).

Für das Zervixkarzinom konnten Stanczuk et al. keine statistische Häufung des *TNF2*-homozygoten Genotyps feststellen (Stanczuk et al., 2003), wohingegen Duarte et al. ein deutlich höheres Krebsrisiko mit dem Auftreten des *High-Producer Haplotype*s

assoziierten (Duarte et al., 2005). Auch für das Endometriumkarzinom konnte diese positive Assoziation beobachtet werden (Sasaki et al., 2000).

Für das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom untersuchten Shih et al. neben dem G>A-Polymorphismus auf Position -308 auch den auf Position -238 und fanden einen die Krebsentstehung und Tumorprogression begünstigenden Effekt für das A-Allel auf Position -308 (= *TNF2*), während das A-Allel des anderen Polymorphismus auf -238 eine protektive Wirkung zu haben schien (Shih et al., 2006).

### 1.2.9 Rolle des A>G-Polymorphismus von *LTα* auf Position +252 bei verschiedenen Krankheiten

Interessanterweise steht neben dem *TNF2*-Allel auch das *High Producer Allele LTα* (5.5 kB) mit dem *extended MHC haplotype HLA-A1-B8-DR3-DQ2* in Verbindung und beide treten auffällig oft gemeinsam auf. Gleiches konnte für das *TNF1*-Allel und das Allel *LTα* (10.5 kB) beobachtet werden. Aus diesem Grund kann man beide zusammen auch als Haplotypen statt als einzelne Allele im Hinblick auf ihren Einfluss bei verschiedenen Krankheiten betrachten. So definierten Warzocha et al. einen *low-risk haplotype* mit den vorherrschenden Allelen *TNF1* und *LTα* (10.5 kB) und geringer *TNFα*- und/oder *LTα*-Produktion sowie einen *high-risk haplotype*, bei dem mindestens zwei der high producer-Allele von *TNF2* und/oder *LTα* (5.5 kB) vorhanden sind. Dabei stellten sie fest, dass bei Patienten mit einem malignen Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) das Auftreten mindestens zweier Allele mit hoher Produktion einen unabhängigen Risikofaktor für das Versagen der Ersttherapie, für ein kürzeres Überleben ohne Tumorprogression und auch für das Gesamtüberleben darstellt, was sie zu der Annahme brachte, dass die Fähigkeit, die Zytokinproduktion zu regulieren, anlagebedingt unterschiedlich ist und die Entstehung sowie den Verlauf verschiedener Erkrankungen beeinflussen kann (Warzocha et al., 1998). Dies könnte mit an dem Umstand liegen, dass es bei Individuen mit einer erhöhten Produktion von *TNFα* und *LTα* zu einer chronischen Aktivierung des Immunsystems kommt, was zu Hypalbuminämie, Anämie, Kachexie und schlechtem Allgemeinzustand führt (Tracey et al., 1988). Dies wiederum hat eine schlechtere Therapieverträglichkeit, bis hin zum Nichtansprechen auf eine Chemotherapie

(Kobayashi et al., 1997), sowie eine geringere Resistenz gegen die Krankheit zur Folge und erklärt so das schlechtere Outcome solcher Patienten.

Wie Warzocha et al. konnten auch andere Autoren einen negativen Einfluss einer hohen  $LT\alpha$ -Produktion auf den Verlauf von Non-Hodgkin-Lymphomen feststellen, so beispielsweise Cordingley et al. und auch Seidemann und Mitarbeiter (Cordingley et al., 1988; Seidemann et al., 2005). Auch für andere Krankheiten konnten ein ähnlicher Zusammenhang hergestellt werden, insbesondere bei autoimmunen Krankheiten wie dem Morbus Crohn, der inflammatory bowel disease sowie bei der Rheumatoiden Arthritis (Koss et al., 2000; Mulcahy et al., 1996; Wilson et al., 1995).

**Zusammenfassend lassen sich zwei wichtige Punkte festhalten:**

1.  $TNF\alpha$  und  $LT\alpha$  sind in entscheidendem Maße an der Entstehung und dem Voranschreiten infektiöser, autoimmuner und auch maligner Erkrankungen beteiligt und ähneln sich stark in ihrer Funktion im menschlichen Organismus.
2. Sie treten in ihrem jeweiligen Genotyp nicht unabhängig voneinander auf, sondern zeigen vermehrt die Existenz verschiedener Haplotypen, die eng mit anderen ausgedehnten HLA-Haplotypen gekoppelt sind.

### **1.3 Die Hitzeschockproteine**

Hitzeschockproteine kommen ubiquitär sowohl bei Pro- als auch bei Eukaryonten vor und spielen eine wichtige Rolle beim Transport von Proteinen zwischen den verschiedenen Zellkompartimenten, bei ihrer korrekten Faltung und der Erhaltung ihrer Sekundärstruktur unter extremen Bedingungen. Sie werden vermehrt unter starker thermischer Belastung oder auch bei Anwesenheit toxischer Agenzien wie Schwermetallen und bei ultravioletter Strahlung gebildet, um die Zelle vor diesen Einflüssen zu schützen (Lindquist, 1986).

Entdeckt wurde die sogenannte Hitzeschockreaktion in den 1960er Jahren von Ritossa, als man die verstärkte Transkription eines bis dahin unbekanntes Proteins in Larven von *Drosophila*-Fliegen beobachtete, nachdem diese mit starker Hitze konfrontiert worden waren (Ritossa, 1962). Seitdem wurden verschiedene Hitzeschockproteine identifiziert, die sich anhand ihres Molekulargewichtes in fünf verschiedene Untergruppen einteilen

lassen: *HSP100* (100-110 kDa), *HSP90* (75-96 kDa), *HSP70* (66-78 kDa), *HSP60*, *HSP40* und kleine *HSPs* (8.5-40 kDa) (Dzaman-Serafin et al., 2005; Kazmierczuk und Kilianska, 2009). Die mit am besten untersuchte Gruppe umfasst die Proteine der *HSP70*-Familie. Diese sind die wahrscheinlich höchstkonservierten Proteine in der Evolution; zwischen verschiedenen Eukaryonten findet sich eine Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen von bis zu 78 %, zwischen dem menschlichen *HSP70* und dem von *E. coli* immerhin von 47 % (Hunt und Morimoto, 1985).

### 1.3.1 Struktur der *HSP70*-Gene und Proteine

Für *HSP70* existieren im menschlichen Genom multiple autosomale Genloci. Diese konnten anhand von Zellhybrid-Analysen und über mittels Southern Blotting detektierte Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen auf den Chromosomen 1 (Leung et al., 1990; Voellmy et al., 1985), 5 (Fathallah et al., 1993), 6 (Goate et al., 1987; Harrison et al., 1987; Sargent et al., 1989), 9 (Hendershot et al., 1994), 11 (Tavaria et al., 1995), 14 (Bonnycastle et al., 1994; Roux et al., 1994) und 21 (Harrison et al., 1987) lokalisiert werden. Soweit bislang bekannt gehören acht verschiedene Genprodukte mit einem Molekulargewicht von 66 bis 78 kDa zur *HSP70*-Familie. Diese unterscheiden sich in ihrer Aminosäuresequenz, ihrem Expressionsmuster und insbesondere auch in ihrer Lokalisation innerhalb der Zelle (Tavaria et al., 1996).

Wie Sargent et al. zeigen konnten, befinden sich die in dieser Arbeit untersuchten Loci für *HSP70-2* und *HSP70-hom* auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 (6p21.3) in unmittelbarer Nähe zu den Genen der HLA-Klasse III des MHC, genauer gesagt zwischen den Genen des Komplementsystems, 92 Kilobasenpaare telomerisch zum *C2*-Gen, und denen der *TNF*-Familie (Sargent et al., 1989). Ein dritter Locus, *HSP70-1*, liegt ebenfalls in diesem Bereich. Milner und Campbell fanden heraus, dass dieses Gen für das gleiche, durch Hitze induzierbare Protein kodiert wie das *HSP70-2*-Gen (Milner und Campbell, 1990). Alle drei Gene weisen keinerlei Introns auf.

Die Proteine *HSP70-2* und *HSP70-hom* ähneln sich in hohem Maße in ihrer Struktur und auch in ihrer Funktion in der Zelle. Jedes Protein weist drei Domänen auf. Eine N-terminale Domäne mit ATPase-Funktion bindet ATP und hydrolysiert es zu ADP, was zu Konformationsänderungen der beiden anderen Domänen führt. Diese bestehen in einer

Substrat-bindenden Region, die die Chaperonfunktion des HSP vermittelt, und einer C-terminalen Domäne, welche als eine Art „Abdeckung“ für die Protein-bindende Domäne dient (Daugaard et al., 2007b; Sarto et al., 2000). Während allerdings die Expression von *HSP70-2* verstärkt in Folge eines Hitzeschocks beobachtet wird, scheint das 4 kB telomerisch dazu liegende Gen *HSP70-hom* dauerhaft auf einem niedrigen Level und unabhängig von thermischer Belastung exprimiert zu werden (Milner und Campbell, 1990).

### 1.3.2 Polymorphismen von *HSP70-2* und *HSP70-hom*

Goate et al. identifizierten 1987 über Verwendung des Restriktionsenzym PstI einen Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus im Bereich des *HSP70-2*-Gens und konnten diesen auf dem Chromosom 6 lokalisieren (Goate et al., 1987). Fünf Jahre später konnten Milner und Campbell zeigen, dass der Verlust einer Schnittstelle für dieses Enzym durch eine G>A-Transition auf Position 1267 des *HSP70-2*-Gens zustande kommt. Es handelt sich dabei um eine stille Mutation (Milner und Campbell, 1992). Zwei weitere Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen des *HSP70-2*-Genlocus finden sich an den Positionen 145 und 2074, wobei letzterer wie der Polymorphismus bei 1267 zwar in der kodierenden Region liegt, aber trotzdem eine stille Mutation darstellt (Favatier et al., 1997).

Für das *HSP70-hom*-Gen konnten bisher zwei RFLPs nachgewiesen werden: Der erste befindet sich an Position 1097 und entspricht erneut einer stillen Mutation. Der zweite Polymorphismus an Position 2437 hingegen liegt im Bereich einer Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease NcoI und hat den Austausch der Aminosäure Methionin gegen Threonin an Position 493 des fertigen Proteins zur Folge. Pociot et al. stellten die Vermutung auf, dass durch diesen Austausch einer hydrophoben gegen eine neutrale Aminosäure eine Veränderung in der spezifischen Peptidbindungsfähigkeit des *HSP70-hom*-Moleküls hervorgerufen werden könnte (Pociot et al., 1993).

### 1.3.3 Rolle der *HSP70*-Polymorphismen bei der Entstehung von Malignomen

Neben ihrer Aufgabe, Proteine der Zelle gegen Schädigungen zu schützen, haben Hitzeschockproteine auch eine Bedeutung für das Immunsystem: Sie sind an der

Antigenpräsentation für T-Lymphozyten beteiligt und vermitteln über eine Chaperon-Funktion für von Tumorzellen stammende Antigene die Bekämpfung des Tumors durch zytotoxische T-Zellen (Suto und Srivastava, 1995).

Im Gegensatz zu dieser antitumorösen Funktion deuten mehrere Studien daraufhin, dass *HSP70* auch eine bedeutende Rolle bei der *Entstehung* von Malignomen zu haben scheint, indem es in regulatorische Prozesse eingreift oder die gegen den Tumor gerichtete Immunität hemmt (Ciocca et al., 1993; Davidoff et al., 1992; Gress et al., 1994; Schiaffonati et al., 1991). Dies kann beispielsweise geschehen, indem auf Tumorzellen exprimiertes *HSP70* zu einer geringeren Angreifbarkeit derselben durch Makrophagen führt (Jaattela und Wissing, 1993). Auch scheint *HSP70* bestimmte Tumorzellen vor der durch *TNF*-vermittelten Zytotoxizität zu schützen (Jaattela, 1993). In Übereinstimmung dazu konnte eine Expression von *HSP70-1* in zahlreichen malignen Tumoren gezeigt werden und es scheint, zumindest für das Mammakarzinom, auch eine Korrelation zwischen einer erhöhten *HSP70-1*-Expression und einer verstärkten Zellproliferation, einer schlechten Differenzierung, einem Auftreten von Lymphknotenmetastasen und einem schlechten therapeutischen Outcome zu geben (Ciocca et al., 1993; Lazaris et al., 1997; Vargas-Roig et al., 1997; Vargas-Roig et al., 1998). Eine erhöhte Expression bei Fällen von Brustkrebs konnte auch für *HSP70-2* gezeigt werden (Melendez et al., 2006; Rohde et al., 2005). Dieses scheint das Wachstum und das Überleben von Krebszellen zu steigern (Daugaard et al., 2007a). Eine Überexpression von *HSP70* konnte zudem für das Magenkarzinom (Isomoto et al., 2003), für Lungenkrebs (Bonay et al., 1994), für das Endometriumkarzinom, zusammen mit dem Proto-Onkogen *c-myc*, (Abd el All et al., 1998) und auch für maligne Kolorektal- und Pankreastumoren (Gress et al., 1994; Lazaris et al., 1995) gezeigt werden. Chouchane und Mitarbeiter beschäftigten sich im Hinblick auf diese Beobachtungen mit der Frage, inwieweit sich verschiedene Phänotypen von *HSP70* auf das Tumerverhalten auswirken, und untersuchten die oben beschriebenen Polymorphismen von *HSP70-2* an Position 1267 und von *HSP70-hom* an Position 2437 für Non-Hodgkin-Lymphome und das Mammakarzinom. Sie konnten eine signifikante Korrelation zwischen einem homozygoten Genotyp für das mutierte Allel von *HSP70-2* und dem Risiko für die Entwicklung eines Non-Hodgkin-Lymphoms und Mammakarzinoms zeigen. Gleiches gilt für den *HSP70-hom*-Polymorphismus (Chouchane et al., 1997). Die

gleiche auffällige Häufung des homozygoten Genotyps für das P2-Allel von *HSP70-2* zeigte sich bei Patienten mit Nasopharynxkarzinom und könnte ein Marker für ein erhöhtes Erkrankungsrisiko sein (Jalbout et al., 2003).

## 1.4 RAGE

Im Jahre 1992 beschrieben Neeper und Mitarbeiter die genaue Struktur eines Rezeptors für sogenannte „advanced glycosylation end products of proteins“, abgekürzt „AGEs“, was so viel bedeutet wie „fortgeschrittene Stoffwechsellendprodukte der Glykosilierung“. Dabei handelt es sich um nicht-enzymatisch glykosilierte Proteine, welche mit zunehmender Alterung des Organismus und in besonders hohem Maße beim Diabetes mellitus in Folge der Hyperglykämie an den Endothelzellen der Gefäße und im Bindegewebe akkumulieren. Dies geschieht über die Bindung dieser Proteine an ein 35 kD-messendes Polypeptid auf der Oberfläche der Endothelzellen, welches folglich als *RAGE* (receptor for advanced glycosylation end products) bezeichnet wurde (Neeper et al., 1992). Neben Endothelzellen weisen auch zahlreiche andere Zellen eine unter normalen Umständen niedrige Dichte dieser Rezeptoren auf, so zum Beispiel Monozyten/Makrophagen, Mesangiumzellen oder Neurone (Brett et al., 1993). Man nimmt an, dass das vermehrte Auftreten von AGEs als Folge der Hyperglykämie beim Diabetes mellitus der zentrale Mechanismus für die Entstehung der zahlreichen Gefäßkomplikationen sein könnte (Brownlee, 1994; Vlassara, 2001).

### 1.4.1 Struktur des Gens und Proteins

Das Gen für *RAGE* liegt, wie auch die weiter oben beschriebenen Gene, im Bereich der HLA-Klasse III-Region des Major Histocompatibility Complex auf Chromosom 6p21.3, hat eine Länge von ca. 3000 bp inklusive der Promotorregion und beinhaltet neben 11 Exons auch 10 Introns (Sugaya et al., 1994). Das fertige *RAGE*-Protein besteht aus 404 Aminosäuren, welche durch einen 19 Aminosäuren langen transmembranären Abschnitt in einen extra- (321 Aminosäuren) und einen intrazellulär liegenden Abschnitt (41 Aminosäuren) geteilt werden. Der extrazelluläre Anteil gliedert sich in insgesamt drei Domänen auf und zeigt eine große Ähnlichkeit mit Immunglobulinen wie dem CD20. Folglich wird *RAGE* zur Superfamilie der Immunglobulin-Rezeptoren gezählt.

Über die im Zytosol befindliche Domäne wird die Signaltransduktion vermittelt (Huttunen et al., 1999; Neeper et al., 1992). Im Komplex mit einem Laktoferrin-ähnlichen Polypeptid vermittelt *RAGE* die Bindung, Aufnahme und Transzytose der AGEs in subendotheliale Schichten (Schmidt et al., 1994). Durch alternatives Splicing können aber auch andere Isoformen entstehen. Bisher wurden neben dem vollständigen Rezeptor fünf weitere in verschiedenen Geweben wie der Lunge, den Nieren und dem Gehirn identifiziert. Ihnen allen fehlt der transmembranäre Teil des Proteins, weshalb man annimmt, dass sie von den Zellen sezerniert werden. Auf Grund dessen werden sie auch als *sRAGE* (*soluble RAGE*) oder *esRAGE* (*endogenous secretory RAGE*) bezeichnet (Yonekura et al., 2003). Im Organismus kann *sRAGE* zirkulierende Liganden abfangen und so deren nachteilige Wirkungen verhindern oder umkehren (Hanford et al., 2004).

#### 1.4.2 Auftreten von *RAGE* im Organismus und Funktion bei Krankheiten

Unter normalen Umständen wird *RAGE* in geringer Dichte in vielen Geweben exprimiert, bindet dort kleine Mengen von AGEs und ermöglicht so deren Abbau. Zirkulieren nun aber vermehrt AGEs im Kreislauf, so kommt es zu einer Veränderung der Extrazellulärmatrix und der vaskulären Struktur, durch Quervernetzung von Proteinen wie z.B. dem Kollagen oder Proteinen der Basalmembran werden Gefäßlumina sukzessive verengt und Gefäßwände zunehmend versteift. Auch die Aktivität diverser Enzyme wird vermindert (Brownlee, 1995; Hudson et al., 1998). Gleichzeitig nimmt die Anzahl der Rezeptoren zu: Bei Patienten mit Diabetes mellitus konnte in atherosklerotischen Läsionen eine vermehrte Dichte von *RAGE* festgestellt werden (Basta, 2008; Schmidt et al., 2001). Über die Bindung an den Rezeptor entfalten die AGEs ganz spezifische, bisweilen negative Wirkungen. Gleiches gilt im Übrigen auch für andere Proteine wie beispielsweise das S100b, welches vermehrt von Entzündungszellen freigesetzt wird (Hofmann et al., 1999a) und eine Rolle spielt bei rheumatischen Erkrankungen und der Multiplen Sklerose (Yan et al., 2003), für das Amyloidprotein- $\beta$ , welches sich gehäuft im Gehirn von Patienten mit Alzheimer-Demenz findet (Yan et al., 1996), oder auch für das Polypeptid Amphoterin, welches während der Hirnentwicklung exprimiert wird und entscheidend für Wachstum und die Aussprossung kortikaler Neurone ist (Hori et al., 1995; Parkkinen et al., 1993; Taguchi et al., 2000). Auch diese

genannten Proteine können als Liganden von *RAGE* fungieren. Man nimmt an, dass nach Bindung eines der Liganden an *RAGE* oxidativer Stress in der Zelle induziert und über eine Freisetzung von Sauerstoffmolekülen letztlich auch der *nukleäre Faktor kappa-B* (*NF-κB*), ein Transkriptionsfaktor, aktiviert wird (Bierhaus et al., 2001). Passend dazu konnte bei Erkrankungen, für die eine ursächliche Verknüpfung mit oxidativem Stress nachgewiesen wurde (z.B. Atherosklerose (Barnes und Karin, 1997; Brand et al., 1996; Collins, 1993; Ruef et al., 1999), Diabetes mellitus (Baynes, 1991; Giugliano et al., 1996; Nishikawa et al., 2000) oder M. Alzheimer (Huttunen et al., 1999; Munch et al., 1998; Nunomura et al., 1999; Yan et al., 1995)), auch eine enge Assoziation mit dem *NF-κB*-Pfad gezeigt werden. So fand sich bei Patienten mit atherosklerotischen Plaques und Diabetes aktivierter *NF-κB* (Brand et al., 1996; Collins, 1993; Hofmann et al., 1999b).

Der *NF-κB* ist, wie oben beschrieben wurde, in hohem Maße an entzündlichen Geschehen, der Immunabwehr und an der Regulation des Zellzyklus beteiligt. Durch ihn vermittelt kommt es zur Freisetzung von Zytokinen wie dem Interferon-gamma oder *TNFα* und von Wachstumsfaktoren, z.B. dem Platelet-derived growth factor (PDGF). Auch nimmt die Gefäßpermeabilität zu (Bierhaus et al., 1998; Kislinger et al., 1999; Yan et al., 1994). Interessanterweise wird der *NF-κB* durch Liganden, die an *RAGE* binden, unter Umständen für länger als eine Woche aktiviert, während andere Rezeptoren, zum Beispiel der oben erwähnte *TNF*-Rezeptor, dies nur für wenige Stunden vermögen (Bierhaus et al., 1995). Umgekehrt wird die Expression von *RAGE* durch den *NF-κB* hochreguliert. Passend hierzu fanden Li et al. im Promotorbereich des *RAGE*-Gens zwei *NF-κB*-responsive Elemente, die dies vermitteln könnten (Li und Schmidt, 1997).

Als Folge einer dauerhaft erhöhten Konzentration von Liganden, z.B. den AGEs bei Diabetes oder des Amyloid-β beim Morbus Alzheimer, wird so ein positiver Feedback-Mechanismus in Gang gesetzt, der letztlich zu einer chronischen Entzündung führt und sie unterhält (Bierhaus et al., 2001). In Übereinstimmung damit fand sich bei Diabetikern in der Retina, im Mesangium der Niere sowie in den Wänden der Aorta eine vermehrte Expression von *RAGE* (Ritthaler et al., 1995; Soulis et al., 1997). Daraus resultieren eine irreversible Schädigung der Mikro- und Makrovaskularisation mit Organschäden bis hin zum Organversagen. Dieser Prozess wird zusätzlich durch eine über *RAGE*

transduzierte prokoagulatorische Wirkung gefördert (Bierhaus et al., 1997; Yamagishi et al., 1998). Auch werden in der Folge Monozyten in Regionen erhöhter AGE-Konzentrationen gelockt und führen einmal mehr zu einer endothelialen Dysfunktion und fördern das entzündliche Geschehen (Schmidt et al., 1993).

Für *sRAGE* bzw. *esRAGE* konnte in vitro und in Tierversuchen herausgefunden werden, dass sie in der Lage sind, negative, *RAGE*-vermittelte Effekte zu verhindern. Diese protektive Wirkung konnte gezeigt werden für die Atherosklerose und verzögerte Wundheilung bei Diabetikern (Goova et al., 2001; Park et al., 1998; Wear-Maggitti et al., 2004), für die Penetration von Amyloid- $\beta$ -Protein durch die Blut-Hirn-Schranke, welche eine große Bedeutung für die Alzheimersche Krankheit hat (Deane et al., 2003), und auch für Tumorzellmigration und -invasion (Taguchi et al., 2000). In Übereinstimmung damit wurden bei Patienten mit Koronarer Herzkrankheit (Falcone et al., 2005b), arterieller Hypertension (Geroldi et al., 2005) und Komplikationen in Folge eines Diabetes mellitus (Katakami et al., 2005; Yonekura et al., 2005) erniedrigte Spiegel des *sRAGE* gefunden. Bei Patienten mit stark verminderter Nierenfunktion, beispielsweise bei einem Patientenkollektiv, welches regelmäßiger einer Hämodialyse bedarf, ließen sich im Gegensatz dazu erhöhte Werte für *sRAGE* gemessen werden – trotz ihres erhöhten kardiovaskulären Risikos (Kalousova et al., 2007). Dies legt die Vermutung nahe, dass *sRAGE* die renale Funktion über einen bisher unbekanntem Mechanismus beeinflussen könnte (Kalousova et al., 2006).

#### 1.4.3 *RAGE* und Krebs

Kang et al. fanden heraus, dass eine Überexpression von *RAGE* in Tumorzellen zu einer gesteigerten Tumorzellvariabilität führt und über einen p53-abhängigen Signalpfad in Mitochondrien die Apoptoserate vermindert. Dies verdeutlicht die enge Verbindung zwischen Entzündungsmediatoren in der Tumorumgebung und einer Resistenz gegenüber dem programmierten Zelltod (Kang et al., 2009). Auch bei der *Entstehung* von Malignomen und der Ausbreitung von Metastasen spielt die vermehrte Expression von *RAGE* eine Rolle. Kuniyasu et al. konnten zeigen, dass die invasive und metastatische Aktivität von Magenkarzinomen eng assoziiert ist mit der Expression von *RAGE*. Insbesondere gering differenzierte Adenokarzinome des Magens waren positiv für den

Rezeptor (Kuniyasu et al., 2002). Abe et al. untersuchten den Zusammenhang zwischen *RAGE* und dem malignen Melanom. Sie fanden *RAGE* im Zytoplasma von Melanomzellen und auch im Tumorbett, während es sich in gesunder Haut kaum detektieren ließ. Zudem konnten sie zeigen, dass verschiedene AGEs in der Lage sind, das Wachstum und die Ausbreitung von Melanomzellen zu fördern, und stellten im Tierversuch mit Mäusen fest, dass es unter Behandlung mit neutralisierenden *RAGE*-Antikörpern zu einer geringeren Rate an pulmonalen Metastasen und zu einem verlängerten Überleben kam (Abe et al., 2004).

Angesichts der Bedeutung von Amphoterin bei der Aussprossung der Axone im Gehirn und seiner Co-Lokalisation mit *RAGE* am Ende der Neuriten untersuchten Taguchi et al., inwieweit beide die Migration von Zellen und so auch eine Tumordinvasion beeinflussen und begünstigen. Sie zeigten, dass bei Mäusen eine Blockade von *RAGE* +/- Amphoterin das Wachstum und die Metastasenentstehung sowohl bei implantierten Tumoren als auch bei spontan neu entstandenen Tumoren hemmt (Taguchi et al., 2000). Jedoch scheint eine erhöhte *RAGE*-Expression nicht bei allen malignen Tumoren vorzukommen. So konnte z.B. erst kürzlich in einer Studie mit Mammakarzinompatientinnen keine Assoziation nachgewiesen werden (Hashemi et al., 2012). Und nicht nur das, es scheint sogar im Gegensatz zu seiner beschriebenen Funktion als Induktor von Tumorwachstum und maligner Transformation in manchen Geweben sogar in konträrer Weise zu wirken, so z.B. in der Lunge: Während *RAGE* in gesundem Lungengewebe, insbesondere am Alveolarepithel, in hohem Maße exprimiert wird, findet sich bei Lungenkarzinomen eine signifikante Reduktion der Rezeptordichte (Schraml et al., 1997), was zu der Vermutung führt, dass *RAGE* in diesem Fall eine Tumorsupprimierende Funktion haben könnte. Passend dazu konnten im Tierversuch bei einer Re-Expression von *RAGE* in Tumorzellen der Lunge eine Reduktion der Proliferationsrate sowie ein gehemmtes Tumorwachstum beobachtet werden (Bartling et al., 2006; Bartling et al., 2005; Kobayashi et al., 2007).

Diese gewebespezifischen Unterschiede in der Funktion und Wirkung von *RAGE* lassen vermuten, dass der Rezeptor in Geweben, in welchen er, wie in der Lunge, auch unter normalen Umständen in hohem Maße exprimiert wird, Tumorsupprimierende Eigenschaften haben könnte, in den anderen Geweben, die normalerweise nur eine geringe

*RAGE*-Dichte aufweisen und wo seine Expression induzierbar ist, jedoch eine das Tumorwachstum fördernde (Riehl et al., 2009). Auch kann man überlegen, ob eine Hemmung von *RAGE* oder seiner Liganden in Zukunft eine Bedeutung für die Krebstherapie haben könnte.

#### 1.4.4 Polymorphismen von *RAGE* und ihre Bedeutung

Ungefähr 30 Polymorphismen im Bereich des *RAGE*-Gens wurden bisher beschrieben, die meisten von ihnen bestehen in Einzelbasenpolymorphismen (Hudson et al., 2001). Auf Grund der oben genannten Beobachtungen wurde im Rahmen mehrerer Studien der Einfluss verschiedener Polymorphismen im *RAGE*-Gen auf die Expression des Rezeptors untersucht und geschaut, inwieweit sich diese auf die vaskulären Komplikationen und Spätfolgen des Diabetes mellitus, zu denen die diabetische Retinopathie, Nephropathie und Neuropathie gehören, und auch auf andere Erkrankungen auswirken.

Der in dieser Arbeit untersuchte Polymorphismus befindet sich an Position -429 in der Promotorregion des Gens und zeichnet sich durch einen Austausch der Base Thymin (T) gegen Cytosin (C) aus (Hudson et al., 2001). Wie Laki et al. zeigen konnten, scheint das C-Allel dieses Polymorphismus Teil des 8.1. Ancestral Haplotypes zu sein, zu dem unter anderem auch das *TNF2*-Allel gehört (Laki et al., 2007). Dieser Haplotyp konnte in zahlreichen Studien mit immunpathologischen Störungen und Autoimmunerkrankungen wie dem Diabetes mellitus Typ I in Verbindung gebracht werden (Candore et al., 2002; Price et al., 1999). Andere gut untersuchte Polymorphismen sind auch die an Position 1704 G>T und 2184 A>G, welche sich beide in einem Intron des *RAGE*-Gens befinden, sowie der T>A-Polymorphismus an Position -374 des Promotors. Hudson et al. fanden eine vermehrte Prävalenz des C-Allels des -429-Polymorphismus bei Typ-II-Diabetes-Patienten mit Retinopathie. Zudem konnten sie in vitro für das -429C-Allel sowie für das mutierte Allel eines Einzelbasenpolymorphismus' an Position -374 (T>A) und eine 63 bp-Deletion (-407 bis -345) eine erhöhte Transkriptionsaktivität für *RAGE* nachweisen (Hudson et al., 2001).

Im Unterschied dazu konnten Globočnik-Petrovič und Mitarbeiter diese Beobachtung nicht bestätigen: Sie fanden bei einem Patientenkollektiv aus Typ-II-Diabetikern keine

Unterschiede in den Genotypverteilungen der -429-T/C- und -374-T/A-Polymorphismen zwischen Patienten mit und ohne diabetischer Retinopathie (Globocnik Petrovic et al., 2003). Das -429 C-Allel konnte in einer anderen Studie mit einem höheren Risiko für eine diabetische Nephropathie in Verbindung gebracht werden (Kankova et al., 2005), während das gleiche Allel sowie das -374 A-Allel beim Myokardinfarkt und Schlaganfall einen protektiven Effekt zu haben schienen (Zee et al., 2006). Bei den Polymorphismen 1704 G>T und 2184 A>G konnte eine Assoziation mit dem Vorkommen von Antioxidantien bei Patienten mit nicht-insulinabhängigem Diabetes mellitus festgestellt werden (Kankova et al., 2001).

Beim T>A-Polymorphismus an Position -374 ergaben sich widersprüchliche Ergebnisse: Während Petterson-Fernholm et al. den für das A-Allel homozygoten Genotyp bei Typ-I-Diabetikern mit einem selteneren Auftreten von Koronarer Herzkrankheit (KHK), akutem Myokardinfarkt und peripherer arterieller Verschlusskrankheit in Verbindung brachten (Petterson-Fernholm et al., 2003), war dieser Genotyp bei Patienten mit gestörter Glukosetoleranz oder Diabetes mellitus Typ II in der Studie von Engelen et al. mit einem schlechteren arteriellen Blutdruck und vermehrter Arteriosklerose assoziiert (Engelen et al., 2010). Nicht-Diabetiker mit AA-Genotyp wiesen ein geringeres Risiko für eine KHK auf (Engelen et al., 2010; Falcone et al., 2005a; Falcone et al., 2004).

Als Gründe für die uneinheitlichen und zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse der verschiedenen Studien kann man zum einen die unterschiedlichen Größen der untersuchten Patientenkollektive und die verschiedenen Ethnizitäten anführen, man kann auch mutmaßen, dass sich die verschiedenen *RAGE*-Polymorphismen anders auswirken je nach dem Status des Glukosemetabolismus (Engelen et al., 2010). Kalousová et al. konnten auch für *sRAGE* einen Einfluss von Polymorphismen auf die Expression zeigen: Sowohl bei Homozygotie für das C-Allel des -479-Polymorphismus als auch für das (veränderte) G-Allel eines Polymorphismus an Position 2184 konnten sie die höchsten *sRAGE*-Spiegel messen (Kalousova et al., 2007).

## 1.5 Das Ovarialkarzinom

### 1.5.1 Epidemiologische Daten

Die Inzidenz maligner Ovarialtumoren steht in Deutschland an fünfter Stelle aller weiblichen Malignome; 4,7 % aller bösartigen Neubildungen bei Frauen entfallen auf solche der Eierstöcke. Somit stellen maligne Tumoren des Ovars die zweithäufigsten bösartigen Genitaltumoren der Frau dar (Robert-Koch-Institut, 2008; Tumorzentrum, 2007). Die Erkrankungsrate ist dabei im Verlauf der letzten 20 Jahre in Deutschland wie auch in Nordamerika weitgehend konstant geblieben (Horner MJ, 2009)

Das mediane Erkrankungsalter wird von verschiedenen Autoren unterschiedlich angegeben und liegt im Bereich von 58 bis 68 Jahren (Kiechle, 2007; Robert-Koch-Institut, 2008; Runnebaum IB, 1998). Insgesamt zeigt die Erkrankungswahrscheinlichkeit eine positive Korrelation mit dem Alter der Frau (Tortolero-Luna und Mitchell, 1995), es findet sich ein deutlicher Anstieg der Erkrankungen nach der Menopause. Darüber hinaus scheinen auch geographische Faktoren eine Rolle zu spielen. So finden sich in hochentwickelten Industriestaaten wie den skandinavischen und westeuropäischen Ländern sowie in den USA deutlich höhere Inzidenzraten als in den Ländern Afrikas und Asiens (Nguyen et al., 1993).

Ungefähr 75 % aller Ovarialkarzinome werden auf Grund mangelnder Früherkennungsmethoden und zu Beginn meist fehlender Symptomatik erst in den klinischen FIGO-Stadien III und IV diagnostiziert (Kiechle, 2007), entsprechend schlecht sind die 5-Jahres-Überlebensraten, welche, je nach Stadium, nur bei 23,8 % (Stadium III) bzw. 11,6 % (Stadium IV) liegen (Nguyen et al., 1993). Damit ist das Ovarialkarzinom das am häufigsten zum Tode führende gynäkologische Malignom (Welsh et al., 2001).

### 1.5.2 Pathogenese und Risikofaktoren

Die Mehrzahl der primären Ovarialtumoren entsteht im Bereich des Zölomepithels auf der ovariellen Oberfläche. Man nimmt an, dass kleine Einschlusszysten, die aus Einstülpungen des Epithels infolge wiederholter Ovulationen entstehen, den Ursprung darstellen (Powell et al., 1992). Eine Entwicklung über benigne und Borderline-Formen wurde beschrieben (Puls et al., 1992).

Nachgewiesene Risikofaktoren für die Entstehung eines Ovarialkarzinoms sind somit neben einer positiven Familienanamnese und dem ansteigenden Lebensalter insbesondere Nulligravidität und dauerhaft ovulatorische Zyklen. Durch die wiederholte Traumatisierung und nachfolgende Regenerierung des ovariellen Oberflächenepithels häufen sich Mutationen in den Epithelzellen an, welche die Tumorentstehung begünstigen (Fathalla, 1971; Smith und Xu, 2008). Zugleich werden im Rahmen der Ovulation Zytokine und proteolytische Enzyme freigesetzt, ähnlich wie bei einer Entzündung. Dies trägt zur Entstehung entarteter Zellen bei (Ness und Cottreau, 1999). Cramer und Welch etablierten darüber hinaus die Gonadotropin-Hypothese, nach welcher die nach der Menopause dauerhaft erhöhten Gonadotropine zu einer Stimulation und Transformation der ovariellen Epithelzellen führen (Cramer und Welch, 1983). Auch wurde ein maskuliner Fettverteilungstyp mit einer Waist-to-Hip-Ratio von  $>0,801$  mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko assoziiert. Dies liegt möglicherweise an der vermehrten Umwandlung von Androgenen im Fettgewebe (Delort et al., 2009). Im Gegensatz dazu scheinen sich die mehrjährige Einnahme oraler Antikontrazeptiva sowie Schwangerschaften, insbesondere vor dem 25. Lebensjahr, protektiv auszuwirken (Greene et al., 1984; Lurie et al., 2007; Walker et al., 2002).

### 1.5.3 Ätiologie des sporadischen Ovarialkarzinoms

Ungefähr 90 % der Ovarialkarzinome treten sporadisch auf. Inzwischen konnten mehrere Gene identifiziert werden, im Bereich derer Mutationen zur Entstehung und dem Fortschreiten der Erkrankung beizutragen scheinen. Auf drei von ihnen möchte ich nachfolgend kurz eingehen. Zum einen fand man insbesondere in muzinösen Tumoren Mutationen des *K-ras*-Onkogens, welche zu einem frühen Zeitpunkt in der Tumorentstehung stattfinden (Cuatrecasas et al., 1997; Enomoto et al., 1991). Darüber hinaus wurde bei 10-50 % der Ovarialkarzinome die Amplifikation und als Folge davon eine Überexpression des *c-erb B-2*- Protoonkogens (syn. Her-2/neu) gefunden. Dieses kodiert für ein Glykoprotein der Zelloberfläche, welches homolog zum epidermal growth factor receptor (EGFR) ist; Veränderungen sind mit einer schlechteren Prognose und geringeren Überlebensraten assoziiert (Berchuck et al., 1990; Rubin et al., 1996; Slamon et al., 1989).

Das Tumorsuppressorgen *p53* (Chromosom 17p13.1) kodiert ein für die Regulation der Zellteilung wichtiges Protein. Es wird unter normalen Umständen aktiviert, wenn DNA-Schäden in der Zelle erkannt wurden, und leitet die Apoptose der Zelle ein. Man findet Mutationen oder Allelverluste bei 60 % aller menschlichen Tumoren und häufig auch beim Ovarialkarzinom (Frank et al., 1994; McManus et al., 1994; Milner et al., 1993). Manche Studien zeigen eine Korrelation der Veränderungen mit fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung (Niwa et al., 1994), andere wiederum sehen sie als eher frühe Ereignisse an (Kupryjanczyk et al., 1994). Bei Frauen ohne *p53*-Veränderungen im Tumor konnte eine günstigere Prognose verzeichnet werden (Wen et al., 1999). Von Bedeutung könnten Mutationen des *p53*-Gens insbesondere für die Therapie sein, da sie offenbar Tumorzellen resistent machen gegenüber Apoptose-induzierenden Chemotherapeutika (Shelling, 1997). Dies muss aber noch im Rahmen weiterer Studien erforscht werden.

#### 1.5.4 Ätiologie des hereditären Ovarialkarzinoms

Bei den hereditären Ovarialkarzinomen, die ca. 10 % der Ovarialkarzinome ausmachen, unterscheidet man drei Manifestationsformen (Bewtra et al., 1992):

1. eine auf das Ovar beschränkte Form (10-15 %)
2. das Mamma- und Ovarialkarzinom-Syndrom, bei dem beide Krebsarten vermehrt und z.T. in Kombination auftreten (65-75 %) und
3. Ovarialkarzinome, die mit dem gehäuften Auftreten von kolorektalen und endometrialen Karzinomen assoziiert sind (Syndrom des hereditären non-polypösen kolorektalen Karzinoms = HNPCC, syn. Lynch-Syndrom; 10-15 %).

Man vermutet dann ein Mamma-/Ovarialkarzinom-Syndrom, wenn mindestens fünf Fälle von Brust- oder Eierstockkrebs bei erst- oder zweitgradig Verwandten auftreten (Easton et al., 1995) oder sich alternativ mindestens drei Fälle mit Manifestation vor dem 60. Lebensjahr finden (Narod et al., 1995). Zu Grunde liegt den beiden erstgenannten Formen bei ca. zwei Dritteln der Fälle eine Mutation im breast cancer susceptibility gene 1 (*BRCA1*, lokalisiert bei 17q12-21) oder breast cancer susceptibility gene 2 (*BRCA2*, lokalisiert bei 13q12-13). Beide, *BRCA1* und 2, fungieren bei Patienten betroffener

Familien als klassische Tumorsuppressor-gene. Normalerweise sind sie wichtige Co-Faktoren der Rad 51-abhängigen Reparatur von DNA-Doppelstrang-Brüchen (Scully et al., 1997; Sharan et al., 1997). Man macht Keimbahnmutationen im *BRCA1*-Locus, die autosomal-dominant vererbt werden, für annähernd 80 % der hereditären Ovarialkarzinome im Rahmen des familiärem Mamma- und Ovarialkarzinom-Syndrom verantwortlich (Boyd und Rubin, 1997). Die Penetranz solcher Mutationen ist bei *BRCA1* mit rund 95 % extrem hoch; dies entspricht einem kumulativen Erkrankungsrisiko von 63 % für ein Ovarialkarzinom bis zum Alter von 70 Jahren (Easton et al., 1995). Zum Vergleich: In der Normalbevölkerung liegt das Risiko bei 1-2 %. Im Gegensatz dazu werden Mutationen im Bereich des *BRCA2* seltener mit Ovarialkarzinomen assoziiert; dagegen finden sie sich häufiger bei Fällen von familiärem Brustkrebs, insbesondere bei dem des männlichen Geschlechts. Interessanterweise haben Trägerinnen einer *BRCA1*-Mutation trotz eines im Mittel zehn Jahre früheren Auftretens eine bessere Prognose als Patientinnen mit einem sporadischen Ovarialkarzinom (Rubin et al., 1996). Da auch bei 40-75 % der sporadischen Ovarialkarzinome somatische Allelverluste im Bereich von 17q gefunden wurden, wird diskutiert, ob *BRCA1* auch in diesen Fällen eine Rolle als Tumorsuppressorgen spielen könnte (Russell et al., 1990; Saito et al., 1993). Weil aber Mutationen im Bereich von *BRCA1* bei sporadischen Karzinomen eher selten anzutreffen sind, nimmt man an, dass es auf dem gleichen Chromosom noch andere Gene geben könnte, die zur Entstehung eines Ovarialkarzinoms beitragen (Jacobs et al., 1993; Kirchweyer et al., 1994). Gleiches gilt für den Bereich 13q und *BRCA2* (Foster et al., 1996; Kim et al., 1994).

Das Syndrom des hereditären non-polypösen kolorektalen Karzinoms (HNPCC) wird autosomal-dominant vererbt und ist charakterisiert durch das Auftreten eines kolorektalen oder endometralen Karzinoms bei drei oder mehr erstgradig Verwandten, wovon bei mindestens Zweien ein kolorektales Karzinom vor dem 50. Lebensjahr diagnostiziert worden sein muss (Lynch et al., 1993). In den betroffenen Familien kommt es gehäuft zur Entstehung von Malignomen im gesamten Gastrointestinaltrakt, in den oberen Harnwegen und in den Ovarien; das Risiko für letzteres ist um das 3,5fache gegenüber der Normalbevölkerung erhöht (Bewtra et al., 1992; Watson und Lynch, 1993), was einem Lebenszeitrisiko von 10-12 % entspricht (Aarnio et al., 1999; Dunlop et al., 1997).

Verantwortlich für das HNPCC-Syndrom ist ein Defekt in einem von vier Genen, welche für sogenannte DNA mismatch repair – Proteine kodieren (Bronner et al., 1994; Fishel et al., 1994; Leach et al., 1993; Nicolaides et al., 1994; Papadopoulos et al., 1994):

- *hMSH2* (Chromosom 2p)
- *h MLH1* (Chromosom 3p)
- *hPMS1* (Chromosom 2q)
- *hPMS2* (Chromosom 7p)

Die Gene *MHS2* und *MLH1* sind in mehr als 90 % der Fälle betroffen. Die Defekte haben zur Folge, dass Fehler, die während der DNA-Replikation auftreten, nicht mehr korrigiert werden, was zu genetischer Instabilität in den betroffenen Zellen führt (Aaltonen et al., 1993; Risinger et al., 1993).

#### 1.5.5 Klassifikation und klinische Stadieneinteilung

Das Ovarialkarzinom kann nach verschiedenen Gesichtspunkten klassifiziert werden. Eine Einteilung nach der Histologie aller Ovarialtumoren wurde durch die WHO realisiert (Scully RE, 1999; Tavassoli FA, 2003). Sie nennt insgesamt 13 Gruppen maligner und potenziell maligner Tumoren, die drei wichtigsten sind:

- Oberflächenepithel-Stromatumoren (ca. 90 %)
- Keimstrangstroma-Tumoren (5-8 %)
- Keimzelltumoren (3-5 %)

Darüber hinaus kann das Ovarialkarzinom wie alle Malignome auch anhand der TNM-Klassifikation eingestuft werden. Hierbei werden neben der Ausdehnung des Primärtumors (T) auch der Befall regionärer Lymphknoten (N) sowie das Vorhandensein von Metastasen (M) berücksichtigt. Ergänzt werden kann die Klassifizierung noch durch das histopathologische Grading (G), das dem Differenzierungsgrad der Tumorzellen entspricht.

Die für den Klinikalltag im Hinblick auf die Einleitung einer adäquaten Therapie wichtigste Einteilung ist die nach FIGO (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique), welche je nach intraoperativem makroskopischem Befund und seiner histologischen Zugehörigkeit getroffen wird.

#### 1.5.6 Prognosefaktoren

Als wichtigster prognostischer Faktor gilt neben der Tumorausbreitung bei Erstdiagnose insbesondere bei fortgeschrittenen Stadien (FIGO III/IV) der postoperativ verbliebene Tumorrest (Brun et al., 2000; Tingulstad et al., 2003). Zudem spielen das Alter, der Allgemeinzustand der Patientin sowie ein positiver retroperitonealer Lymphknotenstatus für die Überlebenszeit eine wichtige Rolle. Auch die histologische Zugehörigkeit ist relevant: Muzinöse und klarzellige Karzinome weisen demnach eine weitaus ungünstigere Prognose auf als serös-papilläre oder endometriale Karzinom.

Der für das Ovarialkarzinom derzeit einzige aussagekräftige Tumormarker *CA-125* ist bei über 80 % der Patientinnen im Serum erhöht (Niloff et al., 1984). Postoperativ bestimmt erlaubt er eine Einschätzung des Ansprechens auf die Chemotherapie und lässt einen eventuellen Progress der Erkrankung erkennen (Gadducci et al., 1995; Meyer und Rustin, 2000). Gleichzeitig sind niedrige Werte mit einem längeren rezidivfreien Intervall und einem längeren Gesamtüberleben assoziiert (Crawford und Peace, 2005). Sein Einsatz als diagnostischer Faktor im Rahmen eines generellen Screenings bleibt jedoch fragwürdig. Zum einen werden erhöhte Werte auch in der gesunden Bevölkerung, im Rahmen benignen Vorgänge wie einer Schwangerschaft oder der Menstruation und auch bei nicht-gynäkologischen Malignomen beobachtet (Bast et al., 1983). Zum anderen liegt die Sensitivität für die Erkennung eines Stadium I-Karzinoms, also eines Karzinoms mit einer noch sehr hohen Überlebensrate und guten Therapiemöglichkeiten, bei lediglich 50 % (Jacobs et al., 1993). Aus diesen Gründen wird die Durchführung eines Screenings, auch bei Kombination von *CA125*-Messung und Vaginalsonographie, derzeit in der AWMF-Leitlinie für maligne Ovarialtumoren nicht empfohlen.

### 1.5.7 Therapieverfahren

Das Therapieverfahren der Wahl für das Ovarialkarzinom beinhaltet eine Kombination aus radikaler chirurgischer Tumorentfernung und nachfolgender Polychemotherapie. So kann auch bei etwa der Hälfte der Patientinnen in fortgeschrittenen Stadien eine Komplettremission erzielt werden, wenngleich es in der nachfolgenden Zeit allerdings meist zu einem Rezidiv kommt.

Eine möglichst vollständige Entfernung aller makroskopisch sichtbaren und palpablen Tumorherde mit dem Ziel, einen verbleibenden Tumorrest von maximal 1cm zu belassen, ist von entscheidender prognostischer Bedeutung (siehe oben) und zugleich die Voraussetzung für eine optimale Wirkung der Chemotherapie (Hoskins et al., 1992). Auch im Falle eines Rezidivs kann ein neuerlicher operativer Eingriff erwogen werden, solange das Erzielen einer makroskopischen Tumorfreiheit wahrscheinlich ist. Diese adjuvante systemische Therapie erfolgt derzeit standardmäßig ab dem FIGO-Stadium IA/G2 mit einer Kombination aus Carboplatin, welches sich als besser verträglich als Cisplatin erwiesen hat, und Paclitaxel (Tumorzentrum, 2007). Auch bei primär inoperablem Karzinom sowie in palliativer Absicht ist die Verabreichung einer Chemotherapie sinnvoll. Es sollte immer eine Vollremission angestrebt werden.

## 2. Aufgabenstellung

Die Pathogenese des Ovarialkarzinoms ist zum jetzigen Zeitpunkt nur unzureichend verstanden. Es handelt sich um eine überaus tückische Erkrankung mit begrenzten therapeutischen Möglichkeiten und in den meisten Fällen sehr ungünstiger Prognose. Umso wichtiger ist es, mögliche Einflussfaktoren auf genetischer Ebene zu untersuchen, um daraus eines Tages im besten Fall neue Erkenntnisse für die Risikoabschätzung und Behandlung gewinnen zu können.

Vor diesem Hintergrund beschäftigten wir uns mit einer Gruppe von Genloci, die eine bedeutende Rolle im menschlichen Organismus, insbesondere für das Immunsystem, spielen, und für die bereits im Hinblick auf andere maligne Erkrankungen ein Einfluss gezeigt werden konnte: Die Gene der HLA-Klasse III.

Wir gingen der Frage nach, inwieweit bestimmte funktionelle Polymorphismen der Loci *TNFA*, *LTα*, *HSP70-2* und *HSP70-hom* sowie *RAGE* gehäuft bei an Ovarialkarzinom erkrankten Frauen auftreten und stellten Hypothesen auf, wie diese sich auf das Krankheitsgeschehen auswirken könnten.

### **3. Patientenkollektiv**

Das untersuchte Patientenkollektiv bestand aus 47 Patientinnen (Durchschnittsalter bei Erstdiagnose 55 Jahre) mit primärem Adenokarzinom des Ovars, welche kaukasischer Herkunft waren, keine HLA-assoziierten Erkrankungen aufwiesen und die primär operativ an der Universitätsfrauenklinik Bonn therapiert wurden.

Die Kontrollgruppe setzte sich aus zwei Kollektiven zusammen: Das erste beinhaltete 108 gesunde, junge Probandinnen (Alter 23 bis 45 Jahre), die auf Grund einer Sterilitätsproblematik in der Abteilung für Endokrinologie und Reproduktionsmedizin der Universitätsfrauenklinik Bonn in Behandlung waren und bei denen zum Zeitpunkt der Untersuchung kein Ovarialkarzinom vorlag. Die Frauen waren ebenfalls kaukasischer Herkunft und wiesen keine HLA-assoziierten Erkrankungen auf. Eine zweite Kontrollgruppe bestand aus 77 Patientinnen (Durchschnittsalter 56 Jahre) mit gesichertem Mammakarzinom, bei denen im Rahmen der durchgeführten Staging-Untersuchungen ein Ovarialkarzinom sicher ausgeschlossen worden war und die keinen Anhalt auf das Vorliegen eines familiären Mamma- oder Ovarialkarzinoms aufwiesen. Histologisch handelte es sich überwiegend um duktal-invasive Karzinome (etwa 47 %), es wurden aber auch Patientinnen mit lobulär-invasivem Karzinom, Ductalem Carcinoma In Situ (DCIS) sowie Mischformen eingeschlossen.

Sowohl die Patientinnen mit Ovarialkarzinom als auch die Probanden der beiden Kontrollkollektive wurden für diese Arbeit für die in der Einleitung beschriebenen Polymorphismen der Genloci *TNFA*, *LTα*, *HSP70-2* und *HSP70-hom* sowie *RAGE* genotypisiert. Bei den analysierten Blutproben handelte es sich um solche, die bereits für andere Studienzwecke gewonnen worden waren. Eine Stellungnahme der Ethikkommission des Universitätsklinikums Bonn hierfür liegt vor.

## **4. Material und Methoden**

### **4.1 Chemikalien, Enzyme und Geräte**

Alle bei den praktischen Versuchen verwendeten Reagenzien wurden von den jeweiligen, in den einzelnen Abschnitten aufgeführten Firmen in Analysenqualität oder im höchsten erhältlichen Reinheitsgrad bezogen. Die Bezugsquellen sind in den jeweiligen Abschnitten angegeben.

### **4.2 DNA-Extraktion aus Vollblut**

Für die Extraktion der DNA wurde das QIAmp DNA Blood Mini Kit der Firma Qiagen verwendet. Mit diesem lassen sich aus lediglich 200 µl Vollblut durchschnittlich 6 µl DNA gewinnen, welche dann unverzüglich in einer PCR-Reaktion amplifiziert werden können. In einem ersten Schritt wird das Blut mit 20 µl Protease K versetzt, anschließend gibt man 200 µl des mitgelieferten AL-Puffers hinzu und inkubiert die Probe, nach Durchmischung auf dem Schüttler, für 10 min bei 56 °C. Hiernach erfolgt die Zugabe von 200 µl 96- bis 100 %igem Ethanol und nach erneuter Durchmischung gibt man das gesamte Volumen in eine QIAmp Spinsäule und zentrifugiert für 1 min bei 8000 rpm. Danach wird die Mischung mit 500 µl AW 1-Puffer versetzt und erneut für 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Nach Zugabe von 500 µl AW 2-Puffer erfolgt noch einmal eine Zentrifugation, diesmal für 3 min bei 14.000 rpm. Das benutzte Gefäß mitsamt Filtrat wird beide Male verworfen und der Filter mit der darin aufgefangenen DNA in ein frisches Sammeltube gesetzt. Abschließend wird die Spinsäule in ein 1,5 ml-Auffanggefäß gesetzt und mit 200 µl AE-Puffer durchspült. Nach einer 1-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wird noch ein letztes Mal zentrifugiert (1 min bei 8000 rpm) und man erhält sein in AE-Puffer gelöstes DNA-Produkt.

### **4.3 Konzentrationsbestimmung genomischer DNA**

Die DNA-Konzentration der DNA-Proben wurde mittels Spektralphotometrie am Gerät "GeneQuant II" von der Firma Pharmacia Biotech ermittelt und lag bei durchschnittlich 41 ng/ µl.

## 4.4 Die Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der sogenannten Polymerase-Kettenreaktion (engl.: Polymerase Chain Reaction, PCR) lassen sich *in vitro* bestimmte DNA-Abschnitte gezielt enzymatisch vervielfältigen (Mullis et al., 1992; Mullis und Faloona, 1987); man erhält so unter guten Bedingungen bis zu  $10^6$  Kopien eines gewünschten DNA-Bereiches (Saiki et al., 1988). Entscheidend ist die Kenntnis der Oligonukleotidsequenzen der zugehörigen Primerregionen. Durch komplementäre Anlagerung der jeweiligen Primer wird der zu vervielfältigende Genabschnitt eingegrenzt.

Es laufen wiederholt folgende Schritte ab:

1. Strangtrennung: Durch Zuführung von Hitze wird die DNA-Doppelhelix in zwei Einzelstränge denaturiert.
2. Hybridisierung der Primer: Die rasche Abkühlung der Reaktionslösung ermöglicht die Anlagerung der Primer an die beiden DNA-Stränge. Hierbei verhindert die Zugabe der Primer in großem Überschuss eine Rückbildung des ursprünglichen DNA-Doppelstranges.
3. DNA-Synthese: Bei ca. 72 °C erfolgt die komplementäre DNA-Synthese durch eine DNA-Polymerase.

Dieser letzte Schritt wird vielfach wiederholt, was zu einer exponentiellen Zunahme der PCR-Produkte führt. Eine wichtige Voraussetzung hierfür ist die Verwendung einer hitzestabilen DNA-Polymerase, welche man aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* gewinnt. Diese Taq-Polymerase ermöglicht ein vielfaches Durchlaufen der Reaktionszyklen in einem geschlossenen Gefäß ohne neuerliche Zugabe des Enzyms (Chien et al., 1976). Sie verlängert beide Primer von 5'- in 3'-Richtung.

### 4.4.1 Der PCR-Ansatz

Grundsätzlich benötigt man für jede PCR folgende Reagenzien:

- Ein Primerpaar mit der gewünschten Sequenz, d. h. komplementäre DNA-Moleküle aus ca. 20-30 Basen bestehend.

- Alle vier Desoxyribonucleosidtriphosphate (= dNTPs).
- Eine hitzestabile DNA-Polymerase.
- Einen Amplifikationspuffer, der u.a. Magnesiumionen enthält und einen für die Polymerase optimalen pH-Wert sicherstellt.

Für die Taq-Polymerase wurden 50 µl der Stammlösung (Konz. 5 U/µl) mit 200 µl 10x Reaktions-Puffer (mitgeliefert) zusammengegeben. Man erhielt so eine Taq-Polymerase mit der Konzentration 1 U/µl. Ein 10x Reaktionspuffer (=10x PCR-Puffer) lag dem Polymerasenset bei (500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM Tris-HCl, pH 7,0 RT). Die Herstellung der dNTP-Stammlösung erfolgte aus je 12,5 µl der vier 100 mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) mit 950 µl Aqua dest.; es ergab sich somit eine Lösung von 1,25 mM. Die Taq-Polymerase und die dNTP-Stammlösung wurden von der Firma GE Healthcare bezogen. Für jeden PCR-Ansatz wurde aus den jeweiligen Primern (Firma Sigma), den dNTPs, dem 10x-Reaktionspuffer und der Taq-Polymerase ein sogenannter Mastermix hergestellt. Dieser wurde mit der zu vervielfältigenden DNA sowie einer bestimmten Menge destillierten Wassers zusammen in ein PCR-Gefäß pipettiert. Die spezifischen Volumina für die einzelnen Reaktionsansätze der jeweiligen Genloci werden unten in den entsprechenden Abschnitten separat aufgeführt.

Alle Amplifikationen wurden mit dem „iCycler“ der Firma Biorad oder dem „GeneAmp PCR System 2400“ der Firma Perkin Elmer durchgeführt.

#### **4.5 Die Agarose-Gelelektrophorese**

Für die Darstellung der amplifizierten Genabschnitte wurde das Prinzip der Gelelektrophorese verwendet.

Hierfür wurden Gelplatten aus Agarose (je nach dem zu betrachtenden Gen in Konzentrationen von 1 % bis 3 %) und 1x TAE-Puffer (GibcoBRL; bestehend aus 200 ml 50x TAE-Reagenz verdünnt mit 9800 ml Aqua dest.) verwendet. Für die Herstellung wurde die gewünschte Menge Agarose („LE Agarose“; Biozym Scientific GmbH) abgewogen und im Verhältnis 1:100 mit 1x TAE-Puffer vermischt. Anschließend erfolgte die Erhitzung bei 90 °C im Wasserbad, bis sich die Agarose vollständig aufgelöst hatte und die Flüssigkeit klar war. Nach Abkühlung auf ca. 50 °C wurde zum Anfärben

Ethidiumbromid (Sigma Chemical CO., St. Louis, USA; Konz. 10 mg/ ml) im Verhältnis 1:10 zugegeben und das Ganze durch leichtes Schwenken gut durchmischt. Nun erfolgte die vorsichtige, blasenfreie Befüllung der Gelkammern und Einlage der Kämme als Platzhalter für die späteren Geltaschen. Nach Aushärtung der Gelplatten bei Zimmertemperatur konnten diese in die vorgesehenen, mit 1x TAE-Puffer gefüllten Gelelektrophoresewannen gelegt und mit den DNA-Amplifikaten geladen werden. Vorher wurden letztere zunächst mit Blue juice, einer beschwerenden Farblösung, versetzt (10x Blue juice: 12,5 g Ficoll, 0,125 g Bromphenolblau, 0,125 g Xylencyanol, 5 ml M EDTA ad 50 ml Aqua dest.; 1x Blue juice entsprechend im Verhältnis 1:10 mit H<sub>2</sub>O verdünnt).

Für die Elektrophorese wurden, je nach Größe der Gelkammer, die Wannen „Blue Marine 200“ bzw. „Blue Marine 100“ der Firma Serva sowie Wannen der Firmen Biozym und Pharmacia verwendet. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei einer Gleichspannung von ca. 50 bis 80 Volt/cm und dauerte ca. eine Stunde. Das Prinzip dabei ist, dass die anionischen DNA-Moleküle je nach ihrer Größe langsamer oder schneller durch das Gel in Richtung Plus-Pol wandern und so in einer vorgegebenen Zeit unterschiedlich lange Strecken zurücklegen. Das Ergebnis kann auf einer UV-Lampe (Faust N90, MW 312 nm) sichtbar gemacht werden, wobei das an die DNA angelagerte Ethidiumbromid die Fragmente zum Leuchten bringt. Eine parallel aufgetragene Ladder (PCR Low Ladder Marker Set, Firma Sigma), bestehend aus DNA-Molekülen verschiedener, klar definierter Basenpaar-Längen, diente als Längenstandard und ermöglichte die Zuordnung der amplifizierten Fragmente.

## **4.6 Typisierung für Tumornekrosefaktor-alpha**

### **4.6.1 Das Prinzip der allelspezifischen PCR**

Basierend auf der von Wu et al. beschriebenen und von Verjans et al. modifizierten Methode wurde der G>A-Transitionspolymorphismus an Position -308 des *TNF $\alpha$* -Gens mittels der allel-spezifischen PCR (ASPCR) untersucht (Verjans et al., 1994; Wu et al., 1989). Voraussetzung für diese Art der PCR ist es, dass die genaue Basensequenz des zu vervielfältigenden DNA-Abschnittes bekannt ist. Wir verwendeten die gleichen Primer wie Chouchane et al. in ihrer Veröffentlichung von 1997 (Chouchane et al., 1997). Die

jeweilige Allelspezifität für *TNF1* oder alternativ *TNF2* kommt durch lediglich eine einzige unterschiedliche Base am jeweiligen 3'-Ende des Primers zu Stande, die komplementär zum entsprechenden Allel ist und sich so nur an dieses anlagert. Passt das 3'-Ende des Primers hingegen nicht an die DNA-Vorlage, so kommt es zu keiner Elongation. So wird die genaue Unterscheidung zwischen den verschiedenen Allelen möglich. Zusätzlich wurde für jede Probe eine Positivkontrolle mit eigenem Primer durchgeführt, die das Gelingen der Reaktion anzeigte. Die genaue Sequenz der Primer ist aus der folgenden Tabelle ersichtlich:

Primer	Nukleotidsequenz	PCR-Produkt	amplifiziertes Allel
3'C1 5'C2	5'TCTCGGTTTCTTCTCCATCG-3' 5' ATAGGTTTTGAGGGGCATGC-3'	184 bp	TNF1
3'C1 5'C3	5' TCTCGGTTTCTTCTCCATCG-3' 5' ATAGGTTTTGAGGGGCATGA-3'	184 bp	TNF2
3'C1 5'C0	5'TCTCGGTTTCTTCTCCATCG-3' 5' GAGTCTCCGGGTCAGAATGA-3'	531 bp	Kontrolle

**Tab. 1:** Primer zur Amplifikation der Allele *TNF1* und *TNF2* des *TNF $\alpha$* -Polymorphismus auf Position -308 (nach Chouchane et al., 1997)

Alle vier Primer lagen in einer Konzentration von 100 pmol/ $\mu$ l vor.

#### 4.6.2 Der PCR-Ansatz

Für die Amplifikation der beiden *TNF $\alpha$* -Allele und für die Positivkontrolle wurde jede DNA-Probe einzeln mit Wasser und dem Mastemix zusammen in ein PCR-Tube pipettiert. Der Mastermix setzte sich wie eingangs beschrieben aus Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs), 10x Reaktionspuffer (= 10x PCR-Puffer), den beiden jeweiligen Primern (s. obige Tabelle) und der Taq-Polymerase zusammen, welche zuletzt zugefügt wurde, um unspezifische Amplifikationen vor Beginn der eigentlichen PCR zu vermeiden. Zum Ansetzen des Mastermixes multiplizierten wir die

Volumina der einzelnen Reagenzien mit der Anzahl der DNA-Proben und entnehmen diesem Gesamtmix dann für jede Probe eine entsprechende Menge.

Der Ansatz pro Probe und zu bestimmendem Allel (*TNF1*, *TNF2*, Kontrolle) sah wie folgt aus:

TNF1			TNF2			Kontrolle		
1,0	µl	DNA	1,0	µl	DNA	1,0	µl	DNA
0,1	µl	3'C1	0,1	µl	3'C1	0,1	µl	3'C1
0,1	µl	5'C2	0,1	µl	5'C3	0,1	µl	5'C0
3,2	µl	dNTP-Mix	3,2	µl	dNTP-Mix	3,2	µl	dNTP-Mix
1,5	µl	Taq-Polymerase	1,5	µl	Taq-Polymerase	1,5	µl	Taq-Polymerase
2,0	µl	10xPCR-Puffer	2,0	µl	10xPCR-Puffer	2,0	µl	10xPCR-Puffer
13,0	µl	H <sub>2</sub> O	13,0	µl	H <sub>2</sub> O	13,0	µl	H <sub>2</sub> O
<b>20</b>	<b>µl</b>	<b>pro Probe</b>	<b>20</b>	<b>µl</b>	<b>pro Probe</b>	<b>20</b>	<b>µl</b>	<b>pro Probe</b>

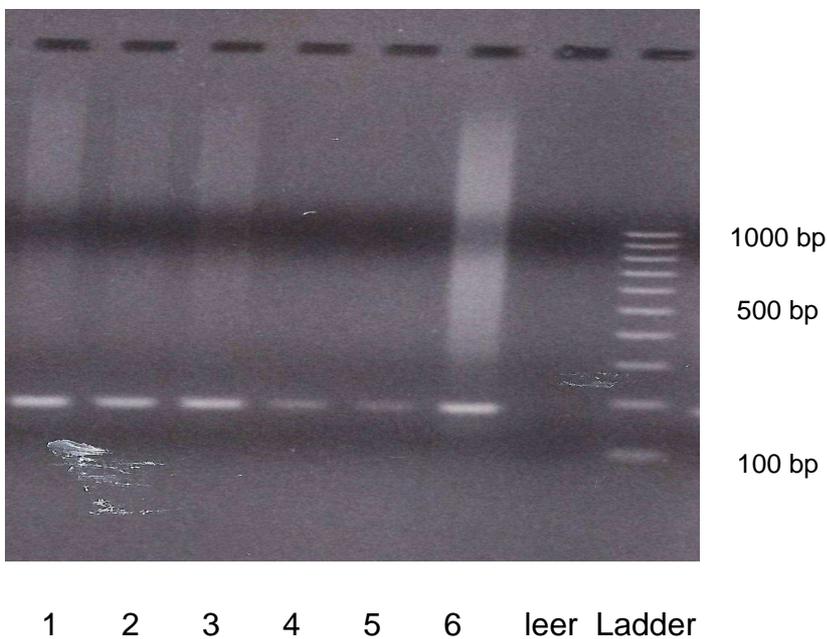
**Tab. 2:** Ansatz für die Amplifikation des *TNF $\alpha$* -Locus

Somit ergab sich pro Probe ein Gesamtreaktionsvolumen von 20 µl. Die fertig befüllten Tubes wurden in einen Thermocycler gegeben.

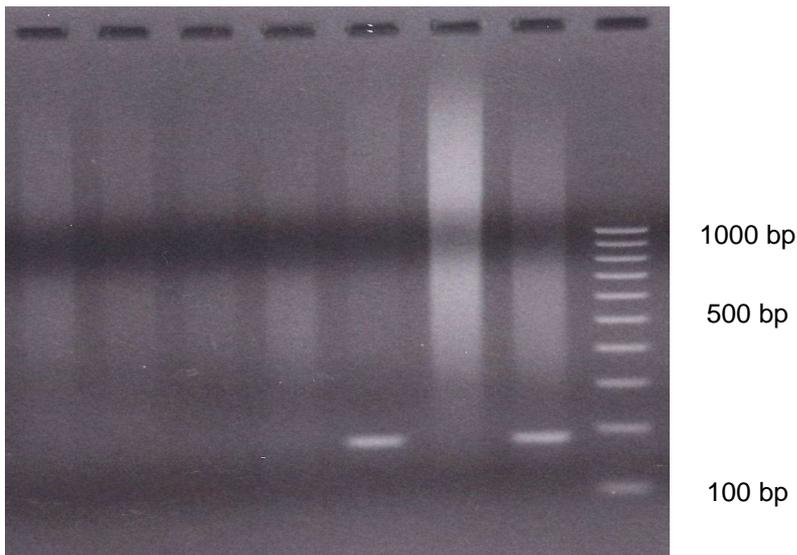
#### 4.6.3 Das PCR-Programm

Für die initiale Denaturierung der DNA-Doppelstränge wurden die Proben zunächst 5 min lang auf 95 °C erhitzt. Anschließend folgten 25 Zyklen mit jeweils einer Denaturierung für 40 Sekunden bei 95 °C gefolgt von der Hybridisierung bei 62 °C für 40 Sekunden und der Synthese bei 72 °C für 40 Sekunden. Nach der finalen Extension (7 min bei 72 °C) wurden die Proben bis zur Entnahme aus dem Cycler auf einer Temperatur von 10 °C gehalten. Nach erfolgreicher Amplifikation wurden die PCR-

Produkte mit 4  $\mu$ l 10x Blue Juice (Zusammensetzung s. Abschnitt Gelelektrophorese) versetzt und 12  $\mu$ l auf ein 2 %iges Agarosegel aufgetragen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung waren nun die DNA-Fragmente unter der UV-Lampe deutlich erkennbar. Als auswertbar wurden nur diejenigen Proben erachtet, bei denen auch in der Kontrolle ein Fragment sichtbar war. Die amplifizierten Fragmente der Allele *TNF1* und *TNF2* hatten jeweils eine Länge von 184 bp, die positive Kontrolle wurde durch das Erscheinen eines 531 bp-langen DNA-Fragments sichtbar. Bei Vorliegen eines homozygoten Genotyps zeigte sich pro DNA-Probe jeweils nur ein Fragment, *TNF1* oder *TNF2*, bei Heterozygotie hingegen zwei Fragmente.



**Abb. 3:** Foto einer Gelelektrophorese nach Amplifikation des *TNF1*-Locus; alle Proben enthalten das Allel *TNF1*, erkennbar am Fragment von 184 bp Länge



leer 6 5 4 3 2 1 Ladder

**Abb. 4:** Foto einer Gelelektrophorese nach Amplifikation des *TNF2*-Locus; Proben 1 und 3 enthalten das Allel *TNF2*, erkennbar am Fragment von 184 bp Länge

Wie hier dargestellt, sind also die Proben 1 und 3 heterozygot *TNF1/TNF2*, die übrigen homozygot für *TNF1*.

## 4.7 Typisierung für Lymphotoxin-alpha

### 4.7.1 Identifizierung des A>G Polymorphismus an Position +252 mittels Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus

Entscheidend für die Detektion des A>G Polymorphismus an Position +252 des *LT $\alpha$* -Gens ist die Tatsache, dass, wie in der Einleitung erwähnt, durch den Basenaustausch eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *NcoI* entsteht: Man spricht von einem Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP). Je nach Vorhandensein oder Fehlen der Restriktionsschnittstelle entstehen DNA-Fragmente definierter Länge, die sich eindeutig in der Gelelektrophorese voneinander trennen lassen. Restriktionsenzyme (syn. Restriktionsendonukleasen) werden aus verschiedenen Bakterien gewonnen und spalten DNA im Bereich spezifischer Erkennungssequenzen. Für die Analyse des RFLP wurde zunächst der entsprechende Genabschnitt mittels PCR amplifiziert und das Produkt anschließend mit der Restriktionsendonuklease *NcoI* verdaut. Es wurde die gleichen Primer verwendet wie von Warzocha et al. (Warzocha et

al., 1998), ihre genauen Basensequenzen lassen sich aus der folgenden Tabelle entnehmen:

Primer	Nukleotidsequenz	Amplifiziertes Produkt
5'LT $\alpha$	5'CTCCTGCACCTGCTGCCTGGATC-3'	<i>LT<math>\alpha</math></i> , 368 bp
3'LT $\alpha$	5'GAAGAGACGTTTCAGGTGGTGTGCAT-3'	

**Tab. 3:** Primer zur Amplifikation des *LT $\alpha$* -Locus (nach Warzocha et al., 1998), Konzentration 100 pmol/ $\mu$ l

#### 4.7.2 Der PCR-Ansatz

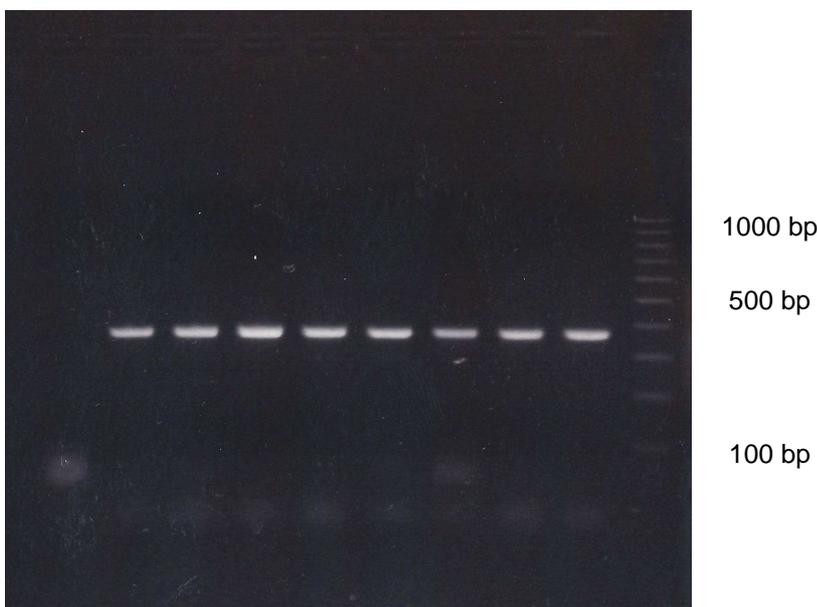
Für den Ansatz der PCR wurde erneut aus dNTPs, Taq-Polymerase, 10x PCR-Puffer und den beiden benötigten Primern ein Mastermix erstellt. Dieser wurde mit der isolierten DNA und destilliertem Wasser zusammengegeben und dann in den Thermocycler zur Amplifikation gestellt. Der genaue Ansatz ist der Tabelle 4 zu entnehmen. Das Gesamtvolumen pro Probe betrug 25  $\mu$ l.

LT $\alpha$		
1,5	$\mu$ l	DNA
0,2	$\mu$ l	5'LT $\alpha$
0,2	$\mu$ l	3'LT $\alpha$
4,0	$\mu$ l	dNTP-Mix
0,6	$\mu$ l	Taq-Polymerase
2,5	$\mu$ l	10x PCR-Puffer
16,0	$\mu$ l	H <sub>2</sub> O
<b>25</b>	<b><math>\mu</math>l</b>	<b>pro Probe</b>

**Tab. 4:** Ansatz für die Amplifikation des *LT $\alpha$* -Locus pro DNA-Probe

#### 4.7.3 Das PCR-Programm

Das PCR-Programm für *LT $\alpha$*  sah eine initiale Denaturierung von 5 min bei 94 °C vor, gefolgt von 30 Zyklen à 1 min Denaturierung bei 94 °C, 1 min Hybridisierung bei 65 °C, 1 min Synthese bei 72 °C und einer finalen Extension von 5 min bei wieder 72 °C. Anschließend wurden die Proben bei 4 °C bis zur Entnahme aus dem Cycler inkubiert. Nach Zugabe von 2  $\mu$ l 10x Blue Juice zu 8  $\mu$ l des PCR-Produktes erfolgte die Befüllung der Taschen eines 2 %igen Agarosegels. Bei erfolgreicher Amplifikation war eine Bande von 368 bp zu erkennen.



leer 8 7 6 5 4 3 2 1 Ladder

**Abb. 5:** Foto einer Gelelektrophorese nach Amplifikation des *LT $\alpha$* -Locus, erkennbar am Fragment von 368 bp Länge

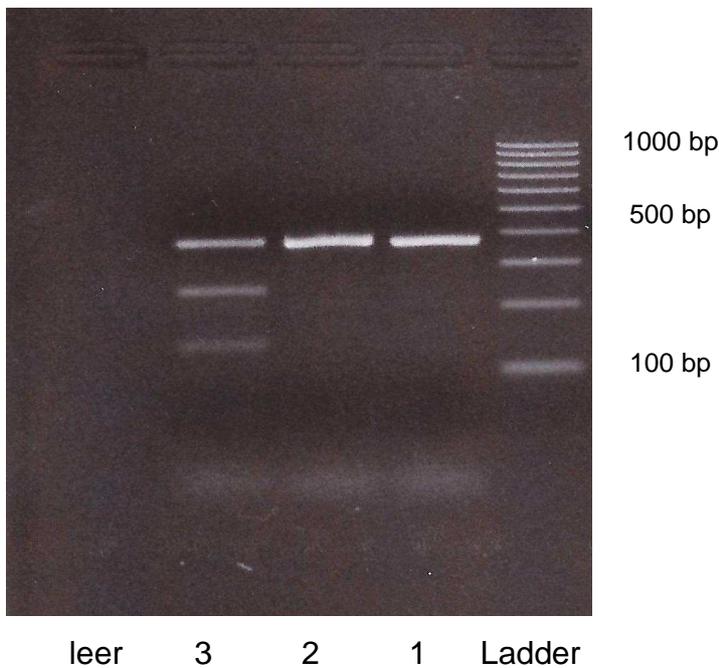
#### 4.7.4 Der Restriktionsenzymverdau

Die durch die PCR gewonnenen Produkte wurden drei Stunden bei 37 °C im Wasserbad mit der spezifischen Restriktionsendonuklease *Nco*I (Erkennungssequenz: 5'-C/CATGG-3'; 3'-GGTAC/C-5') verdaut. Der Ansatz für den Verdau sah wie folgt aus (pro Probe):

LT $\alpha$		
2	$\mu$ l	10x Enzym-Puffer
10	$\mu$ l	PCR-Produkt
1	$\mu$ l	Enzym NcoI

**Tab. 5:** Ansatz für den Enzymverdau von *LT $\alpha$*  pro DNA-Probe

Der 10x Enzym-Puffer lag dem Restriktionsenzym bei und schafft wie der PCR-Puffer eine für den Ablauf der enzymatischen Reaktion optimale Umgebung (pH-Wert, Ionenstärken). Nach Ablauf der drei Stunden im Wasserbad wurden die Proben auf Eis gesetzt und mit 1,3  $\mu$ l 10x Blue Juice vermischt. Nun konnten die Produkte auf ein 3%tiges Agarosegel gegeben, elektrophoretisch aufgetrennt und unter der UV-Lampe betrachtet werden. Bei Vorhandensein einer *NcoI*-Schnittstelle im PCR-Produkt von *LT $\alpha$*  entstanden zwei Fragmente mit Längen von 133 und 235 bp, es handelte sich um das Allel *LT2* (5.5 kB). Ein Fehlen der Schnittstelle wurde durch ein einziges Fragment von 368 bp Länge angezeigt (Wildtypallele *LT1* (10.5 kB)). Das Vorliegen eines heterozygoten Genotyps *LT1/LT2* wurde durch drei Fragmente (386, 235 und 133 bp) angezeigt.



**Abb. 6:** Gelelektrophorese für *LT $\alpha$*  nach Restriktionsenzymverdau mit *NcoI*; Probe 1 und 2 homozygot für *LT1*, Probe 3 heterozygot *LT1/LT2*

## 4.8 Typisierung für *HSP 70-2* und *HSP 70-hom*

### 4.8.1 Identifizierung der Polymorphismen des *HSP70-2*-Gens und des *HSP70-hom*-Gens mittels Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen

Auch für die Analyse des G>A Polymorphismus an Position 1267 des *HSP70-2*-Gens und des T>C-Polymorphismus an Position 2437 des *HSP70-hom*-Gens kamen, wie schon bei *LT $\alpha$* , Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen zum Einsatz. Anders als bei *LT $\alpha$*  geht jedoch bei beiden durch den Basenaustausch eine Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *Pst*I bzw. *Nco*I verloren. Wieder wurden zunächst die gesuchten DNA-Abschnitte mittels PCR vervielfältigt, danach erfolgte der Enzymverdau mit dem jeweiligen Restriktionsenzym.

Folgende Primer fanden Verwendung (Konz. 100 pmol/ $\mu$ l):

Primer	Nukleotidsequenz	Amplifizierter Locus
5'HSP70-2	5'TCCGAAGGACTGAGCTCTTG 3'	HSP70-2, 2075 bp
3'HSP70-2	5'CAGCAAAGTCCTTGAGTCCC 3'	
5'HSP70-hom	5'GGACAAGTCTGAGAAGGTACAG 3'	HSP70-hom, 878 bp
3'HSP70-hom	5'GTAAGTTAGATTCAGGTCTGG 3'	

**Tab. 6:** Primer zur Amplifikation der *HSP70-Loci HSP70-2* und *-hom* (nach Chouchane et al. 1997)

### 4.8.2 Die PCR-Ansätze

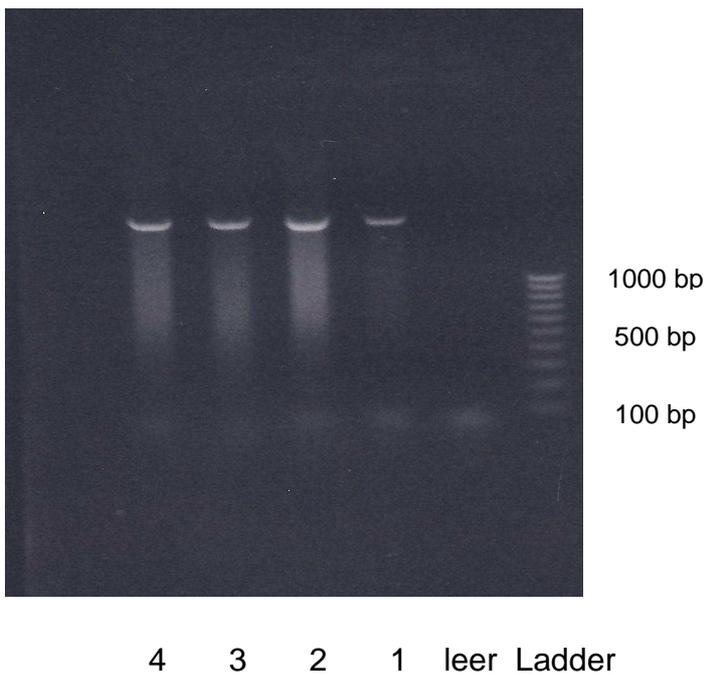
Wieder wurden die gleichen Reagenzien wie bei *TNF $\alpha$*  und *LT $\alpha$* , mit Ausnahme der Primer, verwendet. Die Reaktionsbedingungen mussten vielfach modifiziert werden, bis es zu einer erfolgreichen Amplifikation kam. Die endgültigen Ansätze lassen sich Tabelle 7 entnehmen.

HSP70-2			HSP70-hom		
4,0	µl	DNA	5,0	µl	DNA
0,4	µl	5'HSP70-2	0,25	µl	5 HSP70-hom
0,4	µl	3'HSP70-2	0,25	µl	3 HSP70-hom
6,4	µl	dNTP-Mix	8,0	µl	dNTP-Mix
2,0	µl	Taq-Polymerase	1,25	µl	Taq-Polymerase
4,0	µl	10x PCR-Puffer	5,0	µl	10x PCR-Puffer
22,8	µl	H <sub>2</sub> O	30,25	µl	H <sub>2</sub> O
<b>40</b>	<b>µl</b>	<b>pro Probe</b>	<b>50</b>	<b>µl</b>	<b>pro Probe</b>

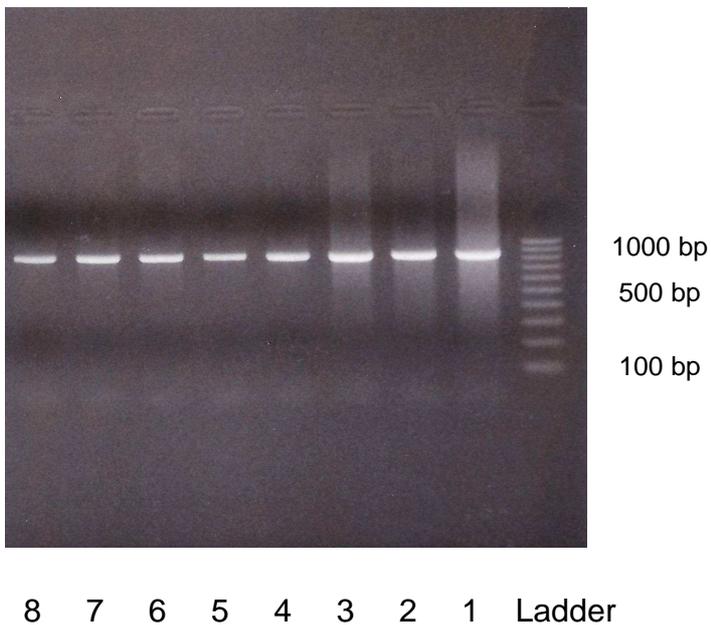
**Tab. 7:** PCR-Ansätze für *HSP70-2* und *HSP70-hom* pro DNA-Probe

#### 4.8.3 Die PCR-Programme

Die fertig befüllten PCR-Tubes wurden in den Cycler gegeben. Hierfür wurde für beide Loci das, bis auf die Dauer der finalen Extension, gleiche PCR-Programm verwendet. Es erfolgte zunächst die initiale Denaturierung bei 95 °C für 3 min, anschließend 30 Zyklen à 1 min Denaturierung bei 95 °C, 1 min Hybridisierung bei 60 °C und 3 min (*HSP70-2*) bzw. 1 min Synthese bei 72 °C. Nach einer finalen Extension bei 72 °C für 7 min (*HSP70-2*) bzw. 5 min (*HSP70-hom*) wurde eine Temperatur von 10 °C gehalten. Die Auswertung der Amplifikation erfolgte auf 1,5 %tigem Agarosegel. Hierfür wurden 8 µl des PCR-Produktes mit 2 µl 10x Blue Juice vermischt und in die Geltaschen pipettiert. War die Amplifikation erfolgreich, so erschien im UV-Licht eine entsprechende Bande, für *HSP70-2* mit einer Länge von 2075 bp, für *HSP70-hom* mit einer Länge von 878 bp. Anschließend konnte man den Restriktionsverdau durchführen.



**Abb. 7:** Gelelektrophorese nach Amplifikation des *HSP70-Locus*, Fragmentlänge 2075 bp



**Abb. 8:** Gelelektrophorese des *HSP70-hom-Locus*, Fragmentlänge 878 bp

#### 4.8.4 Der Restriktionsenzymverdau

Wie bei *LT $\alpha$*  erfolgte nach der erfolgreichen Amplifikation der Enzymverdau der Produkte. Für *HSP70-2* wurde die Restriktionsendonuklease PstI (Erkennungssequenz:

5'-CTGCA/G-3'; 3'-G/ACGTC-5') verwendet, für *HSP70-hom* das Enzym NcoI (Erkennungssequenz: 5'-C/CATGG-3'; 3'-GGTAC/C-5').

Für *HSP70-2* sah der Ansatz wie folgt aus:

<b>HSP70-2</b>		
2,0	µl	10x H-Puffer
7	µl	H <sub>2</sub> O
10	µl	PCR-Produkt
0,5	µl	Enzym PstI

**Tab. 8:** Ansatz für den Enzymverdau von *HSP70-2* mit PstI, pro DNA-Probe

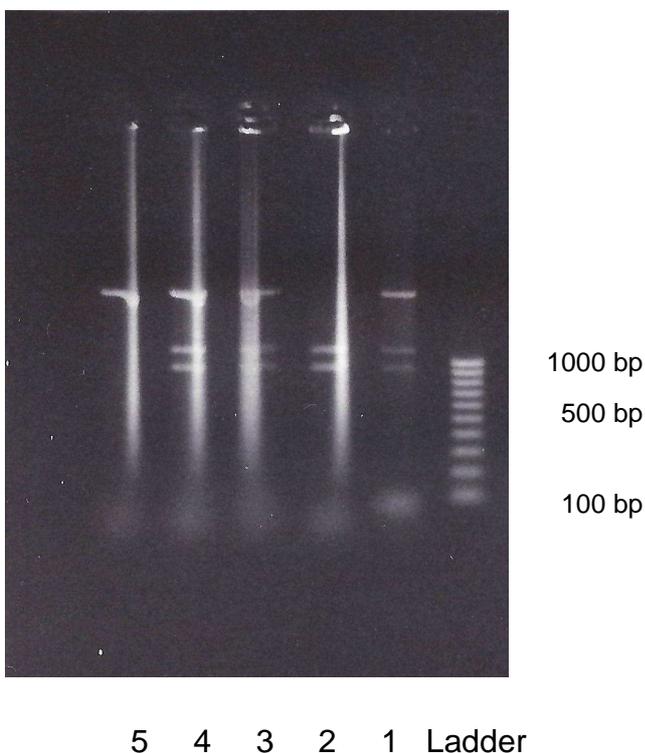
Für den Verdau von *HSP70-2* erfolgte die Inkubation bei 37 °C im Wasserbad erfolgte über Nacht. Anschließend wurde die Proben auf Eis gesetzt mit 80 µl -20 °C kalten Ethanols präzipitiert und danach umgehend für eine Stunde bei -70 °C in den Tiefkühler gegeben. Danach erfolgte die Zentrifugierung bei 13000 rpm für 15 min. Nachfolgend konnte der Überstand schwungvoll dekantiert werden. Nach einer Trocknung für 15 bis 25 min bei 70 °C im Heizblock konnte die DNA als Pellet erkannt werden und wurde, nach Zugabe von 10 µl 1x Blue Juice (Zusammensetzung s. 10x Blue Juice), zusammen mit einer als Längenstandard dienenden DNA-Ladder auf ein 2 %iges Agarosegel aufgetragen.

Der Ansatz für *HSP70-hom* unterschied sich nur hinsichtlich der Enzymmenge pro zu verdauender DNA-Probe:

<b>HSP70-hom</b>		
2,0	µl	10x H-Puffer
10	µl	PCR-Produkt
1,0	µl	Enzym NcoI

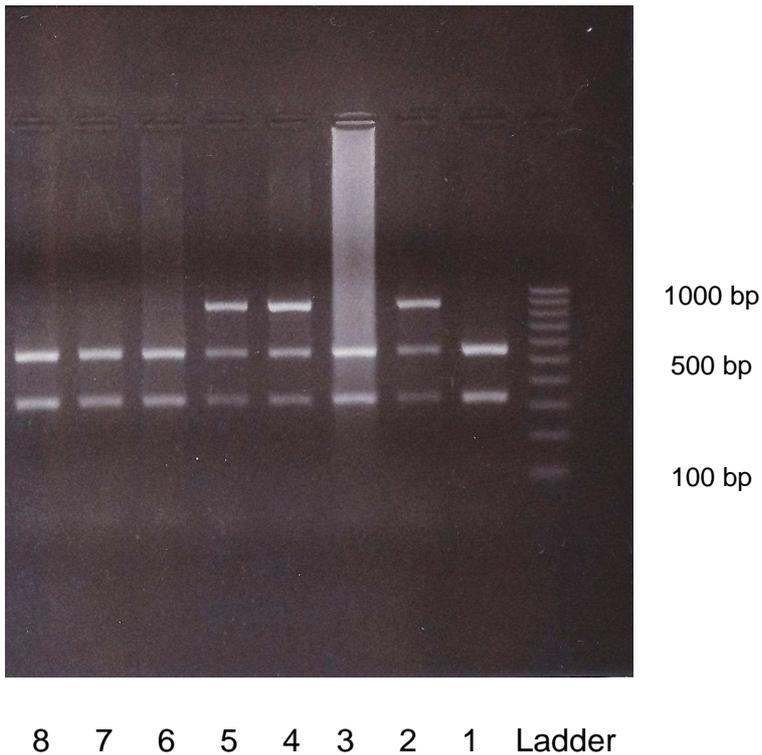
**Tab. 9:** Ansatz für den Enzymverdau von *HSP70-hom* mit NcoI, pro DNA-Probe

Für *HSP70-hom* genügte ein Verdau für 3,5 Stunden bei 37 °C im Wasserbad. Danach wurden die Proben mit 1,3 µl 10x Blue Juice gemischt und auf ein 1,5 %iges Agarosegel gegeben. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden die einzelnen Fragmente sichtbar. Bei *HSP70-2* zeigten zwei Fragmente à 1139 und 936 bp das Vorhandensein einer Schnittstelle für PstI und somit das Vorliegen des Wildtyp-Allels P1 an. Bei Verlust der Schnittstelle war lediglich ein DNA-Fragment von 2075 bp sichtbar; dies entsprach dem mutierten Allel P2. Ein heterozygoter Phänotyp wurde durch das Vorhandensein von allen drei Fragmenten angezeigt.



**Abb. 9:** Gelelektrophorese für *HSP70* nach Restriktionsenzymverdau mit PstI; Probe 1, 3 und 4 heterozygot *P1/P2*, Probe 2 homozygot für *P1*, Probe 5 homozygot für *P2*

Bei *HSP70-hom* erfolgte die Allelbenennung in gleicher Weise: Zwei Fragmente von 551 und 327 bp Länge entstanden beim Wildtyp-Allel, diesmal N1 genannt, mit der Schnittstelle für das Enzym NcoI. Fehlte diese, so zeigte sich nur ein Fragment von 878 bp Länge (entsprechend Allel N2).



**Abb. 10:** Gelelektrophorese für *HSP70-hom* nach Restriktionsenzymverdau mit *Nco*I; Probe 1, 3, 6, 7 und 8 homozygot für *N1*, Probe 2, 4, und 5 heterozygot *N1/N2*

#### 4.9 Typisierung für *RAGE*

##### 4.9.1 Identifizierung des T>C Polymorphismus an Position -429 mittels Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus

Erneut kam für die Analyse des T>C Polymorphismus an Position -429 des *RAGE*-Gens ein Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus zum Einsatz. Durch den Basenaustausch entsteht eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Alu*I (Erkennungssequenz: 5'-AG/CT-3'; 3'-TC/GA-5'). Nach Amplifikation des entsprechenden Genabschnitts mittels PCR wurde das Produkt anschließend mit der Restriktionsendonuklease *Alu*I verdaut. Die benötigten Primer (Konz. 25 pmol/μl) wurden der Publikation von Hudson entnommen (Hudson et al., 2001), die entsprechenden Basensequenzen sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

Primer	Nukleotidsequenz	Amplifiziertes Produkt
5'RAGE	5'GGGGGCAGTTCTCTCCTC-3'	RAGE, 344 bp
3'RAGE	5'TCAGAGCCCCCGATCCTATTT-3'	

**Tab. 10:** Primer zur Amplifikation des *RAGE*-Locus (nach Hudson et al., 2001)

#### 4.9.2 Der PCR-Ansatz

Für den PCR-Ansatz von *RAGE* wurden wieder dNTPs, 10x PCR-Puffer, Wasser, Taq-Polymerase und die beiden Primer benötigt. Nach Erstellung eines Mastermix' in ausreichender Menge wurden pro Probe 7,5 µl des Mastermix' wieder mit Wasser und der DNA in ein PCR-Gefäß zusammengegeben. Es ergab sich ein Reaktionsvolumen von 25 µl für jede Probe. Der Ansatz setzte sich im Detail wie folgt zusammen:

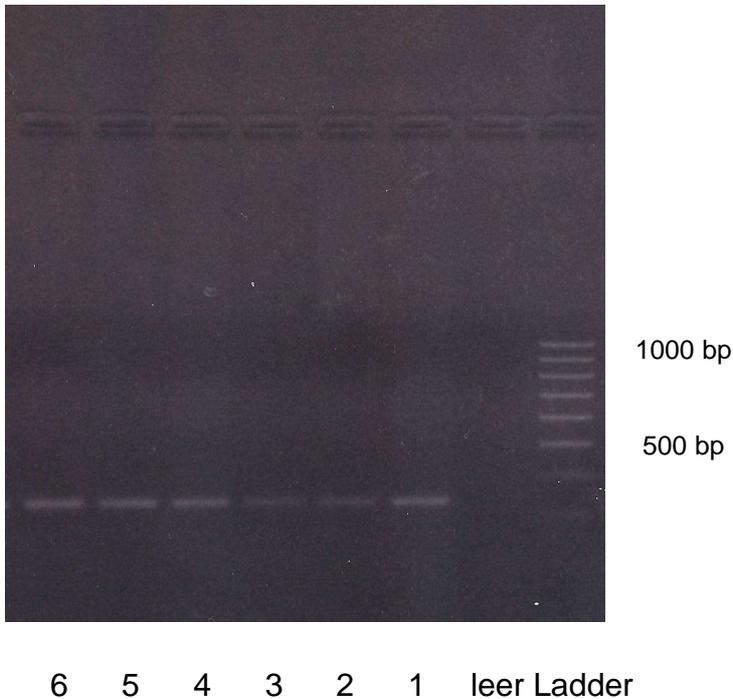
RAGE		
1,5	µl	DNA
0,2	µl	5'RAGE
0,2	µl	3'RAGE
4,0	µl	dNTP-Mix
0,6	µl	Taq-Polymerase
2,5	µl	10x PCR-Puffer
16,0	µl	H <sub>2</sub> O
<b>25</b>	<b>µl</b>	<b>pro Probe</b>

**Tab. 11:** PCR-Ansatz für *RAGE* pro DNA-Probe

#### 4.9.3 Das PCR-Programm

Für die Amplifikation des gewünschten DNA-Abschnitt erfolgte zunächst die initiale Denaturierung bei 94 °C für 5 min, anschließend wurden 30 Zyklen mit jeweils 1 min Denaturierung bei 94 °C, Hybridisierung bei 58 °C für 1 min und Synthese für 1 min bei

72 °C durchlaufen. Nach der finalen Extension (5 min bei 72 °C) wurde die Temperatur bei 4 °C gehalten, bis die Proben aus dem Cyclyer entfernt wurden. Nach Mischen von 8 µl des Produktes mit 2 µl 10x Blue Juice erfolgte auch hier die Amplifikationskontrolle auf 2 %tigem Agarosegel. Es musste ein Fragment von 344 bp Länge erkennbar sein.



**Abb. 11:** Gelelektrophorese nach Amplifikation des *RAGE*-Locus, Fragmentlänge 344 bp

#### 4.9.4 Der Restriktionsenzymverdau

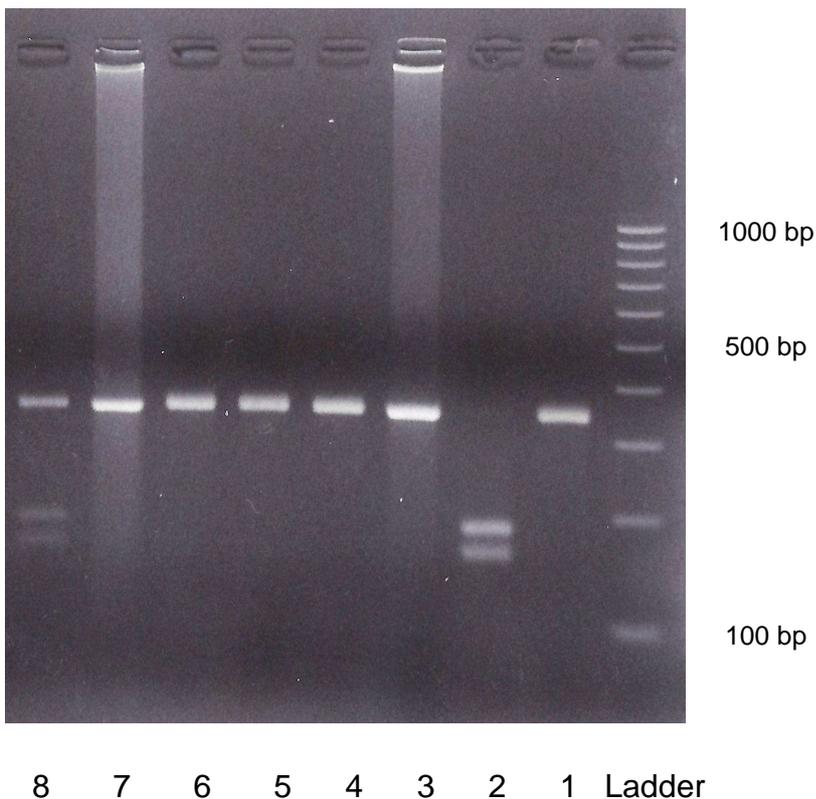
War die PCR erfolgreich, so wurden die Proben mit der spezifischen Restriktionsendonuklease *AluI* verdaut. Der Ansatz für den Verdau sah wie folgt aus:

<b>RAGE</b>		
2,0	µl	10x Enzym-Puffer
10,0	µl	PCR-Produkt
1,0	µl	Enzym <i>AluI</i>

**Tab. 12:** Ansatz für den Enzymverdau von *RAGE* pro DNA-Probe

Die Inkubation erfolgte bei 37 °C im Wasserbad für mindestens sechs Stunden. Anschließend wurden die Proben auf Eis gesetzt und mit 1,3 µl 10x Blue Juice versetzt.

Eine Ausfällung wie bei den beiden *HSP*-Loci war nicht nötig. Nun wurde die DNA auf ein 3 %iges Agarosegel aufgetragen, elektrophoretisch getrennt und im UV-Licht betrachtet. Bei Vorliegen des Wildtyps (T/T) blieb das PCR-Produkt von 344 bp Länge ungeschnitten. Lag ein mutiertes Allel vor (T/C), so wurde dieses Allel von *AluI* geschnitten und man erhielt so drei Fragmente (344 bp, 183 bp, 161 bp). Bei Homozygotie für das veränderte Allel (C/C) wurden nur zwei Fragmente auf dem Gel sichtbar (183 bp, 161 bp).



**Abb. 12:** Gelelektrophorese für *RAGE* nach Restriktionsenzymverdau mit *AluI*; Probe 1, 3, 4, 5, 6 und 7 homozygot für T, Probe 2 homozygot für C, Probe 8 heterozygot T/C

#### 4.10 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung der gewonnenen Daten wurde mit einem auf dem Statistikprogrammssystem SAS basierenden, für den Vergleich von Genfrequenzen modifizierten Programm am Institut für Medizinische Biometrie, Informatik und Epidemiologie der Universität Bonn durchgeführt. Für den Vergleich der Allel- und Genotypfrequenzen zwischen den Ovarialkarzinom-Patientinnen und der Kontrollgruppe wurde der  $\chi^2$ -Test verwendet. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als statistisch signifikant erachtet, wenn die Wahrscheinlichkeit für einen Fehler erster Ordnung weniger als 5 % betrug ( $p < 0,05$ ).

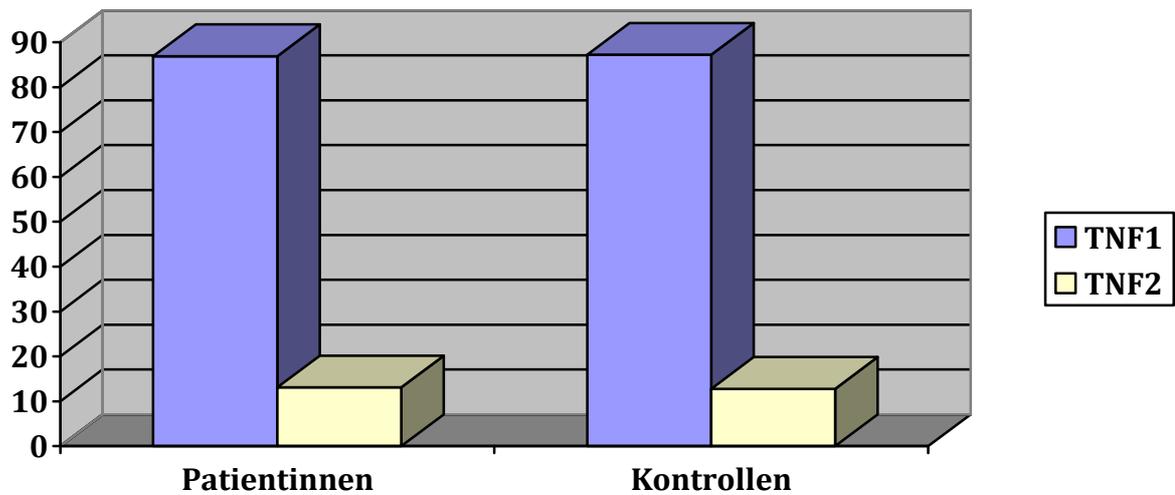
### 5. Ergebnisse

#### 5.1 Typisierung für *TNF $\alpha$*

Für 43 Patientinnen mit Ovarialkarzinom sowie für 179 Probandinnen aus den beiden Kontrollgruppen war die Typisierung für den Polymorphismus an Position -308 in der Promotorregion des *TNF $\alpha$* -Locus erfolgreich.

##### 5.1.1 Allelfrequenzen von *TNF $\alpha$*

Insgesamt zeigte sich für das *TNF1*-Allel in beiden Kollektiven zusammengenommen, also bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom und den nicht erkrankten Probandinnen der Kontrollgruppe, eine Häufigkeit von 86,9 %, das *TNF2*-Allel war nur mit einer Häufigkeit von 13,1 % vertreten. Diese Zahlen decken sich in etwa mit denen von Allen et al. im Jahre 2000 für ein kaukasisches Normalkollektiv ermittelten Prozentwerten (Allen et al., 2000). Betrachtete man die einzelnen Allelfrequenzen in den beiden Gruppen getrennt, so ergab sich eine ähnliche Verteilung: Während 86,9 % der gesunden Frauen das Allel *TNF1* und 13,1 % das Allel *TNF2* aufwiesen, fand sich *TNF1* in der Patientinnengruppe bei 87,2 % und *TNF2* bei 12,8 % der Untersuchten. Es lässt sich somit kein signifikanter Unterschied für die Allelfrequenzen feststellen ( $p = 0,93$ ), ein Risikoallel für die Entwicklung eines Ovarialkarzinoms kann nicht identifiziert werden.



**Abb. 13:** Allelfrequenzen für den Polymorphismus an Position -308 in der Promotorregion des *TNFα*-Locus

#### 5.1.2 *TNFα*-Genotypfrequenzen

Die Analyse der verschiedenen Genotypfrequenzen ergab ebenfalls ähnliche Häufigkeiten in Patientinnen- und Kontrollgruppe. 74,9 % der Gesunden waren homozygot für *TNF1*, 1,1 % homozygot für *TNF2* und 24,0 % heterozygot. Für die Ovarialkarzinom-Patientinnen ergaben sich folgende Zahlen: 76,7 % waren homozygot für *TNF1*, 2,3 % homozygot für *TNF2* und 21,0 % heterozygot.

Somit lässt sich für das Ovarialkarzinom kein Risikogenotyp bestimmen ( $p=0,77$ ).

<b><i>TNFα</i> -308 Genotyp</b>	<b>Patientinnen (in %)</b>	<b>Kontrollen (in %)</b>
TNF1/TNF1	76,7	74,9
TNF1/TNF2	21,0	24,0
TNF2/TNF2	2,3	1,1

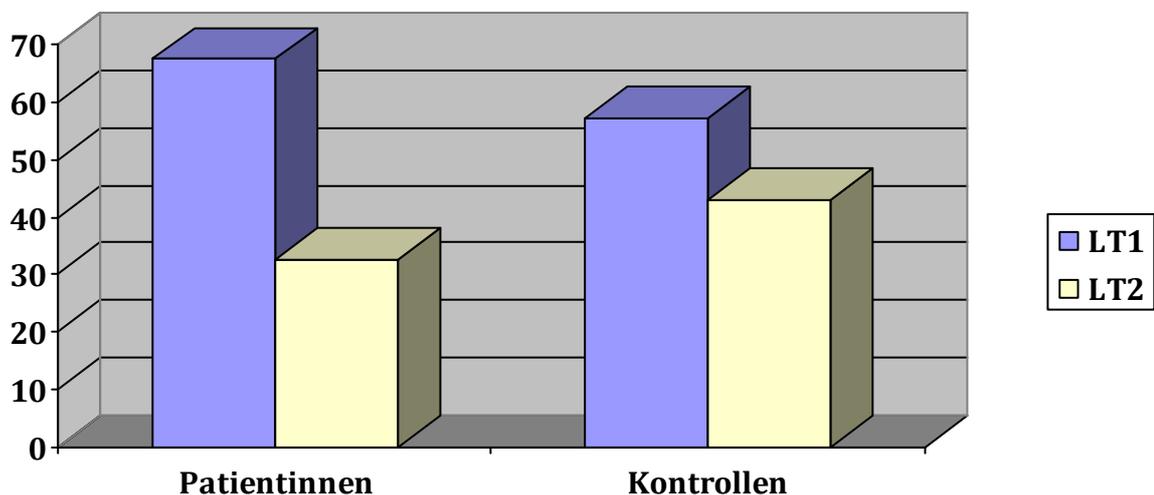
**Tab. 13:** Genotypverteilungen für den Polymorphismus an Position -308 in der Promotorregion des *TNFα*-Locus ( $p=0,77$ )

## 5.2 Typisierung für $LT\alpha$

Die Typisierung für den Polymorphismus an Position -252 des  $LT\alpha$ -Locus konnte bei 46 Patientinnen sowie bei 183 Probandinnen erfolgreich durchgeführt werden. Für jeden neuen Reaktionsansatz wurde zusätzlich zu den Proben ein Leerwert (ohne DNA) mitgeführt, welcher anzeigte, ob die PCR grundsätzlich richtig funktioniert hatte.

### 5.2.1 Allelfrequenzen von $LT\alpha$

Für  $LT\alpha$  zeigte sich keine deutliche Häufung eines der beiden analysierten Allele, während 59,2 % aller Untersuchten das Allel  $LT1$  aufwiesen, fand sich das Allel  $LT2$  bei 40,9 %. Die Allelverteilungen zwischen Patientinnen- und Kontrollgruppe waren ebenfalls ausgeglichener als bei  $TNF\alpha$ . In der Kontrollgruppe fand sich bei 57,1 % das Allel  $LT1$ , bei 42,9 % das Allel  $LT2$ . Für das Patientinnenkollektiv betrug der Anteil des  $LT1$ -Allels 67,4 %, der des  $LT2$ -Allels 32,6 %. Dies ergibt knapp keinen signifikanten Unterschied in der Allelverteilung zwischen den beiden untersuchten Gruppen ( $p=0,07$ ), d. h. es lässt sich kein gehäuftes Auftreten eines der beiden Allele bei Individuen mit Ovarialkarzinom feststellen.



**Abb. 14:** Allelverteilungen für den Polymorphismus an Position -252 des  $LT\alpha$ -Locus ( $p=0,07$ )

### 5.2.2 *LT* $\alpha$ -Genotypfrequenzen

Ein Vergleich der Homo- und Heterozygotenfrequenzen von Patientinnen und Kontrollen zeigte keine Bevorzugung eines bestimmten Genotyps beim Ovarialkarzinom.

Während 35,5 % der Gesunden homozygot für *LT1* waren, betrug der Anteil bei den Patientinnen 45,7 %. Homozygot für das Allel *LT2* waren 21,3 % der Kontrollprobanden und 10,9 % der Erkrankten, daraus ergaben sich Heterozygotenfrequenzen von 43,2 % bei den Gesunden und 43,5 % bei den Patientinnen. Somit zeigte sich ein etwas häufigeres Auftreten des homozygoten *LT1/LT1*-Genotyps bei den betroffenen Frauen und des *LT2/LT2*-Genotyps bei den Gesunden, dieser Unterschied war aber statistisch nicht signifikant ( $p=0,21$ ).

<b>LT<math>\alpha</math> -252 Genotyp</b>	<b>Patientinnen (in %)</b>	<b>Kontrollen (in %)</b>
LT1/LT1	45,7	35,5
LT1/LT2	43,5	43,2
LT2/LT2	10,9	21,3

**Tab. 14:** Genotypverteilungen für den Polymorphismus an Position -252 des *LT* $\alpha$ -Locus ( $p= 0,21$ )

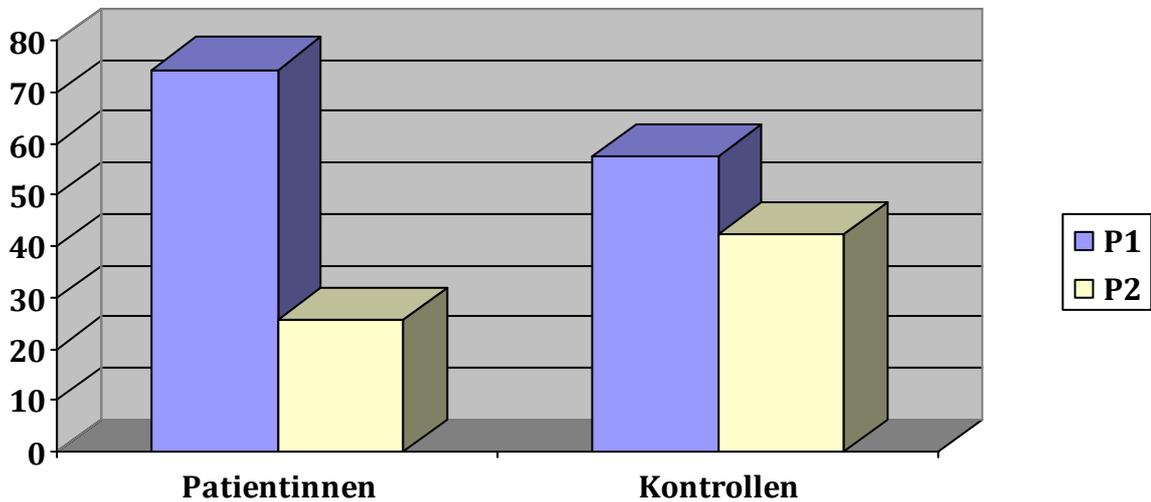
### 5.3 Typisierung für *HSP70-2* und *HSP70-hom*

Für den Polymorphismus an Position 1267 des *HSP70-2*-Locus konnten 43 Patientinnen und 178 Kontrollpersonen erfolgreich genotypisiert werden, für den Polymorphismus an Position 2437 des *HSP70-hom*-Gens waren es 42 Patientinnen und 172 Probandinnen.

#### 5.3.1 *HSP70-2*-Allelfrequenzen

Insgesamt wurde für das Allel P1 des *HSP70-2*-Locus für alle Untersuchten zusammen eine Häufigkeit von 60,9 % festgestellt, es war somit deutlich häufiger vertreten als das Allel P2 (39,1 %). Bei der Analyse der Allelfrequenzen für die beiden Gruppen, Patientinnen einerseits und gesunde Probandinnen andererseits, zeigte sich ein signifikanter Unterschied ( $p=0,04$ ): Bei den Kontrollen entfielen 57,6 % aller Allele auf P1 und 42,6 % aus P2, wohingegen sich das Allel P1 bei den an einem Ovarialkarzinom

erkrankten mit 74,4 % weitaus häufiger fand als das Allel P2 (25,6 %). Dies könnte bedeuten, dass das Allel P1 des Polymorphismus an Position 1267 im Locus *HSP70-2* mit einem höheren Erkrankungsrisiko assoziiert ist.



**Abb. 15:** Allelverteilungen für den Polymorphismus an Position 1267 des *HSP70-2*-Locus ( $p=0,04$ )

### 5.3.2 *HSP70-2*-Genotypfrequenzen

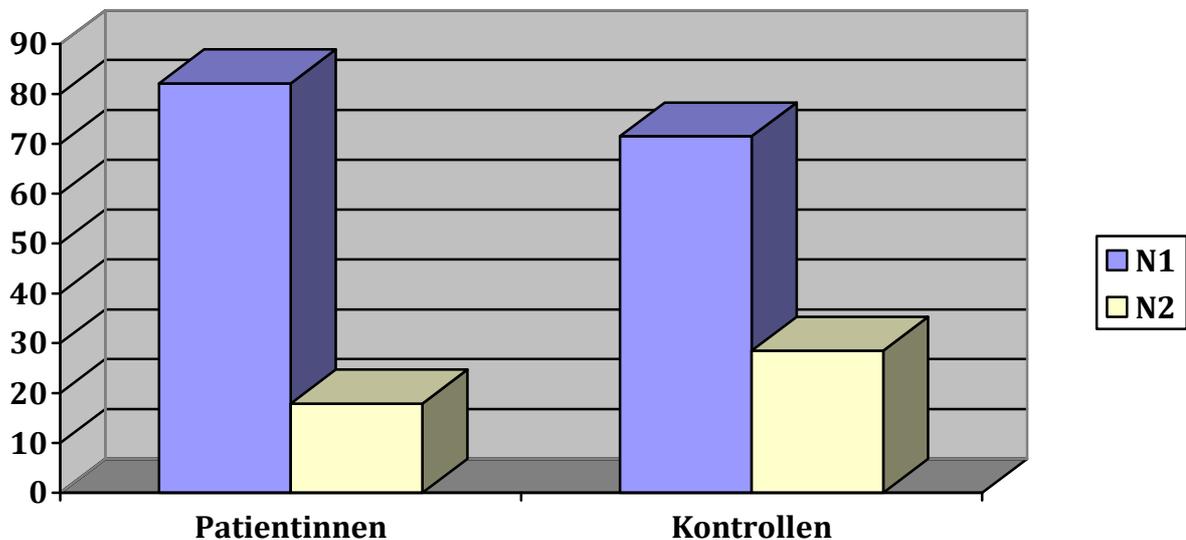
Schaute man sich nun die Genotypfrequenzen in den beiden Gruppen näher an, so ließ sich auch hier eine hoch signifikante Korrelation zwischen dem Allel P1 und einer Ovarialkarzinomerkrankung feststellen: 48,8 % der Erkrankten waren homozygot für P1, keiner homozygot für P2 und 51,2 % wiesen beide Allele auf. Bei den gesunden Probandinnen waren lediglich 39,9 % homozygot für P1 und es fand sich bei 24,7 % ein homozygoter Genotyp für P2. Diese Verteilung entspricht einem p-Wert von 0,001.

HSP70-2 1267 Genotyp	Patientinnen (in %)	Kontrollen (in %)
P1/P1	48,8	39,9
P1/P2	51,2	35,4
P2/P2	0,0	24,7

**Tab. 15:** Genotypverteilungen für den Polymorphismus an Position 1267 des *HSP70-2*-Locus ( $p= 0,001$ )

### 5.3.3 *HSP70-hom*-Allelfrequenzen

Das Allel N1 des Polymorphismus an Position 2437 des *HSP70-hom*-Gens war bei beiden Kollektiven zusammen genommen mit 73,6 % deutlich häufiger vertreten als das Allel N2 (26,4 %). Bei den erkrankten Frauen wiesen 82,1 % das Allel N1 auf, bei den Gesunden waren es nur 71,5 %. Somit ergab sich ein signifikanter Unterschied in der Allelverteilung zwischen den beiden Gruppen mit Bevorzugung des Allels N1 bei Individuen mit Ovarialkarzinom ( $p=0,048$ ).



**Abb. 16:** Allelverteilung für den *HSP70-hom*-Locus an Position 2437 bei Patientinnen und Kontrollen ( $p=0,048$ )

### 5.3.4 *HSP70-hom*-Genotypfrequenzen

Bezüglich der Genotypfrequenzen zeigte sich keine signifikante Korrelation einer bestimmten Allelkombination mit der Eierstockkrebserkrankung ( $p=0,11$ ). In beiden Gruppen war der für N1 homozygote Genotyp am häufigsten vertreten (66,7 % bei den Erkrankten, 48,8 % bei den Kontrollen), ein für das Allel N2 homozygoter Genotyp fand sich hingegen selten (2,4 % bei den Erkrankten und 5,8 % bei den Kontrollen), die restlichen Untersuchten waren heterozygot.

HSP70-hom 2437 Genotyp	Patientinnen (in %)	Kontrollen (in %)
N1/N1	66,7	48,8
N1/N2	30,9	45,4
N2/N2	2,4	5,8

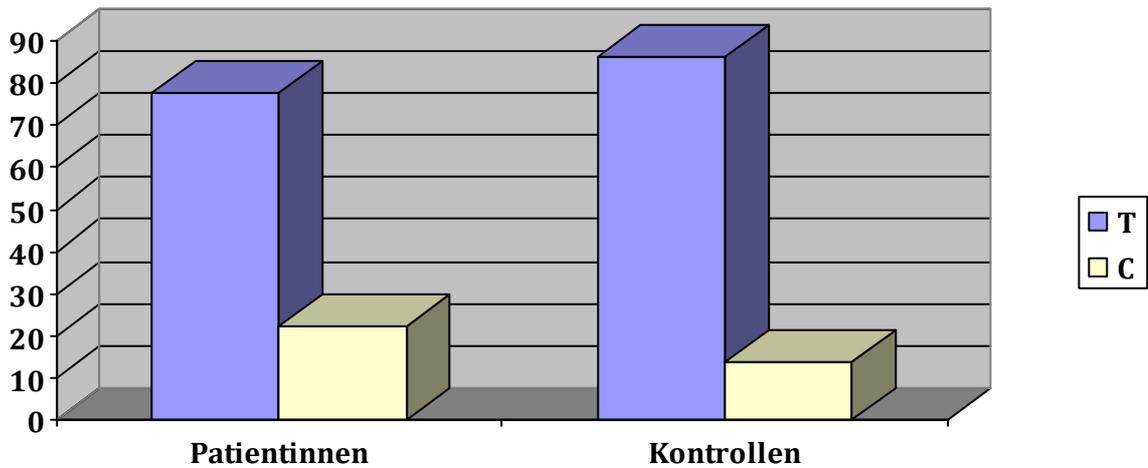
**Tab. 16:** Genotypverteilungen für den Polymorphismus an Position 2437 des *HSP70-hom*-Locus ( $p=0,11$ )

#### 5.4 Typisierung für *RAGE*

Für den Restriktionslängenpolymorphismus an Position -429 des *RAGE*-Locus konnte die Typisierung bei allen 47 Patientinnen sowie bei 183 Kontrollprobandinnen durchgeführt werden.

##### 5.4.1 *RAGE*-Allelfrequenzen

Bei der Analyse der Allelverteilungen für den Polymorphismus an Position -429 des *RAGE*-Locus fiel ein deutlich häufigeres Vorkommen des Wildtypallels T auf: 84,3 % aller Allele, bei Erkrankten und Probandinnen zusammen, entfielen auf das Allel T und nur 15,7 % auf das Allel C. Hinsichtlich der Verteilung in den beiden Gruppen getrennt konnte gezeigt werden, dass sich bei Frauen mit Ovarialkarzinom signifikant öfter das mutierte Allel C findet, nämlich bei 22,3 % im Gegensatz zu nur 13,9 % bei den Gesunden ( $p=0,045$ ). Graphisch dargestellt sieht dies wie folgt aus:



**Abb. 17:** Allelverteilungen für die T>C-Mutation an Position -429 des *RAGE*-Locus ( $p=0,045$ )

#### 5.4.2 *RAGE*-Genotypfrequenzen

Auch die Analyse der Genotypfrequenzen in beiden Kollektiven ergab einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen: Während sich bei 74,3 % der Gesunden ein T/T-homozygoter Genotyp fand und immerhin 2,2 % homozygot für das C-Allel waren, waren bei den Erkrankten nur 55,3 % homozygot für das T-Allel, aber mit 44,7 % fast die Hälfte heterozygot; kein Individuum hatte den Genotyp C/C. Dies zeigt ein deutlich häufigeres Vorkommen des mutierten C-Allels bei Frauen mit Ovarialkarzinom ( $p=0,011$ ).

<b>RAGE -429 Genotyp</b>	<b>Patientinnen (in %)</b>	<b>Kontrollen (in %)</b>
T/T	55,3	74,3
T/C	0,0	23,5
C/C	44,7	2,2

**Tab. 17:** Genotypverteilungen für den Polymorphismus an Position -429 des *RAGE*-Locus ( $p= 0,011$ )

## 6. Diskussion

Das HLA-System des Menschen hat eine entscheidende Bedeutung für die Immunität des Organismus einerseits und die Entstehung von Krankheiten andererseits. Für diverse Erkrankungen autoimmunen Ursprungs konnte ein Zusammenhang zwischen bestimmten Genotypen und einem häufigeren Auftreten der Erkrankung oder aber auch mit einem schwereren Verlauf nachgewiesen werden.

Diese Arbeit befasst sich mit der Frage, inwiefern polymorphe Gene der MHC-Klasse III einen Einfluss als Onkogene auf das Erkranken an einem sporadischen Ovarialkarzinom haben. Hierzu wurden die Allelfrequenzen für die Gene *TNF $\alpha$* , *LT $\alpha$* , *RAGE* sowie *HSP70-2* und *HSP70-hom* von 47 Ovarialkarzinompatientinnen und einem Kontrollkollektiv bestehend aus insgesamt 185 nicht am Ovarialkarzinom erkrankten Frauen bestimmt. Hierzu muss gesagt werden, dass sich unter den Kontrollpersonen größtenteils sehr junge Frauen befanden, bei denen folglich eine spätere Manifestation eines Ovarialkarzinoms nicht ausgeschlossen werden kann. Dies muss bei der Interpretation der Ergebnisse dringend berücksichtigt werden. Zudem gelang, wie im Ergebnisteil für die einzelnen Loci aufgeführt, nicht bei allen der genannten Probanden eine Amplifikation der Allele.

### 6.1 Assoziation des Ovarialkarzinoms mit dem -308 *TNF $\alpha$* -Polymorphismus

Wie in der Einleitung dargestellt, scheint der Tumornekrosefaktor alpha eine wichtige Rolle bei der Entstehung und dem Verlauf verschiedener Krankheiten zu spielen. *TNF $\alpha$*  werden zahlreiche Effekte im menschlichen Organismus zugeordnet. Er hat eine große Bedeutung für das Entstehen eines entzündlichen Geschehens wie beispielsweise eines septischen Schocks (Nawroth und Stern, 1986), (Klebanoff et al., 1986; Shalaby et al., 1985; Tsujimoto et al., 1986), induziert Fieber und führt zu vermindertem Appetit und Kachexie. Auf zellulärer Ebene vermag er den Zelltod präkanzeröser Zellen zu verhindern (Cabrera et al., 1995) und kann als Mutagen zu Veränderungen an der DNA führen (Yan et al., 2006). Somit ist es nachvollziehbar, dass der genetische Locus

dieses Zytokins von vielen Autoren auf einen Zusammenhang mit zahlreichen Erkrankungen untersucht wurde.

In dieser Arbeit beschäftigten wir uns mit dem Polymorphismus an Position -308 in der Promotorregion des *TNF $\alpha$* -Locus. Dieser ist deshalb so interessant, weil das Allel *TNF2* mit einer höheren *TNF $\alpha$* -Produktion assoziiert ist als das Wildtyp-Allel *TNF1* (Abraham et al., 1993; Jacob et al., 1990). In vielen Studien konnte ein Einfluss des veränderten Allels *TNF2* auf bestimmte Autoimmunkrankheiten gezeigt werden, beispielsweise eine Häufung bei Patienten mit Sarkoidose (Sharma et al., 2008) oder M. Crohn (Derkx et al., 1993). Auch bei Patienten mit Asthma korrelierte das Erkrankungsrisiko mit *TNF2* (Kumar et al., 2008; Moffatt und Cookson, 1997), bei Malaria und Leishmaniose war es mit einem schlechteren Outcome vergesellschaftet (McGuire et al., 1994), (Cabrera et al., 1995). Für verschiedene Malignome wurde ebenfalls ein Zusammenhang aufgezeigt. Beispielsweise wiesen Patientinnen mit Ovarialkarzinom höhere *TNF $\alpha$* -Spiegel auf als Gesunde (Gadducci et al., 1995). Solch ein Zusammenhang konnte ebenfalls in einzelnen Studien für das Mammakarzinom nachgewiesen werden (Chouchane et al., 1997; Mestiri et al., 2001; Vidovic, 2008), wobei es andere Studien gab, die dies nicht bestätigen konnten (Azmy et al., 2004; de Jong et al., 2003).

In unserer Analyse wurden ähnliche Verteilungen von *TNF1* und *TNF2* in beiden Kollektiven zusammen ermittelt wie von Allen et al. für ein kaukasisches Normalkollektiv (Azmy et al., 2004; de Jong et al., 2003). Betrachtete man die beiden Untergruppen, Patientinnen und Kontrollprobanden, getrennt voneinander, so zeigte sich keine signifikante Häufung eines bestimmten Risikoallels, d. h. es lässt sich auf Grund unserer Daten kein Zusammenhang zwischen dem Erkrankungsrisiko für ein Ovarialkarzinom und einem bestimmten Genotyp für den Polymorphismus -308 des *TNF $\alpha$* -Locus nachweisen. Wie schon oben erwähnt, ist insbesondere auf Grund des recht kleinen Patientinnenkollektivs die Aussagekraft dieser Ergebnisse begrenzt. Darüber hinaus sind die Ergebnisse anderer Studien zu verschiedenen Karzinomen insgesamt nicht einheitlich, was angesichts der so zahlreichen Funktionen und Wirkungen von *TNF $\alpha$*  im menschlichen Organismus durchaus erklärbar ist.

## 6.2 Assoziation des Ovarialkarzinoms mit dem -252 *LTα*-Polymorphismus

Ähnlich wie bei *TNFα* ist auch der hier untersuchte Polymorphismus des *LTα*-Locus mit einer höheren Produktion des Zytokins assoziiert. Auch was seine Wirkungen im Organismus betrifft, so gibt es viele Ähnlichkeiten zum Tumornekrosefaktor  $\alpha$ , z.B. was die zytotoxische Wirkung betrifft (Nedwin et al., 1985). Passend dazu treten beide oft gemeinsam auf, in Form des von Warzocha et al. definierten *high-risk haplotypes* (Warzocha et al., 1998). *LTα* scheint wichtig für die Entwicklung einer funktionierenden Immunabwehr zu sein und beide Zytokine zusammen spielen, wie bereits in der Einleitung ausführlich dargestellt, eine wichtige Rolle bei der Entstehung und dem Verlauf verschiedenster Erkrankungen, infektiöser und nicht-infektiöser Art. So könnte das Vorliegen einer erhöhten Zytokinproduktion über eine andauernde Aktivierung des Immunsystems einen reduzierten Allgemeinzustand des Patienten zur Folge haben, was wiederum zu einer schlechteren Therapieverträglichkeit und geringerem Therapieerfolg, beispielsweise beim Non-Hodgkin-Lymphom, führen kann. Dies konnten Warzocha et al. sowie andere Autoren in ihren Untersuchungen zeigen (Cordingley et al., 1988; Seidemann et al., 2005).

Für den hier untersuchten Polymorphismus an Position -252 konnte keine statistisch signifikante Häufung eines bestimmten Allels respektive einer bestimmten Allelkombination gezeigt werden, d. h. es lässt sich anhand der erhobenen Daten keine Assoziation zum sporadischen Ovarialkarzinom nachweisen. Auch hier muss klar gesagt werden, dass sicherlich umfangreichere Studien mit entsprechend größeren Fallzahlen notwendig sind, um aussagekräftigere Daten zu erhalten.

## 6.3. Assoziation des Ovarialkarzinoms mit dem 1267 *HSP70-2*- und dem 2437 *HSP70-hom*-Polymorphismus

Die Hitzeschockproteine *HSP70-2* und *HSP70-hom* liegen genomisch eng neben den *TNF*-Loci und ihnen scheint, wie allen in dieser Arbeit untersuchten Genen, neben ihrer protektiven Wirkung auf intrazelluläre Proteine auch eine Rolle bei malignen Geschehen zuzukommen. Hierbei konnten teils antitumoröse, teils aber auch die Tumorentstehung fördernde Einflüsse nachgewiesen werden. So stellten Suto und Srivastava die Hypothese auf, dass Hitzeschockproteine über die Verarbeitung tumorspezifischer

Antigene die Vernichtung der Tumorzellen durch zytotoxische T-Zellen erleichtern (Suto und Srivastava, 1995). Andererseits gibt es Studien, welche eine Abschwächung der Immunantwort gegen krankhaft veränderte Zellen durch *HSP70* zeigten (Ciocca et al., 1993; Davidoff et al., 1992; Gress et al., 1994; Schiaffonati et al., 1991).

Die beiden untersuchten Polymorphismen wurden bereits in anderen Studien im Hinblick auf ihr Vorkommen bei malignen Erkrankungen wie dem Mammakarzinom untersucht, wobei für beide Genloci eine signifikante Häufung der mutierten Allele bei den Erkrankten zu verzeichnen war (Chouchane et al., 1997). Gleiches ergab eine Untersuchung des mutierten *HSP70-2*-Allels bei Patienten mit Nasopharynxkarzinom (Jalbout et al., 2003). Im Gegensatz dazu zeigt diese Arbeit genau Gegenzugliches: Sowohl für den Polymorphismus an Position 1267 des *HSP70-2*-Locus als auch für jenen an Position 2437 des *HSP70-hom*-Locus konnten eine klar signifikante Häufung des nicht mutierten Wildtypallels bei den an einem Ovarialkarzinom erkrankten Frauen gezeigt werden. Somit stützen unsere Ergebnisse nicht die in der Literatur vorherrschenden, lassen sich aber durchaus durch die vorhandenen protektiven Funktionen der Hitzeschockproteine, die oben erläutert wurden, erklären. Somit stehen unsere Ergebnisse nicht im Widerspruch zu denen älterer Studien. Zumal auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden muss, dass sich die Pathophysiologie des Ovarialkarzinoms von der des Mammakarzinoms unterscheidet.

#### **6.4. Assoziation des Ovarialkarzinoms mit dem -429 RAGE-Polymorphismus**

Der Receptor for Advanced Glycosylation End products, kurz *RAGE*, vermittelt, wie eingangs erläutert, insbesondere über eine längerfristige Aktivierung des *NF- $\kappa$ B* oxidativen Stress in der Zelle, welcher bei zahlreichen Erkrankungen wie dem Diabetes mellitus oder dem M. Alzheimer eine entscheidende Rolle spielt. Auch kommt es zu einer vermehrten Freisetzung von *TNF $\alpha$*  mit seinen o.g. Wirkungen. Eine Überexpression von *RAGE* in Tumorzellen scheint zu einer Resistenz gegenüber dem programmierten Zelltod zu führen (Kang et al., 2009), findet sich gehäuft z.B. beim Magenkarzinom und malignen Melanom und ist hier assoziiert mit einer erhöhten metastatischen Aktivität (Kuniyasu et al., 2002) , ((Abe et al., 2004). Im Gegensatz hierzu scheint es andere Gewebe zu geben, in welchen eine erhöhte *RAGE*-Expression

konträr wirkt, so beispielsweise beim Lungenkrebs. Hier fand sich in gesundem Lungengewebe eine deutlich höhere Rezeptordichte als in Karzinomzellen (Schraml et al., 1997). Dieser protektive Effekt konnte sogar durch Re-Induktion von *RAGE* in Tumorzellen erreicht werden (Bartling et al., 2006; Bartling et al., 2005; Kobayashi et al., 2007). Diese Beobachtungen legen nahe, dass es in verschiedenen Geweben unter normalen Umständen unterschiedliche Rezeptordichten zu geben scheint, assoziiert mit entgegengesetzten Wirkungen von *RAGE* (Riehl et al., 2009).

Auf Grund der Eigenschaften von *RAGE* im menschlichen Organismus schien es für uns von großem Interesse, auch für diesen Genlocus einen Polymorphismus zu untersuchen, der wie das *TNF2*-Allel Teil des 8.1. Ancestral Haplotypes ist und der, was zumindest für *sRAGE* bestätigt werden konnte, bei Vorhandensein des mutierten C-Allels mit einem erhöhten Spiegel einhergeht (Kalousova et al., 2007). In unserer Studie mit Ovarialkarzinompatientinnen fiel eine signifikante Häufung des insgesamt selteneren C-Allels bei den Erkrankten auf, welches die Hypothese einer Förderung der Tumorentstehung durch die o.g. Mechanismen stützt. Analog zur Theorie von Riehl et al. könnte man nun mutmaßen, dass im Eierstockgewebe unter normalen Umständen eine niedrige Rezeptordichte vorliegt und diese bei karzinomatösen Veränderungen erhöht ist. *RAGE* hätte also bei dieser Erkrankung tumorfördernde Eigenschaften.

## 6.5. Ausblick

Während wir uns in dieser Arbeit mit dem Vorhandensein MHC-assoziiierter Onkogenen beschäftigten, gibt es darüber hinaus eine Vielzahl anderer Ansätze, das Erkrankungsrisiko des Ovarialkarzinoms beeinflussende Faktoren zu untersuchen. Zum einen ließen sich andere Onkogene identifizieren, die eine Rolle dabei spielen. So wurde beispielsweise eine Überexpression des *c-erbB-2*-Gens (auch *HER2-neu*) auf Chromosom 17, welches für einen Wachstumsfaktorrezeptor codiert, ebenso wie beim Mammakarzinom auch bei bis zu 20 % der Ovarialkarzinome nachgewiesen (Riener et al., 2004, Serrano-Olvera et al., 2006) und auch hier mit einer schlechteren Prognose assoziiert.

Neben Onkogenen gibt es aber auch zahlreiche Tumorsuppressorgene, deren Inaktivierung bzw. Herabregulierung im Zusammenhang mit Ovarialkarzinomen

untersucht wurde. So konnte z.B. eine Inaktivierung des *p53*-Tumorsuppressorgens auf Chromosom 17, welches eine wichtige Rolle für DNA-Stabilität und -Reparatur sowie bei der Apoptose spielt, bei mehr als der Hälfte aller serösen G3-Ovarialkarzinome gefunden werden, was sich immunhistochemisch nachweisen lässt (Singer et al., 2005). Andere sind z.B. *SPARC* auf Chromosom 5, welches eine Funktion bei der Zelladhäsion hat, oder auch *MMAC1* auf Chromosom 10, das wichtig für die Signaltransduktion in der Zelle ist. Durch Methylierung im Promotorbereich dieser Gene kann deren Expression behindert sein, was eine ungehemmte Weitergabe von Wachstumssignalen an den Zellkern ermöglicht. Die Untersuchung solcher herabregulierter Tumorsuppressorgene ist mittels Genexpressionsanalysen möglich, z.B. über die sog. DNA Microarray-Technik, welche die relative Aktivität zuvor identifizierter Zielgene misst (Magic et al., 2007). Hierdurch gelingt es, nicht nur das Vorhandensein eines potentiell mutierten Genlocus nachzuweisen, sondern gleichzeitig seine Aktivität in der Zelle zu quantifizieren. Dies wird ermöglicht durch Isolation der jeweiligen mRNA, die dann in cDNA, d.h. in zur RNA komplementäre DNA, umgeschrieben wird. Die radioaktiv oder per Fluoreszenzfarbstoff markierte cDNA kann dann wiederum mit Sonden des DNA-Arrays hybridisiert und so detektiert werden.

Untersuchungen dieser Art werden somit in Zukunft weit umfassendere Analysen des Erkrankungsrisiko beeinflussender genetischer Faktoren und vielleicht in der Folge auch dringend benötigte, gezieltere Behandlungsmöglichkeiten auf molekulargenetischer Ebene, wie sie bei anderen malignen Tumoren bereits etabliert sind, aufzeigen.

## **7. Zusammenfassung**

Viele Forschungsgruppen haben sich bislang mit dem Einfluss von Genen des HLA-III-Komplexes und ihren verschiedenen zugehörigen Polymorphismen auf die Entstehung und den Verlauf unterschiedlichster Erkrankungen beschäftigt und für viele von ihnen konnte ein Zusammenhang gezeigt werden.

In dieser Arbeit konzentrierten wir uns auf jeweils einen Polymorphismus im Bereich von fünf auf Chromosom 6 lokalisierten Genloci der MHC-Klasse III und eine mögliche Assoziation mit dem Auftreten eines sporadischen Ovarialkarzinoms. So untersuchten

wir polymorphe Loci für Tumornekrosefaktor-alpha, Lymphotoxin-alpha, die Hitzeschockproteine *HSP 70-2* und *HSP 70-hom* sowie den für den Receptor for Advanced Glycosylation End products codierenden Bereich. Hierbei kamen wir zu teils signifikanten, teils nicht signifikanten Unterschieden in den Allel- und Genotypverteilungen bei gesunden Probandinnen und erkrankten Frauen. Insbesondere für *RAGE* zeigte sich eine Assoziation des veränderten, mit einer höheren *sRAGE*-Produktion einhergehenden C-Allels mit dem Ovarialkarzinom, welche die Ergebnisse der oben beschriebenen Studien zu anderen Malignomen wie dem Magenkarzinom und dem Malignen Melanom unterstützt. Insgesamt lassen unsere Ergebnisse zu diesem Zeitpunkt keine grundsätzlichen Aussagen über den Einfluss der betrachteten Genpolymorphismen zu. Als Gründe hierfür lassen sich die insgesamt recht kleine Anzahl an untersuchten Erkrankten sowie die Tatsache anführen, dass nicht bei allen zur Verfügung stehenden DNA-Proben die Amplifikation und/oder der Enzymverdau gelang, insbesondere bei den Proben der erkrankten Frauen. Da unklar ist, welche Allele bei diesen gehäuft vorgekommen wären, ist es durchaus möglich, dass wir zu einem anderen Ergebnis gekommen wären. Auch waren die Frauen in den Kontrollgruppen deutlich jünger, so dass die Möglichkeit einer erst späteren Erkrankung berücksichtigt werden muss. Aber auch unabhängig von diesen äußeren Faktoren kommen Forschergruppen bei den unterschiedlichsten Erkrankungen oft auch zu widersprüchlichen Ergebnissen, was angesichts der so komplexen Effekte der untersuchten Zytokine der MCH-Klasse III nicht weiter überrascht.

Um den Einfluss der untersuchten Polymorphismen genauer einschätzen zu können, bedarf es sicherlich weit größer angelegter Studien, um letztlich nicht nur die Entstehung des sporadischen Ovarialkarzinoms besser verstehen zu können, sondern gegebenenfalls in der Zukunft auch Rückschlüsse für die Diagnostik und Therapie ziehen zu können.

## 8. Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b>	Aufbau des menschlichen MHC auf Chromosom 6 .....	13
<b>Abb. 2:</b>	Schematische Struktur der MHC-Klasse-I- und II-Moleküle (Goldman, 1996).....	16
<b>Abb. 3:</b>	Foto einer Gelelektrophorese nach Amplifikation des <i>TNF1</i> -Locus .....	53
<b>Abb. 4:</b>	Foto einer Gelelektrophorese nach Amplifikation des <i>TNF2</i> -Locus .....	54
<b>Abb. 5:</b>	Foto einer Gelelektrophorese nach Amplifikation des <i>LT<math>\alpha</math></i> -Locus .....	56
<b>Abb. 6:</b>	Gelektrophorese für <i>LT<math>\alpha</math></i> nach Restriktionsenzymverdau mit <i>NcoI</i> .....	57
<b>Abb. 7:</b>	Gelektrophorese nach Amplifikation des <i>HSP70</i> -Locus .....	60
<b>Abb. 8:</b>	Gelektrophorese nach Amplifikation des <i>HSP70-hom</i> -Locus .....	60
<b>Abb. 9:</b>	Gelektrophorese für <i>HSP70</i> nach Restriktionsenzymverdau mit <i>Pst1</i> .....	62
<b>Abb. 10:</b>	Gelektrophorese für <i>HSP70-hom</i> nach Restriktionsenzymverdau mit <i>NcoI</i> ..	63
<b>Abb. 11:</b>	Gelektrophorese nach Amplifikation des <i>RAGE</i> -Locus .....	65
<b>Abb. 12:</b>	Gelektrophorese für <i>RAGE</i> nach Restriktionsenzymverdau mit <i>AluI</i> .....	66
<b>Abb. 13:</b>	Allelfrequenzen für den Polymorphismus an Position -308 in der Promotorregion des <i>TNF<math>\alpha</math></i> -Locus.....	68
<b>Abb. 14:</b>	Allelverteilungen für den Polymorphismus an Position -252 des <i>LT<math>\alpha</math></i> -Locus.....	69
<b>Abb. 15:</b>	Allelverteilungen für den Polymorphismus an Position 1267 des <i>HSP70-2</i> -Locus.....	71

<b>Abb. 16:</b> Allelverteilung für den <i>HSP70-hom</i> -Locus an Position 2437 bei Patientinnen und Kontrollen .....	72
<b>Abb. 17:</b> Allelverteilungen für die T>C-Mutation an Position 429 des <i>RAGE</i> -Locus .....	74

## 9. Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1:</b>	Primer zur Amplifikation der Allele <i>TNF1</i> und <i>TNF2</i> des <i>TNF<math>\alpha</math></i> Polymorphismus auf Position -308 (nach Chouchane et al.,1997).....	51
<b>Tab. 2:</b>	Ansatz für die Amplifikation des <i>TNF<math>\alpha</math></i> -Locus .....	52
<b>Tab. 3:</b>	Primer zur Amplifikation des <i>LT<math>\alpha</math></i> -Locus (nach Warzocha et al., 1998), Konzentration 100 pmol/.....	55
<b>Tab. 4:</b>	Ansatz für die Amplifikation des <i>LT<math>\alpha</math></i> -Locus .....	55
<b>Tab. 5:</b>	Ansatz für den Enzymverdau von <i>LT<math>\alpha</math></i> pro DNA-Probe .....	57
<b>Tab. 6:</b>	Primer zur Amplifikation der <i>HSP70</i> -Loci <i>HSP70-2</i> und <i>-hom</i> (nach Chouchane et al. 1997).....	58
<b>Tab. 7:</b>	PCR-Ansätze für <i>HSP70-2</i> und <i>HSP70-hom</i> .....	59
<b>Tab. 8:</b>	Ansatz für den Enzymverdau von <i>HSP70-2</i> mit PstI pro DNA-Probe .....	61
<b>Tab. 9:</b>	Ansatz für den Enzymverdau von <i>HSP70-hom</i> mit NcoI pro DNA-Probe ....	61
<b>Tab. 10:</b>	Primer zur Amplifikation des <i>RAGE</i> -Locus (nach Hudson et al., 2001) .....	64
<b>Tab. 11:</b>	PCR-Ansätze für <i>RAGE</i> .....	64
<b>Tab. 12:</b>	Ansatz für den Enzymverdau von <i>RAGE</i> pro DNA-Probe .....	65
<b>Tab. 13:</b>	Genotypverteilungen für den Polymorphismus an Position -308 in der Promotorregion des <i>TNF<math>\alpha</math></i> - Locus .....	68
<b>Tab. 14:</b>	Genotypverteilungen für den Polymorphismus an Position -252 des <i>LT<math>\alpha</math></i> -Locus.....	70

<b>Tab. 15:</b> Genotypverteilungen für den Polymorphismus an Position 1267 des <i>HSP70-2-Locus</i> .....	71
<b>Tab. 16:</b> Genotypverteilungen für den Polymorphismus an Position 2437 des <i>HSP70-2-Locus</i> .....	73
<b>Tab. 17:</b> Genotypverteilungen für den Polymorphismus an Position -429 des <i>RAGE-Locus</i> .....	74

## 10. Literaturverzeichnis

Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, Jarvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993; 260: 812-816

Aarnio M, Sankila R, Pukkala E, Salovaara R, Aaltonen LA, de la Chapelle A, Peltomaki P, Mecklin JP, Jarvinen HJ. Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes. *Int J Cancer* 1999; 81: 214-218

Abd el All H, Rey A, Duvillard P. Expression of heat shock protein 70 and c-myc in cervical carcinoma. *Anticancer Res* 1998; 18: 1533-1536

Abe R, Shimizu T, Sugawara H, Watanabe H, Nakamura H, Choei H, Sasaki N, Yamagishi S, Takeuchi M, Shimizu H. Regulation of human melanoma growth and metastasis by AGE-AGE receptor interactions. *J Invest Dermatol* 2004; 122: 461-467

Abraham LJ, French MA, Dawkins RL. Polymorphic MHC ancestral haplotypes affect the activity of tumour necrosis factor-alpha. *Clin Exp Immunol* 1993; 92: 14-18

Aderka D, Novick D, Hahn T, Fischer DG, Wallach D. Increase of vulnerability to lymphotoxin in cells infected by vesicular stomatitis virus and its further augmentation by interferon. *Cell Immunol* 1985; 92: 218-225

Aggarwal BB, Eessalu TE, Hass PE. Characterization of receptors for human tumour necrosis factor and their regulation by gamma-interferon. *Nature* 1985; 318: 665-667

Aissani B, Ogwaro KM, Shrestha S, Tang J, Breen EC, Wong HL, Jacobson LP, Rabkin CS, Ambinder RF, Martinez-Maza O, Kaslow RA. The major histocompatibility complex conserved extended haplotype 8.1 in AIDS-related non-Hodgkin lymphoma. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2009; 52: 170-179

Allen MH, Wakelin SH, Holloway D, Lisby S, Baadsgaard O, Barker JN, McFadden JP. Association of TNFA gene polymorphism at position -308 with susceptibility to irritant contact dermatitis. *Immunogenetics* 2000; 51: 201-205

Arnott CH, Scott KA, Moore RJ, Hewer A, Phillips DH, Parker P, Balkwill FR, Owens DM. Tumour necrosis factor-alpha mediates tumour promotion via a PKC alpha- and AP-1-dependent pathway. *Oncogene* 2002; 21: 4728-4738

Azmy IA, Balasubramanian SP, Wilson AG, Stephenson TJ, Cox A, Brown NJ, Reed MW. Role of tumour necrosis factor gene polymorphisms (-308 and -238) in breast cancer susceptibility and severity. *Breast Cancer Res* 2004; 6: R395-400

Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997; 336: 1066-1071

Bartling B, Demling N, Silber RE, Simm A. Proliferative stimulus of lung fibroblasts on lung cancer cells is impaired by the receptor for advanced glycation end-products. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 34: 83-91

Bartling B, Hofmann HS, Weigle B, Silber RE, Simm A. Down-regulation of the receptor for advanced glycation end-products (RAGE) supports non-small cell lung carcinoma. *Carcinogenesis* 2005; 26: 293-301

Bast RC, Jr., Klug TL, St John E, Jenison E, Niloff JM, Lazarus H, Berkowitz RS, Leavitt T, Griffiths CT, Parker L, Zurawski VR, Jr., Knapp RC. A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 1983; 309: 883-887

Basta G. Receptor for advanced glycation endproducts and atherosclerosis: From basic mechanisms to clinical implications. *Atherosclerosis* 2008; 196: 9-21

Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991; 40: 405-412

Bendtsen K, Morling N, Fomsgaard A, Svenson M, Jakobsen B, Odum N, Svejgaard A. Association between HLA-DR2 and production of tumour necrosis factor alpha and interleukin 1 by mononuclear cells activated by lipopolysaccharide. *Scand J Immunol* 1988; 28: 599-606

Berchuck A, Kamel A, Whitaker R, Kerns B, Olt G, Kinney R, Soper JT, Dodge R, Clarke-Pearson DL, Marks P. Overexpression of HER-2/neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 1990; 50: 4087-4091

Beutler B, Cerami A. The biology of cachectin/TNF--a primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol* 1989; 7: 625-655

Bewtra C, Watson P, Conway T, Read-Hippee C, Lynch HT. Hereditary ovarian cancer: a clinicopathological study. *Int J Gynecol Pathol* 1992; 11: 180-187

Bierhaus A, Hofmann MA, Ziegler R, Nawroth PP. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. *Cardiovasc Res* 1998; 37: 586-600

Bierhaus A, Illmer T, Kasper M, Luther T, Quehenberger P, Tritschler H, Wahl P, Ziegler R, Muller M, Nawroth PP. Advanced glycation end product (AGE)-mediated induction of tissue factor in cultured endothelial cells is dependent on RAGE. *Circulation* 1997; 96: 2262-2271

Bierhaus A, Schiekofer S, Schwaninger M, Andrassy M, Humpert PM, Chen J, Hong M, Luther T, Henle T, Kloting I, Morcos M, Hofmann M, Tritschler H, Weigle B, Kasper M, Smith M, Perry G, Schmidt AM, Stern DM, Haring HU, Schleicher E, Nawroth PP. Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB. *Diabetes* 2001; 50: 2792-2808

Bierhaus A, Zhang Y, Deng Y, Mackman N, Quehenberger P, Haase M, Luther T, Muller M, Bohrer H, Greten J. Mechanism of the tumor necrosis factor alpha-mediated induction of endothelial tissue factor. *J Biol Chem* 1995; 270: 26419-26432

Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 1987; 329: 506-512

Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 1997; 385: 729-733

Bonay M, Soler P, Riquet M, Battesti JP, Hance AJ, Tazi A. Expression of heat shock proteins in human lung and lung cancers. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994; 10: 453-461

Bonnycastle LL, Yu CE, Hunt CR, Trask BJ, Clancy KP, Weber JL, Patterson D, Schellenberg GD. Cloning, sequencing, and mapping of the human chromosome 14 heat shock protein gene (HSPA2). *Genomics* 1994; 23: 85-93

Boyd J, Rubin SC. Hereditary ovarian cancer: molecular genetics and clinical implications. *Gynecol Oncol* 1997; 64: 196-206

Brand K, Page S, Rogler G, Bartsch A, Brandl R, Knuechel R, Page M, Kaltschmidt C, Baeuerle PA, Neumeier D. Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. *J Clin Invest* 1996; 97: 1715-1722

Brett J, Schmidt AM, Yan SD, Zou YS, Weidman E, Pinsky D, Nowygrad R, Neeper M, Przysiecki C, Shaw A. Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. *Am J Pathol* 1993; 143: 1699-1712

Brewerton DA, Hart FD, Nicholls A, Caffrey M, James DC, Sturrock RD. Ankylosing spondylitis and HL-A 27. *Lancet* 1973; 1: 904-907

Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe MK, Kane M, Earabino C, Lipford J, Lindblom A. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* 1994; 368: 258-261

Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 1993; 364: 33-39

Browning JL, Ngam-ek A, Lawton P, DeMarinis J, Tizard R, Chow EP, Hession C, O'Brine-Greco B, Foley SF, Ware CF. Lymphotoxin beta, a novel member of the TNF family that forms a heteromeric complex with lymphotoxin on the cell surface. *Cell* 1993; 72: 847-856

Brownlee M. Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annu Rev Med* 1995; 46: 223-234

Brownlee M. Lilly Lecture 1993. Glycation and diabetic complications. *Diabetes* 1994; 43: 836-841

Brun JL, Feyler A, Chene G, Saurel J, Brun G, Hocke C. Long-term results and prognostic factors in patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2000; 78: 21-27

Burmester GR, Beck P, Eife R, Peter HH, Kalden JR. Induction of a lymphotoxin-like mediator in peripheral blood and synovial fluid lymphocytes by incubation with synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 1981; 1: 139-143

Cabrera M, Shaw MA, Sharples C, Williams H, Castes M, Convit J, Blackwell JM. Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. *J Exp Med* 1995; 182: 1259-1264

Candore G, Lio D, Colonna Romano G, Caruso C. Pathogenesis of autoimmune diseases associated with 8.1 ancestral haplotype: effect of multiple gene interactions. *Autoimmun Rev* 2002; 1: 29-35

Carroll MC, Campbell RD, Bentley DR, Porter RR. A molecular map of the human major histocompatibility complex class III region linking complement genes C4, C2 and factor B. *Nature* 1984; 307: 237-241

Carroll MC, Campbell RD, Porter RR. Mapping of steroid 21-hydroxylase genes adjacent to complement component C4 genes in HLA, the major histocompatibility complex in man. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82: 521-525

Carroll MC, Katzman P, Alicot EM, Koller BH, Geraghty DE, Orr HT, Strominger JL, Spies T. Linkage map of the human major histocompatibility complex including the tumor necrosis factor genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 8535-8539

Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975; 72: 3666-3670

Caruso C, Candore G, Colonna Romano G, Lio D, Bonafe M, Valensin S, Franceschi C. HLA, aging, and longevity: a critical reappraisal. *Hum Immunol* 2000; 61: 942-949

Ceppellini R, Curtioni ES, Mattiuz PL, Miggiano V, Scudeller G, Serra A. Genetics of leucocyte antigens. A family study of segregation and linkage. *Histocompatibility Testing* 1967: 149-185

Chaudhuri S, Cariappa A, Tang M, Bell D, Haber DA, Isselbacher KJ, Finkelstein D, Forcione D, Pillai S. Genetic susceptibility to breast cancer: HLA DQB\*03032 and HLA DRB1\*11 may represent protective alleles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 11451-11454

Chen G, Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 2002; 296: 1634-1635

Chien A, Edgar DB, Trela JM. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol* 1976; 127: 1550-1557

Chouchane L, Ahmed SB, Baccouche S, Remadi S. Polymorphism in the tumor necrosis factor-alpha promotor region and in the heat shock protein 70 genes associated with malignant tumors. *Cancer* 1997; 80: 1489-1496

Ciocca DR, Clark GM, Tandon AK, Fuqua SA, Welch WJ, McGuire WL. Heat shock protein hsp70 in patients with axillary lymph node-negative breast cancer: prognostic implications. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 570-574

Collins T. Endothelial nuclear factor-kappa B and the initiation of the atherosclerotic lesion. *Lab Invest* 1993; 68: 499-508

Cordingley FT, Bianchi A, Hoffbrand AV, Reittie JE, Heslop HE, Vyakarnam A, Turner M, Meager A, Brenner MK. Tumour necrosis factor as an autocrine tumour growth factor for chronic B-cell malignancies. *Lancet* 1988; 1: 969-971

Cramer DW, Welch WR. Determinants of ovarian cancer risk. II. Inferences regarding pathogenesis. *J Natl Cancer Inst* 1983; 71: 717-721

Crawford SM, Peace J. Does the nadir CA125 concentration predict a long-term outcome after chemotherapy for carcinoma of the ovary? *Ann Oncol* 2005; 16: 47-50

Crowe PD, VanArsdale TL, Walter BN, Ware CF, Hession C, Ehrenfels B, Browning JL, Din WS, Goodwin RG, Smith CA. A lymphotoxin-beta-specific receptor. *Science* 1994; 264: 707-710

Cuatrecasas M, Villanueva A, Matias-Guiu X, Prat J. K-ras mutations in mucinous ovarian tumors: a clinicopathologic and molecular study of 95 cases. *Cancer* 1997; 79: 1581-1586

- D'Alfonso S, Richiardi PM. A polymorphic variation in a putative regulation box of the TNFA promoter region. *Immunogenetics* 1994; 39: 150-154
- Daugaard M, Kirkegaard-Sorensen T, Ostenfeld MS, Aaboe M, Hoyer-Hansen M, Orntoft TF, Rohde M, Jaattela M. Lens epithelium-derived growth factor is an Hsp70-2 regulated guardian of lysosomal stability in human cancer. *Cancer Res* 2007a; 67: 2559-2567
- Daugaard M, Rohde M, Jaattela M. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett* 2007b; 581: 3702-3710
- Dausset J. [Iso-leuko-antibodies.]. *Acta Haematol* 1958; 20: 156-166
- Davidoff AM, Iglehart JD, Marks JR. Immune response to p53 is dependent upon p53/HSP70 complexes in breast cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 3439-3442
- Davis MM, Bjorkman PJ. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 1988; 334: 395-402
- Dawkins RL, Christiansen FT, Kay PH, Garlepp M, McCluskey J, Hollingsworth PN, Zilko PJ. Disease associations with complotypes, supratypes and haplotypes. *Immunol Rev* 1983; 70: 1-22
- de Jong MM, Nolte IM, de Vries EG, Schaapveld M, Kleibeuker JH, Oosterom E, Oosterwijk JC, van der Hout AH, van der Steege G, Bruinenberg M, Boezen HM, Te Meerman GJ, van der Graaf WT. The HLA class III subregion is responsible for an increased breast cancer risk. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 2311-2319
- Deane R, Du Yan S, Submmaryan RK, LaRue B, Jovanovic S, Hogg E, Welch D, Manness L, Lin C, Yu J, Zhu H, Ghiso J, Frangione B, Stern A, Schmidt AM, Armstrong DL, Arnold B, Liliensiek B, Nawroth P, Hofman F, Kindy M, Stern D, Zlokovic B. RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nat Med* 2003; 9: 907-913
- Delort L, Kwiatkowski F, Chalabi N, Satih S, Bignon YJ, Bernard-Gallon DJ. Central adiposity as a major risk factor of ovarian cancer. *Anticancer Res* 2009; 29: 5229-5234
- Demeter J, Porzsolt F, Ramisch S, Schmidt D, Schmid M, Messer G. Polymorphism of the tumour necrosis factor-alpha and lymphotoxin-alpha genes in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1997; 97: 107-112
- Derx B, Taminiau J, Radema S, Stronkhorst A, Wortel C, Tytgat G, van Deventer S. Tumour-necrosis-factor antibody treatment in Crohn's disease. *Lancet* 1993; 342: 173-174

Di Giovine FS, Nuki G, Duff GW. Tumour necrosis factor in synovial exudates. *Ann Rheum Dis* 1988; 47: 768-772

Dorak MT, Shao W, Machulla HK, Lobashevsky ES, Tang J, Park MH, Kaslow RA. Conserved extended haplotypes of the major histocompatibility complex: further characterization. *Genes Immun*. 2006; 7: 450-67

Duarte I, Santos A, Sousa H, Catarino R, Pinto D, Matos A, Pereira D, Moutinho J, Canedo P, Machado JC, Medeiros R. G-308A TNF-alpha polymorphism is associated with an increased risk of invasive cervical cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 334: 588-592

Dunham I, Sargent CA, Trowsdale J, Campbell RD. Molecular mapping of the human major histocompatibility complex by pulsed-field gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 7237-7241

Dunlop MG, Farrington SM, Carothers AD, Wyllie AH, Sharp L, Burn J, Liu B, Kinzler KW, Vogelstein B. Cancer risk associated with germline DNA mismatch repair gene mutations. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 105-110

Dzaman-Serafin S, Telatynska-Mieszek B, Ciechanowski K. Heat shock proteins and their characteristics. *Pol Merkur Lekarski* 2005; 19: 215-219

Easton DF, Ford D, Bishop DT. Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 265-271

Engelen L, Ferreira I, Gaens KH, Henry RM, Dekker JM, Nijpels G, Heine RJ, t Hart LM, van Greevenbroek MM, van der Kallen CJ, Blaak EE, Feskens EJ, Ten Cate H, Stehouwer CD, Schalkwijk CG. The association between the -374T/A polymorphism of the receptor for advanced glycation endproducts gene and blood pressure and arterial stiffness is modified by glucose metabolism status: the Hoorn and CoDAM studies. *J Hypertens* 2010; 28: 285-293

Enomoto T, Weghorst CM, Inoue M, Tanizawa O, Rice JM. K-ras activation occurs frequently in mucinous adenocarcinomas and rarely in other common epithelial tumors of the human ovary. *Am J Pathol* 1991; 139: 777-785

Esparza I, Mannel D, Ruppel A, Falk W, Krammer PH. Interferon gamma and lymphotoxin or tumor necrosis factor act synergistically to induce macrophage killing of tumor cells and schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *J Exp Med* 1987; 166: 589-594

Falcone C, Campo I, Emanuele E, Buzzi MP, Geroldi D, Belvito C, Zorzetto M, Sbarsi I, Cuccia M. -374T/A polymorphism of the RAGE gene promoter in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 2005a; 354: 111-116

Falcone C, Campo I, Emanuele E, Buzzi MP, Zorzetto M, Sbarsi I, Cuccia M. Relationship between the -374T/A RAGE gene polymorphism and angiographic coronary artery disease. *Int J Mol Med* 2004; 14: 1061-1064

Falcone C, Emanuele E, D'Angelo A, Buzzi MP, Belvito C, Cuccia M, Geroldi D. Plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products and coronary artery disease in nondiabetic men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005b; 25: 1032-1037

Fathalla MF. Incessant ovulation - a factor in ovarian neoplasia? *Lancet* 1971; 2: 163

Fathallah DM, Cherif D, Dellagi K, Arnaout MA. Molecular cloning of a novel human hsp70 from a B cell line and its assignment to chromosome 5. *J Immunol* 1993; 151: 810-813

Favatier F, Bornman L, Hightower LE, Gunther E, Polla BS. Variation in hsp gene expression and Hsp polymorphism: do they contribute to differential disease susceptibility and stress tolerance? *Cell Stress Chaperones* 1997; 2: 141-155

Fishel R, Ewel A, Lee S, Lescoe MK, Griffith J. Binding of mismatched microsatellite DNA sequences by the human MSH2 protein. *Science* 1994; 266: 1403-1405

Foster KA, Harrington P, Kerr J, Russell P, DiCioccio RA, Scott IV, Jacobs I, Chenevix-Trench G, Ponder BA, Gayther SA. Somatic and germline mutations of the BRCA2 gene in sporadic ovarian cancer. *Cancer Res* 1996; 56: 3622-3625

Frank TS, Bartos RE, Haefner HK, Roberts JA, Wilson MD, Hubbell GP. Loss of heterozygosity and overexpression of the p53 gene in ovarian carcinoma. *Mod Pathol* 1994; 7: 3-8

Fu YX, Chaplin DD. Development and maturation of secondary lymphoid tissues. *Annu Rev Immunol* 1999; 17: 399-433

Fugger L, Morling N, Ryder LP, Platz P, Georgsen J, Jakobsen BK, Svejgaard A, Dalhoff K, Ranek L. NcoI restriction fragment length polymorphism (RFLP) of the tumour necrosis factor (TNF alpha) region in primary biliary cirrhosis and in healthy Danes. *Scand J Immunol* 1989; 30: 185-189

Gadducci A, Ferdeghini M, Castellani C, Annicchiarico C, Gagetti O, Prontera C, Bianchi R, Facchini V. Serum levels of tumor necrosis factor (TNF), soluble receptors for TNF (55- and 75-kDa sTNFr), and soluble CD14 (sCD14) in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1995; 58: 184-188

Gaur U, Aggarwal BB. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochem Pharmacol* 2003; 66: 1403-1408

Geroldi D, Falcone C, Emanuele E, D'Angelo A, Calcagnino M, Buzzi MP, Scioli GA, Fogari R. Decreased plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end-products in patients with essential hypertension. *J Hypertens* 2005; 23: 1725-1729

Ghaderi A, Talei A, Gharesi-Fard B, Farjadian SH, Amirzargar A, Vasei M. HLA-DBR 1 alleles and the susceptibility of Iranian patients with breast cancer. *Pathol Oncol Res* 2001; 7: 39-41

Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 1996; 19: 257-267

Globocnik Petrovic M, Steblovnik K, Peterlin B, Petrovic D. The - 429 T/C and - 374 T/A gene polymorphisms of the receptor of advanced glycation end products gene are not risk factors for diabetic retinopathy in Caucasians with type 2 diabetes. *Klin Monbl Augenheilkd* 2003; 220: 873-876

Goate AM, Cooper DN, Hall C, Leung TK, Solomon E, Lim L. Localization of a human heat-shock HSP 70 gene sequence to chromosome 6 and detection of two other loci by somatic-cell hybrid and restriction fragment length polymorphism analysis. *Hum Genet* 1987; 75: 123-128

Goldman AS, Prabhakar BS. Bacteriology, Immunology Overview. In: Baron S, ed. *Medical Microbiology*. Texas, 1996:

Goova MT, Li J, Kislinger T, Qu W, Lu Y, Bucciarelli LG, Nowygrad S, Wolf BM, Caliste X, Yan SF, Stern DM, Schmidt AM. Blockade of receptor for advanced glycation end-products restores effective wound healing in diabetic mice. *Am J Pathol* 2001; 159: 513-525

Gorer P. The detection of antigenic differences in mouse erythrocytes by the employment of immune sera. *Br J Exp Pathol* 1936; 17: 42-50

Gray PW, Aggarwal BB, Benton CV, Bringman TS, Henzel WJ, Jarrett JA, Leung DW, Moffat B, Ng P, Svedersky LP. Cloning and expression of cDNA for human lymphotoxin, a lymphokine with tumour necrosis activity. *Nature* 1984; 312: 721-724

Gray PW, Leung DW, Pennica D, Yelverton E, Najarian R, Simonsen CC, Derynck R, Sherwood PJ, Wallace DM, Berger SL, Levinson AD, Goeddel DV. Expression of human immune interferon cDNA in *E. coli* and monkey cells. *Nature* 1982; 295: 503-508

Greene MH, Clark JW, Blayney DW. The epidemiology of ovarian cancer. *Semin Oncol* 1984; 11: 209-226

Gress TM, Muller-Pillasch F, Weber C, Lerch MM, Friess H, Buchler M, Beger HG, Adler G. Differential expression of heat shock proteins in pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 1994; 54: 547-551

Hanford LE, Enghild JJ, Valnickova Z, Petersen SV, Schaefer LM, Schaefer TM, Reinhart TA, Oury TD. Purification and characterization of mouse soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE). *J Biol Chem* 2004; 279: 50019-50024

Harrison GS, Drabkin HA, Kao FT, Hartz J, Hart IM, Chu EH, Wu BJ, Morimoto RI. Chromosomal location of human genes encoding major heat-shock protein HSP70. *Somat Cell Mol Genet* 1987; 13: 119-130

Hendershot LM, Valentine VA, Lee AS, Morris SW, Shapiro DN. Localization of the gene encoding human BiP/GRP78, the endoplasmic reticulum cognate of the HSP70 family, to chromosome 9q34. *Genomics* 1994; 20: 281-284

Herold G. *Innere Medizin*. Köln, 2010

Hicklin DJ, Marincola FM, Ferrone S. HLA class I antigen downregulation in human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story. *Mol Med Today* 1999; 5: 178-186

Hofmann MA, Drury S, Fu C, Qu W, Taguchi A, Lu Y, Avila C, Kambham N, Bierhaus A, Nawroth P, Neurath MF, Slattery T, Beach D, McClary J, Nagashima M, Morser J, Stern D, Schmidt AM. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* 1999a; 97: 889-901

Hofmann MA, Schiekofer S, Isermann B, Kanitz M, Henkels M, Joswig M, Treusch A, Morcos M, Weiss T, Borcea V, Abdel Khalek AK, Amiral J, Tritschler H, Ritz E, Wahl P, Ziegler R, Bierhaus A, Nawroth PP. Peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with diabetic nephropathy show increased activation of the oxidative-stress sensitive transcription factor NF-kappaB. *Diabetologia* 1999b; 42: 222-232

Holzinger I, de Baey A, Messer G, Kick G, Zwierzina H, Weiss EH. Cloning and genomic characterization of LST1: a new gene in the human TNF region. *Immunogenetics* 1995; 42: 315-322

Hori O, Brett J, Slattery T, Cao R, Zhang J, Chen JX, Nagashima M, Lundh ER, Vijay S, Nitecki D. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphoterin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of rage and amphoterin in the developing nervous system. *J Biol Chem* 1995; 270: 25752-25761

Horner MJ RL, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Howlander N, Altekruse SF, Feuer EJ, Huang L, Mariotto A, Miller BA, Lewis DR, Eisner MP, Stinchcomb DG, Edwards BK (eds). *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2006*. In: National Cancer Institute. Bethesda M, ed., 2009:

Horton R, Wilming L, Rand V, Lovering RC, Bruford EA, Khodiyar VK, Lush MJ, Povey S, Talbot CC, Jr., Wright MW, Wain HM, Trowsdale J, Ziegler A, Beck S. Gene map of the extended human MHC. *Nat Rev Genet* 2004; 5: 889-899

Hoskins WJ, Bundy BN, Thigpen JT, Omura GA. The influence of cytoreductive surgery on recurrence-free interval and survival in small-volume stage III epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 1992; 47: 159-166

Hudson BI, Stickland MH, Futers TS, Grant PJ. Effects of novel polymorphisms in the RAGE gene on transcriptional regulation and their association with diabetic retinopathy. *Diabetes* 2001; 50: 1505-1511

Hudson BI, Stickland MH, Grant PJ. Identification of polymorphisms in the receptor for advanced glycation end products (RAGE) gene: prevalence in type 2 diabetes and ethnic groups. *Diabetes* 1998; 47: 1155-1157

Hunt C, Morimoto RI. Conserved features of eukaryotic hsp70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp70. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82: 6455-6459

Huttunen HJ, Fages C, Rauvala H. Receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated neurite outgrowth and activation of NF-kappaB require the cytoplasmic domain of the receptor but different downstream signaling pathways. *J Biol Chem* 1999; 274: 19919-19924

Isomoto H, Oka M, Yano Y, Kanazawa Y, Soda H, Terada R, Yasutake T, Nakayama T, Shikuwa S, Takeshima F, Uono H, Murata I, Ohtsuka K, Kohno S. Expression of heat shock protein (Hsp) 70 and Hsp 40 in gastric cancer. *Cancer Lett* 2003; 198: 219-228

Jaattela M. Overexpression of major heat shock protein hsp70 inhibits tumor necrosis factor-induced activation of phospholipase A2. *J Immunol* 1993; 151: 4286-4294

Jaattela M, Wissing D. Heat-shock proteins protect cells from monocyte cytotoxicity: possible mechanism of self-protection. *J Exp Med* 1993; 177: 231-236

Jacob CO. Tumor necrosis factor alpha in autoimmunity: pretty girl or old witch? *Immunol Today* 1992; 13: 122-125

Jacob CO, Fronck Z, Lewis GD, Koo M, Hansen JA, McDevitt HO. Heritable major histocompatibility complex class II-associated differences in production of tumor necrosis factor alpha: relevance to genetic predisposition to systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 1233-1237

Jacobs I, Davies AP, Bridges J, Stabile I, Fay T, Lower A, Grudzinskas JG, Oram D. Prevalence screening for ovarian cancer in postmenopausal women by CA 125 measurement and ultrasonography. *BMJ* 1993; 306: 1030-1034

Jalbout M, Bouaouina N, Gargouri J, Corbex M, Ben Ahmed S, Chouchane L. Polymorphism of the stress protein HSP70-2 gene is associated with the susceptibility to the nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Lett* 2003; 193: 75-81

Kalousova M, Hodkova M, Kazderova M, Fialova J, Tesar V, Dusilova-Sulkova S, Zima T. Soluble receptor for advanced glycation end products in patients with decreased renal function. *Am J Kidney Dis* 2006; 47: 406-411

Kalousova M, Jachymova M, Mestek O, Hodkova M, Kazderova M, Tesar V, Zima T. Receptor for advanced glycation end products--soluble form and gene polymorphisms in chronic haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22: 2020-2026

Kang R, Tang D, Schapiro NE, Livesey KM, Farkas A, Loughran P, Bierhaus A, Lotze MT, Zeh HJ. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) sustains autophagy and limits apoptosis, promoting pancreatic tumor cell survival. *Cell Death Differ* 2009:

Kankova K, Marova I, Zahejsky J, Muzik J, Stejskalova A, Znojil V, Vacha J. Polymorphisms 1704G/T and 2184A/G in the RAGE gene are associated with antioxidant status. *Metabolism* 2001; 50: 1152-1160

Kankova K, Stejskalova A, Hertlova M, Znojil V. Haplotype analysis of the RAGE gene: identification of a haplotype marker for diabetic nephropathy in type 2 diabetes mellitus. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20: 1093-1102

Kapitany A, Zilahi E, Szanto S, Szucs G, Szabo Z, Vegvari A, Rass P, Sipka S, Szegedi G, Szekanecz Z. Association of rheumatoid arthritis with HLA-DR1 and HLA-DR4 in Hungary. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1051: 263-270

Katakami N, Matsuhisa M, Kaneto H, Matsuoka TA, Sakamoto K, Nakatani Y, Ohtoshi K, Hayaishi-Okano R, Kosugi K, Hori M, Yamasaki Y. Decreased endogenous secretory advanced glycation end product receptor in type 1 diabetic patients: its possible association with diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 2005; 28: 2716-2721

Kawakami M, Cerami A. Studies of endotoxin-induced decrease in lipoprotein lipase activity. *J Exp Med* 1981; 154: 631-639

Kazmierczuk A, Kilianska ZM. The pleiotropic activity of heat-shock proteins. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2009; 63: 502-521

Khan MA, Mathieu A, Sorrentino R, Akkoc N. The pathogenetic role of HLA-B27 and its subtypes. *Autoimmun Rev* 2007; 6: 183-189

Kiechle M. *Gynäkologie und Geburtshilfe*. 2007: 541-546

Kim TM, Benedict WF, Xu HJ, Hu SX, Gosewehr J, Velicescu M, Yin E, Zheng J, D'Ablaing G, Dubeau L. Loss of heterozygosity on chromosome 13 is common only in the biologically more aggressive subtypes of ovarian epithelial tumors and is associated with normal retinoblastoma gene expression. *Cancer Res* 1994; 54: 605-609

Kirchwegger R, Zeillinger R, Schneeberger C, Speiser P, Louason G, Theillet C. Patterns of allele losses suggest the existence of five distinct regions of LOH on chromosome 17 in breast cancer. *Int J Cancer* 1994; 56: 193-199

- Kislinger T, Fu C, Huber B, Qu W, Taguchi A, Du Yan S, Hofmann M, Yan SF, Pischetsrieder M, Stern D, Schmidt AM. N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression. *J Biol Chem* 1999; 274: 31740-31749
- Klebanoff SJ, Vadas MA, Harlan JM, Sparks LH, Gamble JR, Agosti JM, Waltersdorff AM. Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor. *J Immunol* 1986; 136: 4220-4225
- Klein J, Sato A. The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med* 2000; 343: 702-709
- Kobayashi D, Watanabe N, Yamauchi N, Tsuji N, Sato T, Niitsu Y. Endogenous tumor necrosis factor as a predictor of doxorubicin sensitivity in leukemic patients. *Blood* 1997; 89: 2472-2479
- Kobayashi S, Kubo H, Suzuki T, Ishizawa K, Yamada M, He M, Yamamoto Y, Yamamoto H, Sasano H, Sasaki H, Suzuki S. Endogenous secretory receptor for advanced glycation end products in non-small cell lung carcinoma. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: 184-189
- Koss K, Satsangi J, Fanning GC, Welsh KI, Jewell DP. Cytokine (TNF alpha, LT alpha and IL-10) polymorphisms in inflammatory bowel diseases and normal controls: differential effects on production and allele frequencies. *Genes Immun* 2000; 1: 185-190
- Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, Lu SD. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* 1988; 53: 45-53
- Kubler K, Arndt PF, Wardelmann E, Landwehr C, Krebs D, Kuhn W, van der Ven K. Genetic alterations of HLA-class II in ovarian cancer. *Int J Cancer* 2008; 123: 1350-1356
- Kumar A, Gupta V, Changotra H, Sarin BC, Sehajpal PK. Tumor necrosis factor--alpha and transforming growth factor--beta1 polymorphisms in bronchial asthma. *Indian J Med Sci* 2008; 62: 323-330
- Kuniyasu H, Oue N, Wakikawa A, Shigeishi H, Matsutani N, Kuraoka K, Ito R, Yokozaki H, Yasui W. Expression of receptors for advanced glycation end-products (RAGE) is closely associated with the invasive and metastatic activity of gastric cancer. *J Pathol* 2002; 196: 163-170
- Kupryjanczyk J, Bell DA, Yandell DW, Scully RE, Thor AD. p53 expression in ovarian borderline tumors and stage I carcinomas. *Am J Clin Pathol* 1994; 102: 671-676

Kwiatkowski D, Hill AV, Sambou I, Twumasi P, Castracane J, Manogue KR, Cerami A, Brewster DR, Greenwood BM. TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated Plasmodium falciparum malaria. *Lancet* 1990; 336: 1201-1204

Laki J, Kiszal P, Vatay A, Blasko B, Kovacs M, Korner A, Madacsy L, Blatniczky L, Almassy Z, Szalai C, Rajczy K, Pozsonyi E, Karadi I, Fazakas A, Hosszufalusi N, Panczel P, Arason GJ, Wu YL, Zhou B, Yang Y, Yu CY, Fust G. The HLA 8.1 ancestral haplotype is strongly linked to the C allele of -429T>C promoter polymorphism of receptor of the advanced glycation endproduct (RAGE) gene. Haplotype-independent association of the -429C allele with high hemoglobinA1C levels in diabetic patients. *Mol Immunol* 2007; 44: 648-655

Laki J, Laki I, Nemeth K, Ujhelyi R, Bede O, Endreffy E, Bolbas K, Gyurkovits K, Csiszer E, Solyom E, Dobra G, Halasz A, Pozsonyi E, Rajczy K, Prohaszka Z, Fekete G, Fust G. The 8.1 ancestral MHC haplotype is associated with delayed onset of colonization in cystic fibrosis. *Int Immunol* 2006; 18: 1585-1590

Lazaris A, Chatzigianni EB, Panoussopoulos D, Tzimas GN, Davaris PS, Golematis B. Proliferating cell nuclear antigen and heat shock protein 70 immunolocalization in invasive ductal breast cancer not otherwise specified. *Breast Cancer Res Treat* 1997; 43: 43-51

Lazaris AC, Theodoropoulos GE, Davaris PS, Panoussopoulos D, Nakopoulou L, Kittas C, Golematis BC. Heat shock protein 70 and HLA-DR molecules tissue expression. Prognostic implications in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1995; 38: 739-745

Leach FS, Nicolaidis NC, Papadopoulos N, Liu B, Jen J, Parsons R, Peltomaki P, Sistonen P, Aaltonen LA, Nystrom-Lahti M, et al. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 1993; 75: 1215-1225

Leung TK, Rajendran MY, Monfries C, Hall C, Lim L. The human heat-shock protein family. Expression of a novel heat-inducible HSP70 (HSP70B') and isolation of its cDNA and genomic DNA. *Biochem J* 1990; 267: 125-132

Li J, Schmidt AM. Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Biol Chem* 1997; 272: 16498-16506

Lindquist S. The heat-shock response. *Annu Rev Biochem* 1986; 55: 1151-1191

Luo JL, Maeda S, Hsu LC, Yagita H, Karin M. Inhibition of NF-kappaB in cancer cells converts inflammation- induced tumor growth mediated by TNFalpha to TRAIL-mediated tumor regression. *Cancer Cell* 2004; 6: 297-305

Lurie G, Thompson P, McDuffie KE, Carney ME, Terada KY, Goodman MT. Association of estrogen and progestin potency of oral contraceptives with ovarian carcinoma risk. *Obstet Gynecol* 2007; 109: 597-607

Lynch HT, Smyrk TC, Watson P, Lanspa SJ, Lynch JF, Lynch PM, Cavalieri RJ, Boland CR. Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review. *Gastroenterology* 1993; 104: 1535-1549

Magic Z, Radulovic S, Brankovic-Magic M. cDNA microarrays: identification of gene signatures and their application in clinical practice. *J BUON* 2007; 1: 39-44

Marmenout A, Fransen L, Tavernier J, Van der Heyden J, Tizard R, Kawashima E, Shaw A, Johnson MJ, Semon D, Muller R. Molecular cloning and expression of human tumor necrosis factor and comparison with mouse tumor necrosis factor. *Eur J Biochem* 1985; 152: 515-522

McGuire W, Hill AV, Allsopp CE, Greenwood BM, Kwiatkowski D. Variation in the TNF-alpha promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature* 1994; 371: 508-510

McManus DT, Yap EP, Maxwell P, Russell SE, Toner PG, McGee JO. p53 expression, mutation, and allelic deletion in ovarian cancer. *J Pathol* 1994; 174: 159-168

McMichael A, Bowness P. HLA-B27: natural function and pathogenic role in spondyloarthritis. *Arthritis Res* 2002; 4 Suppl 3: S153-158

Melendez K, Wallen ES, Edwards BS, Mobarak CD, Bear DG, Moseley PL. Heat shock protein 70 and glycoprotein 96 are differentially expressed on the surface of malignant and nonmalignant breast cells. *Cell Stress Chaperones* 2006; 11: 334-342

Messer G, Spengler U, Jung MC, Honold G, Blomer K, Pape GR, Riethmuller G, Weiss EH. Polymorphic structure of the tumor necrosis factor (TNF) locus: an NcoI polymorphism in the first intron of the human TNF-beta gene correlates with a variant amino acid in position 26 and a reduced level of TNF-beta production. *J Exp Med* 1991; 173: 209-219

Mestiri S, Bouaouina N, Ahmed SB, Khedhaier A, Jrad BB, Remadi S, Chouchane L. Genetic variation in the tumor necrosis factor-alpha promoter region and in the stress protein hsp70-2: susceptibility and prognostic implications in breast carcinoma. *Cancer* 2001; 91: 672-678

Meyer T, Rustin GJ. Role of tumour markers in monitoring epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer* 2000; 82: 1535-1538

Milford E, Carpenter, CB. Adaptive immunity: Histocompatibility antigens and immune response genes. *ACP Medicine* 2004:

Milner BJ, Allan LA, Eccles DM, Kitchener HC, Leonard RC, Kelly KF, Parkin DE, Haites NE. p53 mutation is a common genetic event in ovarian carcinoma. *Cancer Res* 1993; 53: 2128-2132

Milner CM, Campbell RD. Polymorphic analysis of the three MHC-linked HSP70 genes. *Immunogenetics* 1992; 36: 357-362

Milner CM, Campbell RD. Structure and expression of the three MHC-linked HSP70 genes. *Immunogenetics* 1990; 32: 242-251

Mirrakhimov MM, Kitaev MI, Imanbaev AS, Markovich MO. [Autoimmune reactions to myoglobin in myocardial infarct patients]. *Ter Arkh* 1984; 56: 53-56

Moffatt MF, Cookson WO. Tumour necrosis factor haplotypes and asthma. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 551-554

Mulcahy B, Waldron-Lynch F, McDermott MF, Adams C, Amos CI, Zhu DK, Ward RH, Clegg DO, Shanahan F, Molloy MG, O'Gara F. Genetic variability in the tumor necrosis factor-lymphotoxin region influences susceptibility to rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet* 1996; 59: 676-683

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology* 1992; 24: 17-27

Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155: 335-350

Munch G, Schinzel R, Loske C, Wong A, Durany N, Li JJ, Vlassara H, Smith MA, Perry G, Riederer P. Alzheimer's disease--synergistic effects of glucose deficit, oxidative stress and advanced glycation endproducts. *J Neural Transm* 1998; 105: 439-461

Narod SA, Ford D, Devilee P, Barkardottir RB, Lynch HT, Smith SA, Ponder BA, Weber BL, Garber JE, Birch JM. An evaluation of genetic heterogeneity in 145 breast-ovarian cancer families. Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 254-264

Nawroth PP, Stern DM. Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor. *J Exp Med* 1986; 163: 740-745

Nedospasov SA, Hirt B, Shakhov AN, Dobrynin VN, Kawashima E, Accolla RS, Jongeneel CV. The genes for tumor necrosis factor (TNF-alpha) and lymphotoxin (TNF-beta) are tandemly arranged on chromosome 17 of the mouse. *Nucleic Acids Res* 1986; 14: 7713-7725

Nedospasov SA, Shakhov AN, Turetskaia RL, Mett VA, Georgiev GP. Molecular cloning of human genes coding tumor necrosis factors: tandem arrangement of alpha- and beta-genes in a short segment (6 thousand nucleotide pairs) of human genome. *Dokl Akad Nauk SSSR* 1985; 285: 1487-1490

Nedwin GE, Naylor SL, Sakaguchi AY, Smith D, Jarrett-Nedwin J, Pennica D, Goeddel DV, Gray PW. Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. *Nucleic Acids Res* 1985; 13: 6361-6373

Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan YC, Elliston K, Stern D, Shaw A. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem* 1992; 267: 14998-15004

Ness RB, Cottreau C. Possible role of ovarian epithelial inflammation in ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 1459-1467

Ngo VN, Korner H, Gunn MD, Schmidt KN, Riminton DS, Cooper MD, Browning JL, Sedgwick JD, Cyster JG. Lymphotoxin alpha/beta and tumor necrosis factor are required for stromal cell expression of homing chemokines in B and T cell areas of the spleen. *J Exp Med* 1999; 189: 403-412

Nguyen HN, Averette HE, Hoskins W, Sevin BU, Penalver M, Steren A. National survey of ovarian carcinoma. VI. Critical assessment of current International Federation of Gynecology and Obstetrics staging system. *Cancer* 1993; 72: 3007-3011

Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Wei YF, Carter KC, Ruben SM, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM. Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature* 1994; 371: 75-80

Niloff JM, Klug TL, Schaetzel E, Zurawski VR, Jr., Knapp RC, Bast RC, Jr. Elevation of serum CA125 in carcinomas of the fallopian tube, endometrium, and endocervix. *Am J Obstet Gynecol* 1984; 148: 1057-1058

Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 2000; 404: 787-790

Niwa K, Itoh M, Murase T, Morishita S, Itoh N, Mori H, Tamaya T. Alteration of p53 gene in ovarian carcinoma: clinicopathological correlation and prognostic significance. *Br J Cancer* 1994; 70: 1191-1197

Nunomura A, Perry G, Pappolla MA, Wade R, Hirai K, Chiba S, Smith MA. RNA oxidation is a prominent feature of vulnerable neurons in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 1999; 19: 1959-1964

Oh BR, Sasaki M, Perinchery G, Ryu SB, Park YI, Carroll P, Dahiya R. Frequent genotype changes at -308, and 488 regions of the tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene in patients with prostate cancer. *J Urol* 2000; 163: 1584-1587

Old LJ. Tumor necrosis factor (TNF). *Science* 1985; 230: 630-632

Papadopoulos N, Nicolaides NC, Wei YF, Ruben SM, Carter KC, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM, Adams MD. Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science* 1994; 263: 1625-1629

Park L, Raman KG, Lee KJ, Lu Y, Ferran LJ, Jr., Chow WS, Stern D, Schmidt AM. Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. *Nat Med* 1998; 4: 1025-1031

Parkkinen J, Raulo E, Merenmies J, Nolo R, Kajander EO, Baumann M, Rauvala H. Amphoterin, the 30-kDa protein in a family of HMG1-type polypeptides. Enhanced expression in transformed cells, leading edge localization, and interactions with plasminogen activation. *J Biol Chem* 1993; 268: 19726-19738

Partanen R, Koskinen H, Hemminki K. Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in patients who have asbestosis and develop cancer. *Occup Environ Med* 1995; 52: 316-319

Paul NL, Ruddle NH. Lymphotoxin. *Annu Rev Immunol* 1988; 6: 407-438

Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, Seeburg PH, Derynck R, Palladino MA, Kohr WJ, Aggarwal BB, Goeddel DV. Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 1984; 312: 724-729

Perez C, Albert I, DeFay K, Zachariades N, Gooding L, Kriegler M. A nonsecretable cell surface mutant of tumor necrosis factor (TNF) kills by cell-to-cell contact. *Cell* 1990; 63: 251-258

Pettersson-Fernholm K, Forsblom C, Hudson BI, Perola M, Grant PJ, Groop PH. The functional -374 T/A RAGE gene polymorphism is associated with proteinuria and cardiovascular disease in type 1 diabetic patients. *Diabetes* 2003; 52: 891-894

Pociot F, Ronningen KS, Nerup J. Polymorphic analysis of the human MHC-linked heat shock protein 70 (HSP70-2) and HSP70-Hom genes in insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Scand J Immunol* 1993; 38: 491-495

Powell DE, Puls L, van Nagell J, Jr. Current concepts in epithelial ovarian tumors: does benign to malignant transformation occur? *Hum Pathol* 1992; 23: 846-847

Price P, Witt C, Allcock R, Sayer D, Garlepp M, Kok CC, French M, Mallal S, Christiansen F. The genetic basis for the association of the 8.1 ancestral haplotype (A1, B8, DR3) with multiple immunopathological diseases. *Immunol Rev* 1999; 167: 257-274

Pujol-Borrell R, Todd I, Doshi M, Bottazzo GF, Sutton R, Gray D, Adolf GR, Feldmann M. HLA class II induction in human islet cells by interferon-gamma plus tumour necrosis factor or lymphotoxin. *Nature* 1987; 326: 304-306

Puls LE, Powell DE, DePriest PD, Gallion HH, Hunter JE, Kryscio RJ, van Nagell JR, Jr. Transition from benign to malignant epithelium in mucinous and serous ovarian cystadenocarcinoma. *Gynecol Oncol* 1992; 47: 53-57

Ratner L, Polmar SH, Paul N, Ruddle N. Cytotoxic factors secreted by cells infected by human immunodeficiency virus type I. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1987; 3: 147-155

- Riener EK, Arnold N, Kommos F, Lauinger S, Pfisterer J. The prognostic and predictive value of immunohistochemically detected HER-2/neu overexpression in 361 patients with ovarian cancer: a multicenter study. *Gynecol Oncol* 2004; 95:89–94]
- Riehl A, Nemeth J, Angel P, Hess J. The receptor RAGE: Bridging inflammation and cancer. *Cell Commun Signal* 2009; 7: 12
- Risinger JI, Berchuck A, Kohler MF, Watson P, Lynch HT, Boyd J. Genetic instability of microsatellites in endometrial carcinoma. *Cancer Res* 1993; 53: 5100-5103
- Ritossa F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. *Cellular and Molecular Life Sciences* 1962; 18: 571-573
- Ritthaler U, Deng Y, Zhang Y, Greten J, Abel M, Sido B, Allenberg J, Otto G, Roth H, Bierhaus A. Expression of receptors for advanced glycation end products in peripheral occlusive vascular disease. *Am J Pathol* 1995; 146: 688-694
- Robert-Koch-Institut. Krebs in Deutschland 2003-2004. Häufigkeiten und Trends. 2008: 66-69
- Robinson J, Waller MJ, Parham P, de Groot N, Bontrop R, Kennedy LJ, Stoehr P, Marsh SG. IMGT/HLA and IMGT/MHC: sequence databases for the study of the major histocompatibility complex. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: 311-314
- Rohde M, Daugaard M, Jensen MH, Helin K, Nylandsted J, Jaattela M. Members of the heat-shock protein 70 family promote cancer cell growth by distinct mechanisms. *Genes Dev* 2005; 19: 570-582
- Roucard C, Garban F, Mooney NA, Charron DJ, Ericson ML. Conformation of human leukocyte antigen class II molecules. Evidence for superdimers and empty molecules on human antigen presenting cells. *J Biol Chem* 1996; 271: 13993-14000
- Roudier J. Association of MHC and rheumatoid arthritis. Association of RA with HLA-DR4: the role of repertoire selection. *Arthritis Res* 2000; 2: 217-220
- Roux AF, Nguyen VT, Squire JA, Cox DW. A heat shock gene at 14q22: mapping and expression. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 1819-1822
- Rubin SC, Benjamin I, Behbakht K, Takahashi H, Morgan MA, LiVolsi VA, Berchuck A, Muto MG, Garber JE, Weber BL, Lynch HT, Boyd J. Clinical and pathological features of ovarian cancer in women with germ-line mutations of BRCA1. *N Engl J Med* 1996; 335: 1413-1416
- Ruddle NH. Lymphotoxin production in AIDS *Immunology today* 1986; 7: 8-9
- Ruddle NH, Powell MB, Conta BS. Lymphotoxin, a biologically relevant model lymphokine. *Lymphokine Res* 1983; 2: 23-31

Ruef J, Peter K, Nordt TK, Runge MS, Kubler W, Bode C. Oxidative stress and atherosclerosis: its relationship to growth factors, thrombus formation and therapeutic approaches. *Thromb Haemost* 1999; 82 Suppl 1: 32-37

Runnebaum IB MA, Kreienberg R, Meerpohl HG. Epidemiologische und molekulargenetische Risikofaktoren beim Ovarialkarzinom. *Der Onkologe* 1998; 4: 1096-1100

Russell SE, Hickey GI, Lowry WS, White P, Atkinson RJ. Allele loss from chromosome 17 in ovarian cancer. *Oncogene* 1990; 5: 1581-1583

Saenz-Lopez P, Carretero R, Cozar JM, Romero JM, Canton J, Vilchez JR, Tallada M, Garrido F, Ruiz-Cabello F. Genetic polymorphisms of RANTES, IL1-A, MCP-1 and TNF-A genes in patients with prostate cancer. *BMC Cancer* 2008; 8: 382

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487-491

Saito H, Inazawa J, Saito S, Kasumi F, Koi S, Sagae S, Kudo R, Saito J, Noda K, Nakamura Y. Detailed deletion mapping of chromosome 17q in ovarian and breast cancers: 2-cM region on 17q21.3 often and commonly deleted in tumors. *Cancer Res* 1993; 53: 3382-3385

Sargent CA, Dunham I, Trowsdale J, Campbell RD. Human major histocompatibility complex contains genes for the major heat shock protein HSP70. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 1968-1972

Sarto C, Binz PA, Mocarelli P. Heat shock proteins in human cancer. *Electrophoresis* 2000; 21: 1218-1226

Sasaki M, Nakajima K, Perinchery G, Fujino T, Oh BR, Fujimoto S, Dahiya R. Frequent genotype changes at -308 of the human tumor necrosis factor-alpha promoter region in human uterine endometrial cancer. *Oncol Rep* 2000; 7: 369-373

Schiaffonati L, Pappalardo C, Tacchini L. Expression of the HSP 70 gene family in rat hepatoma cell lines of different growth rates. *Exp Cell Res* 1991; 196: 330-336

Schmidt AM, Hori O, Brett J, Yan SD, Wautier JL, Stern D. Cellular receptors for advanced glycation end products. Implications for induction of oxidant stress and cellular dysfunction in the pathogenesis of vascular lesions. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 1521-1528

Schmidt AM, Yan SD, Brett J, Mora R, Nowygrod R, Stern D. Regulation of human mononuclear phagocyte migration by cell surface-binding proteins for advanced glycation end products. *J Clin Invest* 1993; 91: 2155-2168

Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J Clin Invest* 2001; 108: 949-955

Schraml P, Bendik I, Ludwig CU. Differential messenger RNA and protein expression of the receptor for advanced glycosylated end products in normal lung and non-small cell lung carcinoma. *Cancer Res* 1997; 57: 3669-3671

Scully R, Chen J, Plug A, Xiao Y, Weaver D, Feunteun J, Ashley T, Livingston DM. Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell* 1997; 88: 265-275

Scully RE SL. World Health Organisation (WHO). International Histological Classification of Tumours. Histological Typing of Ovarian Tumours. Springer Berlin Heidelberg, 1999:

Seidemann K, Zimmermann M, Book M, Meyer U, Burkhardt B, Welte K, Reiter A, Stanulla M. Tumor necrosis factor and lymphotoxin alfa genetic polymorphisms and outcome in pediatric patients with non-Hodgkin's lymphoma: results from Berlin-Frankfurt-Munster Trial NHL-BFM 95. *J Clin Oncol* 2005; 23: 8414-8421

Serrano-Olvera A, Dueñas-González A, Gallardo-Rincón D, Candelaria M, De la Garza-Salazar J. Prognostic, predictive and therapeutic implications of HER2 in invasive epithelial ovarian cancer. *Cancer Treat Rev* 2006; 32: 180-190

Shalaby MR, Aggarwal BB, Rinderknecht E, Svedersky LP, Finkle BS, Palladino MA, Jr. Activation of human polymorphonuclear neutrophil functions by interferon-gamma and tumor necrosis factors. *J Immunol* 1985; 135: 2069-2073

Sharan SK, Morimatsu M, Albrecht U, Lim DS, Regel E, Dinh C, Sands A, Eichele G, Hastly P, Bradley A. Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2. *Nature* 1997; 386: 804-810

Sharma S, Ghosh B, Sharma SK. Association of TNF polymorphisms with sarcoidosis, its prognosis and tumour necrosis factor (TNF)-alpha levels in Asian Indians. *Clin Exp Immunol* 2008; 151: 251-259

Shelling AN. Role of p53 in drug resistance in ovarian cancer. *Lancet* 1997; 349: 744-745

Shih CM, Lee YL, Chiou HL, Chen W, Chang GC, Chou MC, Lin LY. Association of TNF-alpha polymorphism with susceptibility to and severity of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2006; 52: 15-20

Shirai T, Yamaguchi H, Ito H, Todd CW, Wallace RB. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene for human tumour necrosis factor. *Nature* 1985; 313: 803-806

Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989; 244: 707-712

Singer G, Stöhr R, Cope L, Dehari R, Hartmann A, Cao DF, Wang TL, Kurman RJ, Shih leM. Patterns of p53 mutations separate ovarian serous borderline tumors and low- and high-grade carcinomas and provide support for a new model of ovarian carcinogenesis: a mutational analysis with immunohistochemical correlation. *Am J Surg Pathol.* 2005; 29: 218-24

Smith ER, Xu XX. Ovarian ageing, follicle depletion, and cancer: a hypothesis for the aetiology of epithelial ovarian cancer involving follicle depletion. *Lancet Oncol* 2008; 9: 1108-1111

Soulis T, Thallas V, Youssef S, Gilbert RE, McWilliam BG, Murray-McIntosh RP, Cooper ME. Advanced glycation end products and their receptors co-localise in rat organs susceptible to diabetic microvascular injury. *Diabetologia* 1997; 40: 619-628

Spies T, Morton CC, Nedospasov SA, Fiers W, Pious D, Strominger JL. Genes for the tumor necrosis factors alpha and beta are linked to the human major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83: 8699-8702

Spriggs DR, Imamura K, Rodriguez C, Sariban E, Kufe DW. Tumor necrosis factor expression in human epithelial tumor cell lines. *J Clin Invest* 1988; 81: 455-460

Springer TA, Kaufman JF, Terhorst C, Strominger JL. Purification and structural characterisation of human HLA-linked B-cell antigens. *Nature* 1977; 268: 213-218

Stanczuk GA, Sibanda EN, Tswana SA, Bergstrom S. Polymorphism at the -308-promoter position of the tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene and cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2003; 13: 148-153

Stanulla M, Schrauder A, Welte K, Schrappe M. Tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha genetic polymorphisms and risk of relapse in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: a case-control study of patients treated with BFM therapy. *BMC Blood Disord* 2001; 1: 2

Strachan T. Molecular genetics and polymorphism of class I HLA antigens. *Br Med Bull* 1987; 43: 1-14

Sugaya K, Fukagawa T, Matsumoto K, Mita K, Takahashi E, Ando A, Inoko H, Ikemura T. Three genes in the human MHC class III region near the junction with the class II: gene for receptor of advanced glycosylation end products, PBX2 homeobox gene and a notch homolog, human counterpart of mouse mammary tumor gene int-3. *Genomics* 1994; 23: 408-419

Suto R, Srivastava PK. A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides. *Science* 1995; 269: 1585-1588

Taguchi A, Blood DC, del Toro G, Canet A, Lee DC, Qu W, Tanji N, Lu Y, Lalla E, Fu C, Hofmann MA, Kislinger T, Ingram M, Lu A, Tanaka H, Hori O, Ogawa S, Stern DM, Schmidt AM. Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases. *Nature* 2000; 405: 354-360

Tavaria M, Gabriele T, Anderson RL, Mirault ME, Baker E, Sutherland G, Kola I. Localization of the gene encoding the human heat shock cognate protein, HSP73, to chromosome 11. *Genomics* 1995; 29: 266-268

Tavaria M, Gabriele T, Kola I, Anderson RL. A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family. *Cell Stress Chaperones* 1996; 1: 23-28

Tavassoli FA DP. World Health Organisation Classification of Tumours. Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs. IARC Press Lyon 2003: 113-202

Tingulstad S, Skjeldestad FE, Halvorsen TB, Hagen B. Survival and prognostic factors in patients with ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 2003; 101: 885-891

Tortolero-Luna G, Mitchell MF. The epidemiology of ovarian cancer. *J Cell Biochem Suppl* 1995; 23: 200-207

Toth EK, Kocsis J, Madaras B, Biro A, Pocsai Z, Fust G, Blasko B, Karadi I, Adany R, Laki J. The 8.1 ancestral MHC haplotype is strongly associated with colorectal cancer risk. *Int J Cancer* 2007; 121: 1744-1748

Tracey KJ, Wei H, Manogue KR, Fong Y, Hesse DG, Nguyen HT, Kuo GC, Beutler B, Cotran RS, Cerami A, et al. Cachectin/tumor necrosis factor induces cachexia, anemia, and inflammation. *J Exp Med* 1988; 167: 1211-1227

Trowsdale J. Genetics and polymorphism: class II antigens. *Br Med Bull* 1987; 43: 15-36

Trowsdale J. Genomic structure and function in the MHC. *Trends Genet* 1993; 9: 117-122

Tsujimoto M, Yokota S, Vilcek J, Weissmann G. Tumor necrosis factor provokes superoxide anion generation from neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 137: 1094-1100

Tumorzentrum M. Manual Maligne Ovarialtumoren. München, 2007

Vargas-Roig LM, Fanelli MA, Lopez LA, Gago FE, Tello O, Aznar JC, Ciocca DR. Heat shock proteins and cell proliferation in human breast cancer biopsy samples. *Cancer Detect Prev* 1997; 21: 441-451

- Vargas-Roig LM, Gago FE, Tello O, Aznar JC, Ciocca DR. Heat shock protein expression and drug resistance in breast cancer patients treated with induction chemotherapy. *Int J Cancer* 1998; 79: 468-475
- Verjans GM, Brinkman BM, Van Doornik CE, Kijlstra A, Verweij CL. Polymorphism of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) at position -308 in relation to ankylosing spondylitis. *Clin Exp Immunol* 1994; 97: 45-47
- Vidovic N. Untersuchungen polymorpher Genloci der HLA-Klassen II und III und deren Assoziation mit dem sporadischen Mammakarzinom. Bonn: Inaugural-Dissertation, 2008
- Vilcek J, Lee TH. Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *J Biol Chem* 1991; 266: 7313-7316
- Vlassara H. The AGE-receptor in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Metab Res Rev* 2001; 17: 436-443
- Voellmy R, Ahmed A, Schiller P, Bromley P, Rungger D. Isolation and functional analysis of a human 70,000-dalton heat shock protein gene segment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82: 4949-4953
- Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 2003; 10: 45-65
- Walker GR, Schlesselman JJ, Ness RB. Family history of cancer, oral contraceptive use, and ovarian cancer risk. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 186: 8-14
- Warzocha K, Ribeiro P, Bienvenu J, Roy P, Charlot C, Rigal D, Coiffier B, Salles G. Genetic polymorphisms in the tumor necrosis factor locus influence non-Hodgkin's lymphoma outcome. *Blood* 1998; 91: 3574-3581
- Watson P, Lynch HT. Extracolonic cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer* 1993; 71: 677-685
- Wear-Maggitti K, Lee J, Conejero A, Schmidt AM, Grant R, Breitbart A. Use of topical sRAGE in diabetic wounds increases neovascularization and granulation tissue formation. *Ann Plast Surg* 2004; 52: 519-521; discussion 522
- Welsh JB, Zarrinkar PP, Sapinoso LM, Kern SG, Behling CA, Monk BJ, Lockhart DJ, Burger RA, Hampton GM. Analysis of gene expression profiles in normal and neoplastic ovarian tissue samples identifies candidate molecular markers of epithelial ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 1176-1181
- Wen WH, Reles A, Runnebaum IB, Sullivan-Halley J, Bernstein L, Jones LA, Felix JC, Kreienberg R, el-Naggar A, Press MF. p53 mutations and expression in ovarian cancers: correlation with overall survival. *Int J Gynecol Pathol* 1999; 18: 29-41

Wihlborg C, Sjoberg J, Intaglietta M, Axdorph U, Pisa EK, Pisa P. Tumour necrosis factor-alpha cytokine promoter gene polymorphism in Hodgkin's disease and chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1999; 104: 346-349

Wilson AG, de Vries N, Pociot F, di Giovine FS, van der Putte LB, Duff GW. An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor alpha promoter region is strongly associated with HLA A1, B8, and DR3 alleles. *J Exp Med* 1993; 177: 557-560

Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AI, Duff GW. Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. *Hum Mol Genet* 1992; 1: 353

Wilson AG, di Giovine FS, Duff GW. Genetics of tumour necrosis factor-alpha in autoimmune, infectious, and neoplastic diseases. *J Inflamm* 1995; 45: 1-12

Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 3195-3199

Wu DY, Ugozzoli L, Pal BK, Wallace RB. Allele-specific enzymatic amplification of beta-globin genomic DNA for diagnosis of sickle cell anemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 2757-2760

Yamagishi S, Fujimori H, Yonekura H, Yamamoto Y, Yamamoto H. Advanced glycation endproducts inhibit prostacyclin production and induce plasminogen activator inhibitor-1 in human microvascular endothelial cells. *Diabetologia* 1998; 41: 1435-1441

Yan B, Wang H, Rabbani ZN, Zhao Y, Li W, Yuan Y, Li F, Dewhirst MW, Li CY. Tumor necrosis factor-alpha is a potent endogenous mutagen that promotes cellular transformation. *Cancer Res* 2006; 66: 11565-11570

Yan SD, Chen X, Fu J, Chen M, Zhu H, Roher A, Slattery T, Zhao L, Nagashima M, Morser J, Migheli A, Nawroth P, Stern D, Schmidt AM. RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* 1996; 382: 685-691

Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, Pinsky D, Stern D. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem* 1994; 269: 9889-9897

Yan SD, Yan SF, Chen X, Fu J, Chen M, Kuppusamy P, Smith MA, Perry G, Godman GC, Nawroth P. Non-enzymatically glycosylated tau in Alzheimer's disease induces neuronal oxidant stress resulting in cytokine gene expression and release of amyloid beta-peptide. *Nat Med* 1995; 1: 693-699

Yan SS, Wu ZY, Zhang HP, Furtado G, Chen X, Yan SF, Schmidt AM, Brown C, Stern A, LaFaille J, Chess L, Stern DM, Jiang H. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by selective blockade of encephalitogenic T-cell infiltration of the central nervous system. *Nat Med* 2003; 9: 287-293

Yonekura H, Yamamoto Y, Sakurai S, Petrova RG, Abedin MJ, Li H, Yasui K, Takeuchi M, Makita Z, Takasawa S, Okamoto H, Watanabe T, Yamamoto H. Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury. *Biochem J* 2003; 370: 1097-1109

Yonekura H, Yamamoto Y, Sakurai S, Watanabe T, Yamamoto H. Roles of the receptor for advanced glycation endproducts in diabetes-induced vascular injury. *J Pharmacol Sci* 2005; 97: 305-311

Zee RY, Romero JR, Gould JL, Ricupero DA, Ridker PM. Polymorphisms in the advanced glycosylation end product-specific receptor gene and risk of incident myocardial infarction or ischemic stroke. *Stroke* 2006; 37: 1686-1690

## 11. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Professor van der Ven für die Möglichkeit, dieses interessante Thema in ihrem Labor zu bearbeiten. Sie hat mich während der gesamten, mitunter doch recht mühsamen Entstehungszeit stets bestärkt und durch ihre inhaltliche Kritik und aufmerksames Korrekturlesen entscheidend dazu beigetragen, die Arbeit fertig zu stellen.

Sehr herzlich möchte ich auch Frau Christina Drengner danken, ohne deren tatkräftige Unterstützung ich den praktischen Arbeitsteil nicht geschafft hätte. Durch ihre immer neuen guten Ideen gelang es uns, die Versuchsbedingungen so zu optimieren, dass die Versuche letztlich erfolgreich waren. Sie hat mich nicht nur fachlich unterstützt, sondern ist mir darüber hinaus in der gemeinsamen Zeit sehr ans Herz gewachsen.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Dr. Fimmers vom Institut für Medizinische Biometrie, Informatik und Epidemiologie der Universität Bonn, mit dessen Hilfe die statistische Auswertung der Daten gelang.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir das Medizinstudium ermöglicht und immer an die Fertigstellung der Arbeit geglaubt haben. Und auch meinen Geschwistern, die mir schon immer eine entscheidende Stütze waren und sind. Danke auch meinen lieben Freundinnen und meinem Freund für ihre unermüdliche Motivationsarbeit. Ich bin froh, dass es Euch gibt.