

Aus dem Institut für Pathologie  
der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Direktor: Prof. Dr. med. Claudia Wickenhauser

# **Bedeutung von ausgewählten Polymorphismen auf das Endometriumkarzinom**

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

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

von Frederike Keller  
geboren am 09. August 1989 in Nordhausen

Betreuer: PD F. Bartel

Gutachter:

1. PD F. Bartel
2. apl. Prof. M. Staeger
3. Prof. K. Engeland

26.01.2017

17.08.2017

## Referat

Das Endometriumkarzinom (EC) ist die häufigste Krebserkrankung des weiblichen Genitals der westlichen Welt. Klassischerweise unterscheidet man dabei 2 Subtypen: Typ-I- und Typ-II-Karzinomen. Obwohl das Typ-I-EC im Gegensatz zum Typ-II-EC üblicherweise mit einer sehr guten Prognose assoziiert ist, werden auch hier immer wieder unerwartet schlechte Verläufe beobachtet. Aus diesem Grund widmet man sich seit einigen Jahren der Identifizierung molekulargenetischer Charakteristika, die eine präzisere Vorhersage der individuellen Prognose ermöglichen. Mit dieser Arbeit sollte ein weiterer Beitrag zur Aufklärung möglicher genetischer Prädiktoren des EC geleistet werden. Dafür wurde der Einfluss von vier, in Bezug auf Tumorgenese bisher gut erforschten, Einzelnukleotidpolymorphismen des p53-MDM2/4-Regelnetzwerkes (MDM2 SNP 309, MDM4 SNP 31826 und 34091, p53 Codon72 SNP) auf das Erkrankungsrisiko, Diagnosealter und das Überleben von 170 EC-Patientinnen untersucht. Die Genotypisierung der einzelnen Polymorphismen erfolgte durch Sequenzierung, Realtime-PCR und HRM-Analyse. Diese Daten wurden im Anschluss mit den klinisch-pathologischen Merkmalen des benannten Kollektivs korreliert, welches bereits für eine frühere Arbeit von Annette Bangemann erstellt wurde. Letztlich konnte ein signifikanter Einfluss der homozygoten Minor-Allele der MDM4-Polymorphismen sowohl auf das Diagnosealter als auch auf das Überleben der Typ-I-EC-Patientinnen gezeigt werden. In beiden Fällen erkrankten die Frauen mit dem entsprechenden Genotyp zwar zu einem späteren Zeitpunkt, wiesen nach der Diagnosestellung jedoch verkürzte Überlebenszeiten auf. Dieser Effekt verstärkte sich für jene Patientinnen mit östrogenrezeptornegativen Karzinomen. Das Ergebnis lässt darauf schließen, dass die beiden MDM4 SNP 32826 und 34091 weniger die Tumorentstehung als vielmehr deren Verlauf und möglicherweise das Therapieansprechen beeinflussen. Des Weiteren konnte ein insignifikanter, lebensverlängernder Effekt der homozygoten Prolin-Variante des p53 Codon72 SNP gezeigt werden. Während hierfür keine Wirkung auf das Diagnosealter beobachtet werden konnte, verstarben die entsprechenden Patientinnen im Beobachtungszeitraum nicht an den Folgen der Erkrankung und hatten damit einen relevanten Überlebensvorteil. Dieser konnte außerdem unabhängig vom Allelstatus der MDM4-SNP gefunden werden. Anhand dieses Kollektivs konnte kein Einfluss des MDM2 SNP 309 auf das EC festgestellt werden. Außerdem lässt sich aufgrund geringer Fallzahlen keine Aussage über die Wirkung der vier SNP auf das Typ-II-EC treffen.

Keller, Frederike: Bedeutung von ausgewählten Polymorphismen auf das Endometriumkarzinom, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 75 Seiten, 2017

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>IV</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>VI</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>VII</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Endometriumkarzinom . . . . .	1
1.1.1. Epidemiologie . . . . .	1
1.1.2. Pathogenese und Risikofaktoren . . . . .	1
1.1.3. Klassifikation . . . . .	2
1.1.4. Klinik und Diagnostik . . . . .	3
1.1.5. Therapie . . . . .	4
1.1.6. Prognose . . . . .	5
1.2. Zellzykluskontrolle und Einfluss verschiedener Polymorphismen . . . . .	6
1.2.1. p53 . . . . .	6
1.2.2. Einfluss von Einzelnukleotidpolymorphismen auf die Regelkreisläufe des p53 . . . . .	8
1.2.3. Einfluss von Östrogen auf die Tumorgenese und Regelkreisläufe des p53 . . . . .	12
<b>2. Zielstellung</b>	<b>13</b>
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>14</b>
3.1. Material . . . . .	14
3.1.1. Studienpopulation . . . . .	14
3.1.2. Primer . . . . .	17
3.1.3. TaqMan SNP Genotyping-Assays . . . . .	17
3.1.4. Enzyme . . . . .	17
3.1.5. Kits . . . . .	17
3.1.6. Chemikalien . . . . .	18
3.1.7. Puffer und Lösungen . . . . .	18
3.1.8. Geräte und Verbrauchsmaterialien . . . . .	18
3.2. Methoden . . . . .	19
3.2.1. Sequenzierung der Genorte nach Sanger . . . . .	19

3.2.2.	Realtime-PCR . . . . .	20
3.2.3.	„High Resolution Melting“-Analyse (HRMA) . . . . .	21
3.2.4.	Statistische Analysen . . . . .	22
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>23</b>
4.1.	Einfluss des p53 Codon72 SNP auf das Typ-I-EC . . . . .	23
4.1.1.	Allelverteilung des p53 Codon72 SNP . . . . .	23
4.1.2.	Einfluss des p53 Codon72 SNP auf das Diagnosealter . . . . .	24
4.1.3.	Einfluss des p53 Codon72 SNP auf das Überleben . . . . .	24
4.1.4.	Einfluss des p53 Codon72 SNP auf klinisch-pathologische Parameter . . . . .	26
4.2.	Einfluss des MDM2 SNP 309 auf das Typ-I-EC . . . . .	26
4.2.1.	Allelverteilung des MDM2 SNP 309 . . . . .	26
4.2.2.	Einfluss des MDM2 SNP 309 auf das Diagnosealter . . . . .	27
4.2.3.	Einfluss des MDM2 SNP 309 auf das Überleben . . . . .	28
4.2.4.	Einfluss des MDM2 SNP 309 auf klinisch-pathologische Parameter . . . . .	29
4.3.	Einfluss des MDM4 SNP 31826 auf das Typ-I-EC . . . . .	30
4.3.1.	Allelverteilung des MDM4 SNP 31826 . . . . .	30
4.3.2.	Einfluss des MDM4 SNP 31826 auf das Diagnosealter . . . . .	30
4.3.3.	Einfluss des MDM4 SNP 31826 auf das Überleben . . . . .	31
4.3.4.	Einfluss des MDM4 SNP 31826 auf klinisch-pathologische Parameter . . . . .	33
4.4.	Einfluss des MDM4 SNP 34091 auf das Typ-I-EC . . . . .	34
4.4.1.	Allelverteilung des MDM4 SNP 34091 . . . . .	34
4.4.2.	Einfluss des MDM4 SNP 34091 auf das Diagnosealter . . . . .	35
4.4.3.	Einfluss des MDM4 SNP 34091 auf das Überleben . . . . .	35
4.4.4.	Einfluss des MDM4 SNP 34091 auf klinisch-pathologische Parameter . . . . .	38
4.5.	Einfluss beider MDM4 SNP 31826 und 34091 auf das Typ-I-EC . . . . .	38
4.5.1.	Überprüfung des Kopplungsgleichgewichts . . . . .	39
4.5.2.	Einfluss der MDM4 SNP 31826 und 34091 auf das Diagnosealter . . . . .	39
4.5.3.	Einfluss der MDM4 SNP 31826 und 34091 auf das Überleben . . . . .	40
4.6.	Einfluss der MDM4 SNP 31826 und 34091 in Kombination mit dem p53 Codon 72 SNP auf das Überleben der Typ-I-EC . . . . .	42
4.6.1.	Einfluss des MDM4 SNP 31826 in Kombination mit dem p53 Codon 72 SNP . . . . .	42
4.6.2.	Einfluss des MDM4 SNP 34091 in Kombination mit dem p53 Codon 72 SNP . . . . .	43
4.7.	Einfluss der Polymorphismen auf das Typ-II-EC . . . . .	45

<b>5. Diskussion</b>	<b>47</b>
5.1. Einfluss der Polymorphismen auf das Typ-I-EC . . . . .	47
5.1.1. MDM4 SNP 31826 . . . . .	47
5.1.2. MDM4 SNP 34091 . . . . .	50
5.1.3. Kombination von MDM4 SNP 31826 und 34091 . . . . .	51
5.1.4. p53 Codon 72 Polymorphismus . . . . .	52
5.1.5. Kombination der MDM4-und des p53 Codon72 Polymorphismus	53
5.1.6. MDM2 SNP 309 . . . . .	54
5.2. Limitationen der Studie . . . . .	55
5.3. Ausblick und klinische Relevanz . . . . .	56
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>58</b>
<b>Literatur</b>	<b>60</b>
<b>7. Thesen</b>	<b>72</b>
<b>A. Anhang</b>	<b>73</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>IX</b>
<b>Danksagung</b>	<b>X</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Arg	.....	Arginin
BRCA	.....	Breast Cancer - Gen
BMI	.....	Body-Maß-Index
bw	.....	backward
°C	.....	Grad Celsius
CA - 125	.....	Cancer-Antigen 125
Cd	.....	Codon
DNA	.....	deoxyribonucleic acid
dNTP's	.....	Deoxynucleotide
EC	.....	Endometriumkarzinom
EDTA	.....	ethylene diamine tetraacetic acid
ER	.....	Östrogenrezeptor
ER <sup>-</sup>	.....	Östrogenrezeptor negativ
ESR1/2	.....	Östrogenrezeptor-Gen
FGFR	.....	Fibroblast growth factor receptor
FIGO	.....	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
fw	.....	forward
g	.....	Gramm
G1-3	.....	Grading, Zelldifferenzierung (gut - mäßig - schlecht)
HRM	.....	High resolution melting
KI	.....	Konfidenzintervall
KRAS	.....	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
L1CAM	.....	L1 cell adhesion molecule
LD	.....	linkage disequilibrium
MDM	.....	murine - double - minute
min	.....	Minute
mRNA	.....	messenger RNA

$\mu$ l	.....	Mikroliter
$\mu$ M	.....	Mikromolar
mM	.....	Milimolar
OR	.....	Odds Ratio
pM	.....	Pikomolar
p	.....	Irrtumswahrscheinlichkeit
p53	.....	Protein 53
PCR	.....	poly chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PIK3CA	.....	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
PMB	.....	Postmenopausenblutung
POLE	.....	DNA polymerase epsilon catalytic subunit
Pro	.....	Prolin
RR	.....	Relatives Risiko
rev	.....	revers
RNA	.....	ribonucleic acid
rs	.....	Reference SNP cluster ID
sec	.....	Sekunde
SNP	.....	single nucleotide polymorphism, Einzelnukleotidpolymorphismus
TBE-Puffer	...	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Tris	.....	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TNM	.....	Tumor - Nodus - Metastasen
TSH	.....	Thyreoidea-stimulierendes Hormon
UTR	.....	untranslated region
UV	.....	Ultraviolettstrahlung
V	.....	Volt
VEGF	.....	Vascular Endothelial Growth Factor

## Abbildungsverzeichnis

3.1. Diagnosealter der Studienpopulation . . . . .	16
3.2. Überleben der Studienpopulation . . . . .	16
4.1. Überleben in Abhängigkeit vom p53 Codon72 SNP . . . . .	25
4.2. Allelverteilung des MDM2 SNP 309 in der Studienpopulation . . . . .	27
4.3. Überleben in Abhängigkeit vom MDM2 SNP 309 . . . . .	29
4.4. Überleben in Abhängigkeit vom MDM4 SNP 31826 . . . . .	32
4.5. Überleben in Abhängigkeit vom MDM4 SNP 31826 bei ER <sup>-</sup> Tumoren	33
4.6. Überleben in Abhängigkeit vom MDM4 SNP 34091 . . . . .	37
4.7. Überleben in Abhängigkeit vom MDM4 SNP 34091 bei ER <sup>-</sup> Tumoren	37
4.8. Überleben in Abhängigkeit vom MDM4 SNP 31826 und 34091 . . . . .	41
4.9. Überleben in Abhängigkeit vom MDM4 SNP 31826 und p53 Cd72 SNP	43
4.10. Überleben in Abhängigkeit vom MDM4 SNP 34091 und p53 Cd72 SNP	44
A.1. Mutationsprofile des EC [entnommen aus 17] . . . . .	73
A.2. Molekulargenetische Klassifikation des EC [entnommen aus 17] . . . . .	73

## Tabellenverzeichnis

3.1. Klinisch-pathologische Daten der Studienpopulation . . . . .	15
3.2. Verwendete Primer . . . . .	17
3.3. Annealingtemperatur . . . . .	19
4.1. Allelverteilung des p53 Codon72 SNP in der Studienpopulation . . .	23
4.2. Diagnosealter im Vergleich zum Durchschnittserkrankungsalter . . .	24
4.3. Einfluss des p53 Codon72 SNP auf das Diagnosealter . . . . .	24
4.4. Einfluss des p53 Codon72 SNP auf das Überleben . . . . .	25
4.5. Einfluss des p53 Codon72 SNP auf klinisch-pathologische Parameter	26
4.6. Allelverteilung des MDM2 SNP 309 in der Studienpopulation . . . .	27
4.7. Diagnosealter im Vergleich zum Durchschnittserkrankungsalter . . .	28
4.8. Einfluss des MDM2 SNP 309 auf das Diagnosealter . . . . .	28
4.9. Einfluss des MDM2 SNP 309 auf das Überleben . . . . .	29
4.10. Einfluss des MDM2 SNP 309 auf klinisch-pathologische Parameter .	30
4.11. Allelverteilung des MDM4 SNP 31826 in der Studienpopulation . . .	30
4.12. Diagnosealter im Vergleich zum Durchschnittserkrankungsalter . . .	31
4.13. Einfluss des MDM4 SNP 31826 auf das Diagnosealter . . . . .	31
4.14. Einfluss des MDM4 SNP 31826 auf das Überleben . . . . .	32
4.15. Einfluss des MDM4 SNP 31826 auf klinisch-pathologische Parameter	34
4.16. Allelverteilung des MDM4 SNP 34091 in der Studienpopulation . . .	34
4.17. Diagnosealter im Vergleich zum Durchschnittserkrankungsalter . . .	35
4.18. Einfluss des MDM4 SNP 34091 auf das Diagnosealter . . . . .	35
4.19. Einfluss des MDM4 SNP 34091 auf das Überleben . . . . .	36
4.20. Einfluss des MDM4 SNP 34091 auf klinisch-pathologische Parameter	38
4.21. Genotypenkombinationen der MDM4 SNP 31826 und 34091 . . . . .	39
4.22. Einfluss der MDM4 SNP 31826 + 34091 auf das Diagnosealter . . .	40
4.23. Einfluss der MDM4 SNP 31826 + 34091 auf das Überleben . . . . .	41
4.24. Einfluss des MDM4 SNP 31826 + p53 Codon72 auf das Überleben .	43
4.25. Einfluss des MDM4 SNP 34091 + p53 Codon72 auf das Überleben .	44
4.26. Einfluss des p53 Codon 72 SNP auf das Typ-II-EC . . . . .	45
4.27. Einfluss des MDM2 SNP 309 auf das Typ-II-EC . . . . .	46
4.28. Einfluss des MDM4 SNP 31826 auf das Typ-II-EC . . . . .	46
4.29. Einfluss des MDM4 SNP 34091 auf das Typ-II-EC . . . . .	46

A.1. Stadieneinteilung des EC nach TNM und FIGO [entnommen aus 25]	74
A.2. SNP - Allelfrequenzen in Kontroll- und europäischer Population [entnommen aus ncbi - SNP - Datenbank] . . . . .	75

# 1. Einleitung

## 1.1. Endometriumkarzinom

### 1.1.1. Epidemiologie

Das Endometriumkarzinom (EC) ist mit 10930 Neuerkrankungen pro Jahr (Stand 2012; Prognose für 2016: 10800) das häufigste Malignom des weiblichen Genitals sowohl in Deutschland als auch der westlichen Welt. Es steht mit einem Anteil von 4,8% aller bösartigen Neubildungen an der vierten Stelle aller Karzinome der Frau (weltweit: fünfte Stelle). In Deutschland erkrankt damit eine von 49 Frauen im Laufe ihres Lebens am EC, wohingegen nur eine von 200 daran verstirbt. Während die altersstandardisierte Inzidenz in den letzten Jahren einen rückläufigen Trend zeigte, blieb die Sterberate weitestgehend auf konstant niedrigem Niveau. So verursachte das EC 2012 nur 2,5% aller krebsbedingten Todesfälle in Deutschland (weltweit 2,1%) und steht damit an der elften Stelle der Krebstodesursachenstatistik. Weltweit lassen sich erhebliche Unterschiede bezüglich der regionalen Inzidenzen feststellen, die stark mit dem Lebensstandard, vor allem der Prävalenz des Metabolischen Syndroms und der steigenden Lebenserwartung korrelieren. So werden in westlichen Nationen, insbesondere in Nordamerika und im westlichen Europa, die höchsten Neuerkrankungsraten registriert [1–3]. Das mittlere Erkrankungsalter des EC liegt bei 69 Jahren. Es handelt sich dementsprechend um eine Erkrankung der Postmenopause. In 20% der Fälle manifestiert sie sich jedoch bereits prämenopausal und in 5% vor dem 45. Lebensjahr [4]. Die Diagnose findet in der Regel (80%) in frühen Tumorstadien (T1) statt und ist im Allgemeinen mit einer guten Prognose (5-Jahres-Überlebensrate über allen Stadien: 80%) assoziiert [2, 5].

### 1.1.2. Pathogenese und Risikofaktoren

85-90% der EC entstehen infolge östrogenener Überstimulation mit fehlender Gestagenantagonisierung. Östrogene wirken proliferativ auf das Endometrium, wohingegen Progesteron die Ausdifferenzierung der Zellen initiiert. Bleibt diese Differenzierung aus, kommt es zur unkontrollierten Proliferation des Endometriums, woraus eine Endometriumhyperplasie und in der Folge ein EC entstehen kann [6, 7]. Interner

als auch externer Östrogenexzess zählen deshalb zu den wichtigsten Risikofaktoren des EC. Zu endogener Östrogenexposition führen beispielsweise Adipositas (Prävalenz von 70-90% [8, 9]), Polyzystisches Ovarsyndrom, Leberzirrhose und östrogenbildende Tumoren. Auch Frauen mit einer frühen Menarche und einer späten Menopause, sowie diejenigen, die spät oder keine Kinder geboren haben, zeigen aufgrund langjähriger kontinuierlicher Östrogenstimulation ein erhöhtes Risiko für ein EC [10]. Die Zufuhr von synthetischen Östrogenen bei Hormonersatztherapie sowie die Einnahme von Antiöstrogenen, wie Tamoxifen, die über den körpereigenen Feedbackmechanismus zur Mehrproduktion von Östrogenen führen, gelten als weitere externe Risikofaktoren [11, 12]. Die Rolle der Diabetes mellitus Typ II bedingten Hyperinsulinämie als EC bezogener Risikofaktor wird kontrovers diskutiert. Zwar kennt man die promotische Wirkung des Insulins [13] und seine Schlüsselstellung in der ovariellen Androgen- und hepatogenen Synthese des Steroidhormonbindenden Globulins (SHBG) [14], ein relevanter Einfluss auf das Erkrankungsrisiko konnte jedoch nur in einer von vier Studien gezeigt werden [15]. Neben diesen speziellen gibt es natürlich allgemeine Risikofaktoren wie zunehmendes Alter, Exposition zellschädigender Agenzien wie Chemotherapeutika und Bestrahlung. Letztlich sind familiäre Prädispositionen bekannt, wie das Hereditäre-Nonpolypöse-Kolonkarzinom-Syndrom [10, 16].

### **1.1.3. Klassifikation**

Man differenziert klassischerweise zwischen 2 Typen des EC, die sich hinsichtlich Ätiologie, Krankheitsverlauf und Prognose voneinander unterscheiden: 85-90% der EC entstehen östrogenabhängig auf dem Boden einer Endometriumhyperplasie und werden als Typ-I-EC, oder entsprechend ihrer Histologie als endometroide EC bezeichnet. Sie treten früher auf, sind gut differenziert und haben eine gute Prognose. Typ-II-EC (10-15%) entwickeln sich hingegen östrogenunabhängig in atrophem Endometrium. Sie zeigen in der Regel eine niedriggradige histologische Differenzierung, unterschiedlicher, teils gemischter Zelltypen und werden daher vereinfacht auch als non-endometroide EC bezeichnet: 90% imponieren als seröse-, 35% als klarzellige Karzinome und 60-90% als Karzinosarkome [17]. Typ-II-EC manifestieren sich zudem eher im höheren Alter und sind mit einer ungünstigen Prognose assoziiert [18]. Immer häufiger zeigen sich jedoch Abweichungen bezüglich der Prognose des klinischen Verlaufes aufgrund dieser strikten Zweiteilung. So findet man beispielsweise auch bei 15-20% der endometroiden EC (Typ-I) sogenannte „high-grade“-Läsionen und eine Rezidivwahrscheinlichkeit von 20%, während dies nur bei etwa der Hälfte aller Typ-II-EC der Fall ist [19]. Ein rein dualistisches Modell scheint dem EC demzufolge nicht gerecht zu werden, weshalb sich die Forschung der letzten Jahre auf die Identifizierung molekulargenetischer Merkmale konzentrierte. Dabei

fand man bei endometrioiden EC gehäuft Mutationen im PIK3CA-Signalweg (90%), KRAS-Gen (20%) und FGFR2-Gen, wohingegen Typ-II-EC kein einheitliches Mutationsprofil zeigten (siehe Abbildung A.1 im Anhang) [20–22]. Im Weiteren gelang es, eine neue molekulargentische Subklassifizierung des EC zu etablieren. Diese unterscheidet, wie in Abbildung A.2 (im Anhang) dargestellt, 4 Subgruppen: „POLE ultramutated“, „Microsatellite instability hypermutated“, „Copy-number-low microsatellite stable“ und „copy-number-high serous-like“. Während die Typ-II-EC auch in dieser Einteilung einer Gruppe („copy-number-high serous-like“) zugeordnet werden, ist auf diese Weise eine präzisere Subklassifizierung und Risikostratifizierung des endometrioiden EC möglich. In diesem Zusammenhang sind insbesondere die oben benannten „high-grade“-Typ-I-EC von Interesse: Etwa ein Viertel von ihnen gehören zu den „copy-number-high serous-like“-Tumoren, die mit einer schlechten Prognose assoziiert sind. Ein weiteres Viertel lässt sich jedoch den prognostisch günstigen „POLE ultramutated“-Karzinomen zuordnen. Durch die Evaluierung des POLE-Mutationsstatus und der Kopienzahlveränderungen im Rahmen der Diagnostik können damit künftig aggressive Tumore frühzeitig identifiziert und gezielt behandelt werden [17, 20].

#### **1.1.4. Klinik und Diagnostik**

Leitsymptom des EC ist die irreguläre vaginale Blutung, die sich prämenopausal als Meno- oder Metrorrhagie äußert oder als Postmenopausenblutung (PMB) auftritt. 90% aller EC werden initial durch eine solche Blutung diagnostiziert, weshalb sie immer als suspekt zu werten ist [16, 23, 24]. Als Prädiktoren für das Vorliegen eines EC, im Falle einer PMB, gelten: ein hohes Alter, das wiederholte Auftreten und die Stärke der Blutung [24]. Weitere Symptome können wehenartige Unterbauchschmerzen und dunkelbrauner, fötide riechender vaginaler Ausfluss sein [10, 16].

Jede postmenopausale Blutung sollte, unabhängig von der sonografisch ermittelten Schleimhautdicke und -struktur, histologisch abgeklärt werden. Die hierfür nötige Probenentnahme erfolgt invasiv im Rahmen einer Hysteroskopie durch fraktionierte Abrasio [25].

Ergibt sich daraus ein positiver Karzinombefund, schließt sich das prätherapeutische Staging zur Erfassung der Krankheitsausdehnung, im Sinne des FIGO- beziehungsweise TNM- Stadiums (siehe Tabelle A.1), und Planung des chirurgischen Regimes an. Hierbei sind vor allem die Evaluation der Myometrium- und Zervixinvasionstiefe sowie der Lymphknotenbefall von Bedeutung. Diagnostikum der Wahl stellt die Magnetresonanztomographie dar, obgleich sie eine operative Exploration bislang nicht ersetzen kann. Obligatorisch sind des Weiteren die röntgenologische beziehungsweise sonografische Beurteilung des Thorax und Abdomens [17, 25].

Tumormarker, wie CA-125, und andere pathobiochemische oder molekulargenetische Biomarker, die die Diagnose stützen und Progression oder Regression im Krankheitsverlauf anzeigen, spielen derzeit eine untergeordnete Rolle im klinischen Alltag [10, 17]. Allerdings gibt es Bestrebungen diese weiter, insbesondere in die frühe Diagnostik, zu integrieren. HAVRILESKY et al. schlagen beispielsweise ein „5-Biomarker-Panel“ aus Prolaktin, Wachstumshormon, Eotaxin, E-selectin und TSH vor [26]. Andere propagieren molekulargenetische Prädiktoren, wie das Vorliegen von Mutationen von Stathmin [27], L1CAM [28] und POLE [20].

Ein generelles Screening bei asymptomatischen Frauen ohne Risikofaktoren wird zurzeit noch nicht empfohlen, da die Messung der Endometriumdicke durch transvaginale Ultraschografie eine eingeschränkte Aussagekraft besitzt und eine Endometriumbiopsie zu aufwändig und invasiv ist. Ein potentieller Nutzen für Hochrisikopatientinnen mit obengenannten Risikofaktoren oder hereditärer Belastung wird aktuell diskutiert, konnte bisher aber noch nicht belegt werden [25].

### **1.1.5. Therapie**

Die Basistherapie des EC ist in allen Stadien die operative, möglichst laparoskopische, Entfernung der Gebärmutter und beider Adnexe. Ab Stadium pT1b (vergleiche Tabelle A.1) sowie bei schlechter Zelldifferenzierung (G3) und Typ-II-EC sollte zusätzlich die Lymphadenektomie aller pelviner und paraaortaler Lymphknoten bis zum Nierenstiel durchgeführt werden. Bei fortgeschrittenen Typ-I-(T3a) und Typ-II-EC erfolgt außerdem eine Omentektomie und die Entnahme mehrerer Peritonealbiopsien. Dieses Vorgehen verschafft einerseits, wie oben bereits erwähnt, einen Überblick über die Krankheitsausdehnung und bildet so Grundlage weiterer Therapieindikationen. Andererseits reduziert es die Tumormasse, beugt karzinombedingten Blutungen vor und verbessert auf diese Weise auch die Prognose nicht mehr kurabler Tumorstadien [10, 25].

Ein konservatives Vorgehen mit kontinuierlicher hochdosierter Gestagensubstitution ist nur in frühen Stadien (T1a) eines gut differenzierten Typ-I-EC, bei nicht abgeschlossener Familienplanung, unter engmaschiger Kontrolle zu erwägen. Nach erfülltem Kinderwunsch sollte aufgrund einer hohen Rezidivgefahr zeitnah die stadiengerechte chirurgische Therapie erfolgen [10, 25].

Ergänzend zu dieser wird in Abhängigkeit vom Tumorstadien eine adjuvante Radiotherapie empfohlen. Sie senkt nachweislich das lokoregionäre Rezidivrisiko. Der Einfluss auf das Gesamtüberleben ist jedoch umstritten und scheint zumindest in frühen Stadien nicht gegeben zu sein. Je nach Tumorausbreitung und -differenzierung kommen die vaginale Brachytherapie (frühe Stadien ab IA mit schlechter Differenzierung oder

IB mit guter Differenzierung) oder die Ganzabdomenbestrahlung mit pelvinen und paraaortalem Boost zum Einsatz (Späte Stadien > III oder schlechter Differenzierung). Die primäre Strahlentherapie ist lediglich im Falle der Inoperabilität indiziert und dient dann der palliativen Symptomkontrolle [25].

Die systemische Therapie mit Chemotherapeutika (Kombination eines Platinpräparates mit Paclitaxel) spielt bei der kurativen Behandlung des EC eine untergeordnete Rolle und konnte nur in fortgeschrittenen Tumoren (FIGO III-IV) und schlecht differenzierten „high-risk“-Karzinomen einen Vorteil gegenüber der Radiatio zeigen. Sie stellt eine Möglichkeit zur palliativen Symptomkontrolle dar, wobei in beiden Fällen kein zusätzlicher Nutzen zur alleinigen symptomatischen Therapie eruiert werden konnte [10, 25].

### **1.1.6. Prognose**

Das EC ist in der Regel, mit einer über allen Stadien ermittelten 5-Jahres-Überlebensrate von 80%, mit einer guten Prognose assoziiert [5]. Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei etwa 90% der Diagnosen um die weniger malignen, langsam wachsenden Typ-I-EC, die zu knapp 80% im frühen T1-Stadium entdeckt werden und zu diesem Zeitpunkt eine 5-Jahres-Überlebensrate von 80-90% haben. Nur etwa 15% der Fälle werden in fortgeschrittenen T3- oder T4- Stadien diagnostiziert, bedingen jedoch 50% der Rezidive und tumorbedingten Todesfälle [16, 29]. Als prognostisch günstig gelten: Progesteronrezeptor-Positivität, Typ-I-EC mit „low-grade“-Differenzierung, ein frühes Tumorstadium einhergehend mit geringer oder keiner Myometriuminfiltration und fehlendem Lymphgefäßeinbruch [16, 17]. Der BMI der Patientinnen scheint ebenfalls einen Einfluss auf das tumorbedingte Überleben zu haben. Die höchsten Mortalitätsraten wurden sowohl bei extrem unter- als auch übergewichtigen Frauen registriert. Untergewichtige Frauen entwickeln in der Regel ein aggressives Typ-II-EC, welches per se mit einem schlechten Outcome verbunden ist. Übergewichtige Frauen erkranken meist an prognostisch günstigen Typ-I-EC, weisen jedoch häufig zusätzlich zahlreiche, limitierende Komorbiditäten, wie Diabetes mellitus und Bluthochdruck, auf [8, 30, 31]. Trotz verbesserter Diagnose- und Therapiemöglichkeiten konnte die altersstandardisierte Sterberate in den letzten Jahren nicht weiter gesenkt werden und stagniert auf einem konstant niedrigen Niveau. Derzeit verstirbt etwa eine von 200 am EC erkrankten Frauen [5].

## 1.2. Zellzykluskontrolle und Einfluss verschiedener Polymorphismen

Grundlage für die Karzinogenese ist eine defizitäre Zellzyklusregulation in proliferierendem Gewebe. Unter physiologischen Bedingungen unterliegt jede Zelle einem streng regulierten vierphasigen Proliferationszyklus, der eine fehlerfreie Weitergabe des Genoms an die Tochterzellen garantiert, das heißt Schäden des Erbguts detektiert und wenn möglich repariert oder Apoptose einleitet. Wird dieses komplexe Netzwerk durch ein Ungleichgewicht von pro- und antimitotischen Signalen oder gain-beziehungsweise loss-of-function-Mutationen von Onko-/Tumorsuppressorgenen gestört, können sich betroffene Zellen im Weiteren ungehindert teilen. Ein Schlüsselprotein des beschriebenen Netzwerkes ist p53, auf welches im Folgenden näher eingegangen werden soll.

### 1.2.1. p53

Der Transkriptionsfaktor p53 wurde 1979 entdeckt und ist seither als sogenannter „Wächter des Genoms“ bekannt [32, 33]. Er ist für die Veranlassung einer spezifischen Stressantwort verantwortlich, welche die Integrität des Genoms wahren und Tumorentstehung verhindern soll. Wie wichtig die Erfüllung dieser Aufgabe ist, wird deutlich, wenn p53 mutationsbedingt ausfällt, wie es bei einer Vielzahl hereditär und sporadisch auftretender Tumoren der Fall ist [34, 35]. Um diese Funktion zu erfüllen, ist p53 in ein komplexes Netz aus Regulatoren und Koaktivatoren integriert. Steht eine Zelle unter Stress, wie beispielsweise DNA-Schädigung, Telomerverkürzung, Hypoxie, Onkogenaktivierung oder Nährstoffmangel, wird je nach Ausmaß des Schadens entweder Zellzyklusarrest und DNA-Reparatur oder Apoptose induziert. Welcher dieser Wege eingeschlagen wird, entscheiden verschiedene Faktoren, wie das Vorhandensein extrazellulärer Überlebensfaktoren, die Präsenz weiterer onkogener Mutationen oder die Verfügbarkeit von Transkriptions- und Koaktivatoren sowie die Art und Intensität der zellulären Noxe, die unterschiedlich hohe p53-Proteinlevel bewirken [zusammengefasst in 36, 37]. p53 kann weiterhin die Expression einiger proliferativer, proangiogentischer Gene, wie zum Beispiel VEGF-A, unterdrücken und so der Tumorentstehung entgegenwirken [38, 39].

Die vielfältigen zentralen Funktionen von p53 erfordern eine strikte Regulation der Stabilität und Aktivität des Transkriptionsfaktors, die über zahlreiche Regelkreise auf nahezu allen Ebenen, das heißt von der Transkription bis zur posttranslationalen Modifikation, gewährleistet wird [zusammengefasst in 40]. Im Mittelpunkt steht die Stabilisierung und die damit verbundene zelluläre Konzentration von p53. Unter physiologischen Bedingungen werden die zytosolischen p53-Proteinlevel gering gehalten

und p53, nach einer kurze Halbwertszeit, Ubiquitinligase-medierte, der proteosomalen Degradation zugeführt. An diesem Prozess sind verschiedene E3-Ubiquitinligasen beteiligt, wie E6-AP, Arf-Bindeprotein 1 [41], COP1 [42], Pirh2 [43], Synoviolin [44] und MDM2 [45]. Das „murine-double-minute 2“-Protein (MDM2), bestehend aus 3 Domänen mit insgesamt 491 Aminosäuren, ist der wichtigste Negativregulator des p53 und ist mit ihm eng über eine autoregulatorische Rückkopplungsschleife verknüpft [zusammengefasst in 45, 46]. Das zugehörige Gen befindet sich auf dem Chromosomenabschnitt 12q13-14 und wird über zwei Promotoren, P1 und P2, reguliert [47]. Vor dem zweiten Promotor P2 befindet sich ein p53-bindendes Element, worüber p53 die Expression von MDM2 stimuliert [48]. MDM2 wiederum destabilisiert und inaktiviert p53 auf vielfältige Weise, wobei die wesentlichen Mechanismen die bereits erwähnte Ubiquitinierung von p53, durch die C-terminale Ringdomäne mit E3-Ubiquitinligase-Aktivität und die Maskierung der promotorspezifischen Bindestellen durch Bindung der N-terminalen Transaktivierungsdomäne sind [45, 49]. Unter dem Einfluss von zellulärem Stress wird p53 über zahlreiche Wege stabilisiert und der beschriebene Regelkreis mit MDM2 durchbrochen. Eine Möglichkeit besteht in der Phosphorylierung beider Proteine durch stressinduzierte Kinasen (Casein-Kinase1/2, ATM, ATR, CHK1/2, JNK, DNA-PK [zusammengefasst in 50]), wodurch ihre Interaktion gehemmt und die Stabilität des p53 erhöht wird [zusammengefasst in 51]. Eine Andere wird beispielsweise durch die Hemmung von MDM2, durch Inhibition seiner Transkription oder durch p14ARF-medierte Blockierung seiner Funktion realisiert [52]. p14ARF induziert zudem, in Abhängigkeit von Onkogenaktivierung, die Expression von p53 [53]. Ein weiterer wichtiger Regulator ist das 490 Aminosäuren umfassende Protein MDM4, welches große strukturelle Ähnlichkeiten zu MDM2 aufweist, jedoch, im Bezug auf p53, ambivalente Funktionen hat. Es bindet einerseits, wie MDM2, die Transaktivierungsdomäne des p53 und bildet über die C-terminale Ringdomäne Heterodimere mit MDM2, wodurch dieses stabilisiert und die Aktivität des Tumorsuppressors infolge dessen reduziert wird [46, 54, 55]. Andererseits schützt MDM4 p53 vor der MDM2-medierte Degradation [56].

Ebenso vielfältig wie die Regulation der Stabilität, ist die Regulation der Aktivität von p53. Durch posttranslationale Modifizierungen, wie (De-)Phosphorylierungen [57], Acetylierungen [58], Glykosylierungen [59], Ribosylierungen [60] oder Sumoylation [61], können die C-terminalen sequenzspezifischen DNA-Bindestellen und so die Transkriptionsaktivität des p53 sowie sein Oligomerisierungszustand und Promotorspezifität variiert werden. Diese werden durch Transkriptionskoaktivatoren, wie zum Beispiel p300, CBP oder PCAF, mediiert oder sind durch DNA-Schädigungen induzierbar [62].

### **1.2.2. Einfluss von Einzelnukleotidpolymorphismen auf die Regelkreisläufe des p53**

Einzelnukleotidpolymorphismen (englisch: single nucleotide polymorphisms, SNP) sind die häufigsten genetischen Variationen, die im Gegensatz zu Mutationen mit einer höheren Allelfrequenz von über 1% in der Population auftreten [63]. Sie können sowohl in kodierenden als auch nicht-kodierenden Bereichen der DNA lokalisiert sein. Die Stärke ihrer Auswirkungen auf den Organismus, wie zum Beispiel die Anfälligkeit für Krankheiten oder das Ansprechen auf Therapiestrategien, kann dementsprechend erheblich variieren. Bisher wurden, entsprechend der Datenbank des „National Center for Biotechnology Information“ (ncbi, Stand 04/2016), 154 Millionen SNP im humanen Genom identifiziert, 1335 davon in 82 Genen des p53-Regelkreislaufes [64].

#### **p53 Codon72-Polymorphismus (rs1042522)**

Ein gut untersuchter Polymorphismus im TP53-Gen befindet sich im Codon 72, welches in der prolinreichen Sequenz zwischen der N-terminalen Transaktivierungs- und der zentralen DNA-Bindungsdomäne im vierten Exon gelegen ist. Es kodiert in der Wildtypsequenz, Cytosin-Guanin-Cytosin, für die Aminosäure Arginin (Arg). Beim beschriebenen Polymorphismus kommt es zu einem Basenaustausch des Guanins zu einem Cytosin (G > C), was die Translation der Aminosäure Prolin (Pro) nach sich zieht [65]. Aufgrund der Lage in der Polyprolinsequenz, die für die Apoptoseinduktion von Bedeutung ist, ergibt sich je nach Aminosäure eine unterschiedliche Funktionsfähigkeit des p53 [66]. Die Allele unterscheiden sich weiterhin in ihrer Kapazität, die Transkription ihrer Zielgene zu initiieren und mit anderen Tumorsuppressoren wie p73 zu interagieren sowie ihrer Anfälligkeit gegenüber der MDM2-medierten Degradation. Demnach ist die Arginin-Form des p53 häufiger an Mitochondrien lokalisiert und interagiert daher besser mit proapoptotischen Proteinen. Folglich weist sie eine größere Kapazität zur Apoptoseinduktion auf und ist effektiver in der Unterdrückung der Transformation als die Prolin-Variante. Für den Organismus bedeutet das zunächst einen gewissen Schutz vor der Entstehung von Tumoren, bei Manifestation eines Malignoms jedoch eine verkürzte Überlebenszeit [67–69]. Diese proapoptische Wirkung konnte auch unter Chemotherapie beobachtet werden und korrelierte mit einem besseren Therapieansprechen im Vergleich zur Prolin-Form [70]. Für Letztere konnte jedoch gezeigt werden, dass sie mehr G1-Zellzyklusarrest und p53-abhängige DNA-Reparatur initiiert. Dementsprechend konnte man dieses Allel mit einer höheren Tumorzinzidenz auf der einen Seite und einem verlängerten Überleben auf der anderen Seite assoziieren [63, 71]. Die klinische Relevanz dieser Daten wurde vielfach untersucht, was zum Teil konträre Aussagen hervorbrachte. Man schloss daraus, dass der Allelstatus des p53-Codon72-SNP immer im Kontext mit anderen

Faktoren, wie Mutationen und populations- oder geschlechtsspezifischen Merkmalen untersucht werden sollte. DAHABREH et al. fasste die vorhandenen Daten über den Einfluss dieses SNP auf die vier häufigsten Tumoren in einer Metaanalyse wie folgt zusammen: Für Mamma-, Kolon- und Endometriumkarzinome besteht wahrscheinlich keine Assoziation, wohingegen eine schwache Korrelation der Prolin-Form mit dem Auftreten von Lungenkarzinomen verzeichnet werden konnte [72].

### **MDM2 SNP 309 (rs2279744)**

Dieser Polymorphismus umfasst einen Basenaustausch von Thymin zu Guanin (T > G) an der 309. Position des ersten Introns des MDM2-Gens [73]. In dieser Region befindet sich ebenfalls der zweite, p53-abhängige Promotor, der unter zellulärem Stress die Expression von MDM2 initiiert [74]. Der Basenaustausch hat eine Verlängerung der Bindungsstelle des Kotranskriptionsaktivator SP1 zur Folge, was mit einer vierfach höheren Affinität desselben einhergeht. Das Guanin-Allel verursacht aus diesem Grund erhöhte MDM2-Level sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene. Daraus resultieren erniedrigte p53-Konzentrationen, verbunden mit reduzierter Funktionsfähigkeit, insbesondere in Bezug auf die Initiation von DNA-Reparatur und Apoptose. Für den Organismus hat dies eine beschleunigte Akkumulation von Mutationen und daher eine erhöhte Anfälligkeit für die Entstehung von Tumoren zur Folge [73]. Einige Studien konnten diesen Zusammenhang nur bei Frauen feststellen, was einen Zusammenhang mit dem Östrogenstoffwechsel nahelegte und den Fokus der Forschung auf hormonsensitive Tumoren rückte [75, 76]. Eine Studie an Mammakarzinompatientinnen, eruierte ein 7 Jahre früheres Auftreten von östrogenrezeptorpositiven Tumoren bei Vorliegen des G-Allels [75]. Ein Zusammenhang mit Ovarialkarzinomen konnte allerdings nur in Verbindung mit p53-Mutationen und der Expression von BRCA1 und 2 beobachtet werden [77, 78]. 2007 untersuchten WALSH et al. erstmals den Einfluss des MDM2 SNP 309 auf das Auftreten von EC und ermittelten ein 2,76 fach erhöhtes Risiko für den G/G-Genotypen. Dieses Risiko bestand insbesondere für das östrogenabhängige Typ-I-EC der postmenopausalen Frau. Eine Assoziation zum Diagnosealter oder Tumorstadium konnte nicht gezeigt werden [79–81]. Eine Metaanalyse von WO et al. fasst die vorliegenden Daten wie folgt zusammen: Ein signifikant erhöhtes Risiko besteht bei homozygoter Ausprägung des G-Allels für das Bronchial-, Kolorektal-, Hepatozelluläre-, Magen- und Endometriumkarzinom sowie für die Akute Myeloische Leukämie. Ein erniedrigtes Risiko lässt sich hingegen für das Prostatakarzinom verzeichnen [82]. Die Auswirkungen des MDM2 SNP 309 werden offensichtlich von weiteren Faktoren beeinflusst, wie zum Beispiel dem Hormonrezeptorstatus. Bereits 1993 konnte gezeigt werden, dass Zellen mit Östrogenrezeptorbesatz 30 mal mehr MDM2 exprimieren als östrogenrezeptornegative [83]. Vermittelt wird dieser Effekt über den Östrogenrezeptor  $\alpha$  (ER  $\alpha$ ), welcher im Komplex mit Östrogen als Transkriptionsfaktor in der Region

des P2-Promotors bindet und die Expression von MDM2 in Kooperation mit SP1 aktiviert. Da die Bindungsaffinität von SP1 durch das G-Allel des MDM2 SNP 309 verstärkt wird, steigt die östrogenabhängige MDM2-Expression [84–86]. Vor dem Hintergrund, dass die Tumorgenese nicht auf singulären genetischen Veränderungen beruht, untersuchten einige Studien, neben dem Einzeleffekt des MDM2 SNP 309, zusätzlich die Auswirkung dieses SNP in Kombination mit anderen, zum Beispiel dem p53 Codon72 SNP. Dabei konnten sie für die Kombination G/G (MDM2 SNP 309) + Arg/Arg (p35 Codon72) ein erhöhtes Erkrankungsrisiko und eine Assoziation zur schlechteren Differenzierung der Tumoren feststellen. Sie folgerten aus diesen Beobachtungen, einen größeren Effekt der kombinierten Genotypen, auf die sich künftige Studien fokussieren sollten [87–90].

### **MDM4 SNP 31826 (rs1563828)**

MDM4 spielt, wie sein Strukturhomologon MDM2, eine wesentliche Rolle im Regelkreis des Tumorsuppressors p53. Für genetische Alterationen und Polymorphismen im entsprechenden Gen wird deshalb ein Einfluss auf die Karzinogenese vermutet und aktiv untersucht. ATWAL et al. publizierten 2009 erstmals den Zusammenhang verschiedener Polymorphismen im MDM4-Gen mit dem Auftreten von Ovarialkarzinomen und ermittelte für den MDM4 SNP 31826 eine Korrelation mit dem Diagnosealter der Patientinnen. Dieser befindet sich im zehnten Intron des MDM4-Gens und umfasst einen Einzelbasenaustausch von einem Cytosin zu einem Thymin (C > T) [91, 92]. Mit welchen zellulären Veränderungen dieser Basenaustausch einhergeht, ist bisher allerdings noch nicht eindeutig geklärt. Man geht davon aus, dass das T-Allel einen direkten oder indirekten Einfluss auf alternative Spleißvorgänge der MDM4-mRNA nimmt und die Expression von kürzeren MDM4-Isoformen, MDM4-S oder MDM4-211, zur Folge hat. MDM4-S bindet p53 und hemmt seine Funktion als Transkriptionsfaktor besser als die langen MDM4-Isoformen [93]. MDM4-211 wiederum stabilisiert MDM2, woraus eine gesteigerte Degradation des p53 resultiert [94]. Kurze MDM4-Isoformen haben außerdem eine geringere Affinität zu 14-3-3, welches nach stressinduzierter Phosphorylation des MDM4 dessen Kernimport mediiert, wo die MDM2-abhängige Degradation stattfindet [95]. Beide Isoformen tragen dementsprechend zu einer Stabilisierung des MDM4, verbunden mit einer verstärkten p53-Inaktivierung, bei, woraus eine beschleunigte Kanzerogenese resultiert. Eine bevorzugte Expression kurzer MDM4-mRNA-Isoformen bedeutet außerdem ein reduziertes Level an gewöhnlicher, der „full-length“- , MDM4-mRNA (MDM4-FL), sodass sich das zelluläre Verhältnis MDM4-S / MDM4-FL zugunsten der kurzen Spleißvariante verschiebt. Verschiedene Studien an Weichteil- [96] und Osteosarkomen [97], Glioblastomen [98] und papillären Schilddrüsenkarzinomen [99] konnten dieses Ungleichgewicht beobachten und mit fortgeschrittenen Tumorstadien, einem höheren Metastasierungsrisiko und schlechteren Überleben assoziieren. Ob

die Ausprägung des Thymin-Allels des MDM4 SNP 31826 der Grund für die Überexpression kurzer MDM4 Isoformen ist, wurde in diesen Studien allerdings nicht untersucht. Vor diesem Hintergrund würde man demnach ein erhöhtes Tumorrisko und/oder eine Prognoseverschlechterung bei Vorliegen des T/T-Genotypen erwarten. Die Ergebnisse aus verschiedenen Studien an Ovarial-, ER-negativen Mamma- und Nasopharyngealkarzinompatienten konnten diese Zusammenhänge jedoch nur bedingt bestätigen. So konnte für das homozygote Minor-Allel (T/T) auf der einen Seite eine frühere Tumormanifestation beobachtet werden, was für eine akkzelerierte Tumorgenese spricht. Auf der anderen Seite zeigten diese Patienten im Vergleich zu den anderen Genotypen längere Überlebenszeiten [91, 92, 100]. Der Einfluss auf die Entstehung des EC ist bisher noch unklar.

#### **MDM4 SNP 34091 (rs4245739)**

2010 wurde ein weiterer Polymorphismus im MDM4-Gen entdeckt. Dieser befindet sich in der 3'-Untranslatierten Region (3'UTR) an der Position 34091 des Gens und bildet durch einen Einzelbasenaustausch von einem Adenin zu einem Cytosin (A > C) eine neue Bindungsstelle für mikro-RNA (hsa-miR-191 und miR-887) [101, 102]. Mikro-RNA sind ca. 22 Nukleotide umfassende, einzelsträngige, nicht-kodierende RNA-Moleküle, die der posttranskriptionalen Genregulation dienen. Sie binden, entsprechend der komplementären Basenpaarung, mRNA kodierender Gene und spalten diese [103] oder unterdrücken ihre Translation [104], woraus eine Destabilisierung und Reduktion der mRNA-Konzentration und damit eine Herunterregulierung bestimmter Gene resultiert [105]. Dies gilt auch für MDM4-mRNA mit Ausprägung des C-Allels am genannten Polymorphismus. Daraus resultiert eine sinkende MDM4-Konzentration und so eine Stabilisierung des p53. Entsprechend dieser Erkenntnisse erwartet man für das Wildtyp-Allel (T), welches nicht von hsa-miR-191 gebunden wird, erhöhte MDM4-Level, einhergehend mit einer abgeschwächten p53-Stressantwort und erhöhtem Tumorrisko. Dieser Effekt wurde seither vielfach untersucht und konnte für Non-Hodgkin-Lymphome [106], Prostata- [102, 107] und Ösophaguskarzinome [108] bestätigt werden. Untersuchungen an Ovarial- und Mammakarzinomen erbrachten heterogene Ergebnisse und konnten sowohl risikoreduzierende [101, 109, 110] als auch risikoerhöhende Effekte [111–114] zeigen. Für das EC ließ sich bisher keine Assoziation feststellen [114]. Als mögliche Erklärung für diese konträren Ergebnisse wurden zum Einen populationsspezifische Unterschiede der Allelverteilung angegeben und zum Anderen divergierende Mutationsprofile der einzelnen Karzinome in Betracht gezogen [114]. Es gibt weiterhin Anhaltspunkte für die Interaktion dieses SNP mit anderen. So zeigte bereits ATWAL et al. ein Kopplungsgleichgewicht („linkage disequilibrium“, LD) zwischen den beiden beschriebenen MDM4-Polymorphismen 31826 und 34091. Das bedeutet, dass sich ihr Allelstatus gleichsinnig verändert und sich die Effekte beider SNP möglicherweise

ergänzen [91]. Eine andere Studie postuliert des Weiteren einen Zusammenhang mit dem p53 Codon72 SNP an Brustkrebspatientinnen: Frauen mit Arg/Arg-Genotypen und mindestens einem C-Allel wiesen hierbei ein 0,16 faches Erkrankungsrisiko im Vergleich zu denen mit homozygoten Pro-Genotyp und T-Allel auf [109].

### **1.2.3. Einfluss von Östrogen auf die Tumorgenese und Regelkreisläufe des p53**

Ein weiterer wichtiger Faktor für die Entstehung von hormonsensitiven Tumoren ist der Östrogenstoffwechsel. Wie bereits erwähnt, beeinflussen Östrogene unter anderem die p53-Regelkreisläufe und wirken proliferativ. Sie können weiterhin die Sekretion von Wachstumsfaktoren, wie Interleukin 8 und VEGF, stimulieren und auf diesem Weg proangiogenetisch wirken [zusammengefasst in 115]. Des Weiteren wurden genotoxische Effekte des Östrogens und einiger seiner Derivate selbst sowie Defekte in deren Metabolismus, welche fehlerhafte Apoptose und DNA-Reparatur verursachen, nachgewiesen [87, 116]. Genetische Alterationen in entsprechenden Genen können aufgrund dessen die Tumorentstehung beeinflussen. Der Östrogeneffekt wird über zwei Rezeptoren vermittelt, Östrogenrezeptor (ER)  $\alpha$  und  $\beta$ , die große strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen [117], deren Gene, ESR1 und ESR2, jedoch auf unterschiedlichen Chromosomen (6p25-27 [118] beziehungsweise 14q22-24 [119]) lokalisiert sind [reviewed in 120]. Beide unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Funktionen: Während ER  $\alpha$  Differenzierung und Proliferation vermittelt, wirkt ER  $\beta$  eher modulierend und antiproliferativ, sodass die tatsächliche Östrogenwirkung von dem Expressionsverhältnis beider Rezeptoren abhängig ist [zusammengefasst in 120, 121]. Der ER  $\alpha$  greift auf unterschiedliche Weise in den MDM2-p53-Regelkreis ein: Zum Einen stimuliert er, wie bereits erwähnt, als Transkriptionsfaktor die Expression von MDM2 und hemmt auf diesem Weg die Funktion des p53. Zum Anderen schützt er im Komplex mit Östrogen p53 vor der MDM2-medierten Degradation [122]. Akkumuliertes p53 hemmt wiederum die ER  $\alpha$ -initiierte Transkription der Schlüsselgene, welche Zellproliferation und -progression beeinflussen [123–125]. Beide werden MDM2-abhängig abgebaut und unter zellulärem Stress stabilisiert [126]. Neuere Studien weisen außerdem auf Interaktionen des ER  $\alpha$  mit MDM4 sowohl auf Expressions- als auch auf Proteinebene hin, was den komplexen Regelkreis um einen zusätzlichen Akteur erweitert. Laut SWETZIG et al. stimuliert der ER  $\alpha$  auch die Expression von MDM4, p53-unabhängig, während MDM4 die ER  $\alpha$ -Expression im Sinne einer negativen Rückkopplungsschleife hemmt. Des Weiteren gibt es Hinweise für eine direkte oder indirekte Protein-Protein-Interaktion zwischen ER  $\alpha$  und MDM4 [127].

## 2. Zielstellung

Den Ausführungen der Einleitung folgend, stellt das EC eine relevante Erkrankung der Frau dar. Es ist zwar in der Regel mit einer guten Prognose assoziiert, jedoch gibt es nach wie vor, vor allem unter den Typ-I-EC, unvorhergesehene schlechte Verläufe. Durch die Identifizierung diverser genetischer Alterationen wie Mutationen, Kopienzahlveränderungen und Einzelnukleotidpolymorphismen, gelang es bereits, eine neue Subklassifizierung, basierend auf molekulargenetischen Merkmalen, zu etablieren. Sie stellt einen wesentlichen Beitrag für die Entwicklung einer präziseren Risikostratifizierung und individuelleren Therapie dar. Inwieweit bekannte Polymorphismen, wie der p53 Codon72 SNP, MDM2 SNP 309 und die MDM4 SNP 31826/34091, das EC beeinflussen und gegebenenfalls als weitere molekulargenetische Biomarker fungieren können, wurde bisher nicht endgültig geklärt. Insbesondere ihr Einfluss auf das Manifestationsalter und das Überleben wurde bislang unzureichend untersucht. Die Klärung dieser Fragen war daher das Ziel dieser Arbeit. Hierfür wurde die asservierte DNA eines bereits bestehenden Kollektives aus 170 EC-Patientinnen und 198 gesunden Kontrollen bezüglich ihrer Allelfrequenzen der vier SNP untersucht und mit klinischen Daten korreliert.

## 3. Material und Methoden

### 3.1. Material

#### 3.1.1. Studienpopulation

Grundlage der sich anschließenden Untersuchungen zum Einfluss der ausgewählten SNP auf die Entstehung des EC bildet ein Studienkollektiv aus 170 Frauen im Alter zwischen 39,8 und 86,9 Jahren, bei denen die Diagnose im Zeitraum von 1998 bis 2002 gestellt wurde. Sie wurden, entsprechend der geltenden Leitlinien, stadiengerecht zu etwa gleichen Teilen in den 3 großen gynäkologischen Kliniken des Raumes Halle (Universitätsklinikum Halle, Krankenhaus St. Elisabeth & St. Barbara Halle, Carl-von-Basedow-Klinikum Merseburg) operativ therapiert und bis 2005 nachbeobachtet. Die Zusammenstellung dieses Kollektivs und die Asservation der Tumor-DNA erfolgten bereits für eine frühere Arbeit „Prognosefaktoren in Endometriumkarzinomen“ von Annette Bangemann. Hier wurden zudem verschiedene klinische Merkmale, unter anderem zu Diagnosealter, Überlebensdauer, Histologie, Östrogenrezeptorexpression, Erkrankungsstadium und veranlasster Therapie, erfasst. In diesem Rahmen wurde außerdem das Einverständnis der Patientinnen zur Auswertung ihrer Daten in wissenschaftlichen Studien eingeholt. In Tabelle 3.1 wurden die wichtigen Charakteristika nochmals kurz zusammengefasst. Unter den 170 beobachteten Patientinnen erkrankten 92,4% an einem Typ-I- und 7,6% an einem Typ-II-EC, was in etwa der in der Literatur geläufigen Verteilung entspricht. Abbildung 3.1 zeigt die Verteilung der Diagnosealter. Im Mittel waren die Frauen zum Diagnosezeitpunkt 67,3 Jahre alt, wobei diejenigen mit einem Typ-I-EC etwa 4,3 Jahre (67,0 Jahre) früher erkrankten als diejenigen mit einem Typ-II-EC (71,3 Jahre). Über 90% der Fälle wurden in einem frühen FIGO I oder II-Stadium entdeckt. Die nachweisbare ER-Expression unterschied sich, entsprechend der Ätiologie, zwischen den Karzinomtypen: Während Typ-I-EC zu etwa gleichen Teilen als „ER-positiv“ beziehungsweise als „ER-negativ“ identifiziert werden konnten, ließen sich die Rezeptoren bei der Mehrzahl der Typ-II-EC (84,6%) nicht nachweisen. Ein weiterer deutlicher Unterschied konnte bezüglich der Überlebenszeiten festgestellt werden (siehe Abbildung 3.2): Am Ende des Beobachtungszeitraumes (2005) lebten 84,7% der am Typ-I- und nur 38,5% der am Typ-II-EC erkrankten Patientinnen.

Unter den Frauen, die am endometroiden EC verstarben, betrug die mittlere Überlebenszeit 82,1 Monate (95%-KI = 77,8-86,3). Typ-II-EC-Patientinnen verstarben hingegen bereits im Mittel nach 43,6 Monaten (95%-KI = 25,2-62,0), 50% von ihnen schon 29,8 Monate nach der Diagnosestellung. Dieser Unterschied war unabhängig von der ER-Expression.

**Tabelle 3.1.:** Klinisch-pathologische Daten der Studienpopulation

Charakteristika	Typ-I-EC	Typ-II-EC
Fallzahlen	157	13
<b>Diagnosealter in Jahren</b>		
Mittelwert	67,0	71,3
Median	68,8	71,4
<b>Histologie</b>		
	106 endometroid-klassisch	4 serös
	31 endometroid-squamös	3 klarzellig
	15 endometroid-sekretorisch	6 gemischtzellig
	5 endometroid-villoglandulär	
<b>Östrogenrezeptorbesatz</b>		
positiv	83	2
negativ	74	11
<b>Tumorstadium nach FIGO</b>		
I	117	8
II	30	1
III	10	4
<b>Therapie</b>		
Hysterektomie	3	0
+ Adnektomie	103	7
+ Lymphadenektomie	29	5
+ Kolektomie/Exenteration	3	0
Palliatives Debulking	1	0
Fehlende Daten	18	1
<b>Überleben</b>		
Am Tumor verstorbenen Fälle	24	8
Mittleres Überleben in Monaten	82,1	43,6

Als Vergleich dienten die Daten von insgesamt 182 gesunden Blutspenderinnen im Alter zwischen 19 und 85 Jahren, von denen jedoch nicht jeder Polymorphismus analysiert wurde, weshalb sich im Folgenden die Anzahl der Kontrollpersonen unterscheidet.

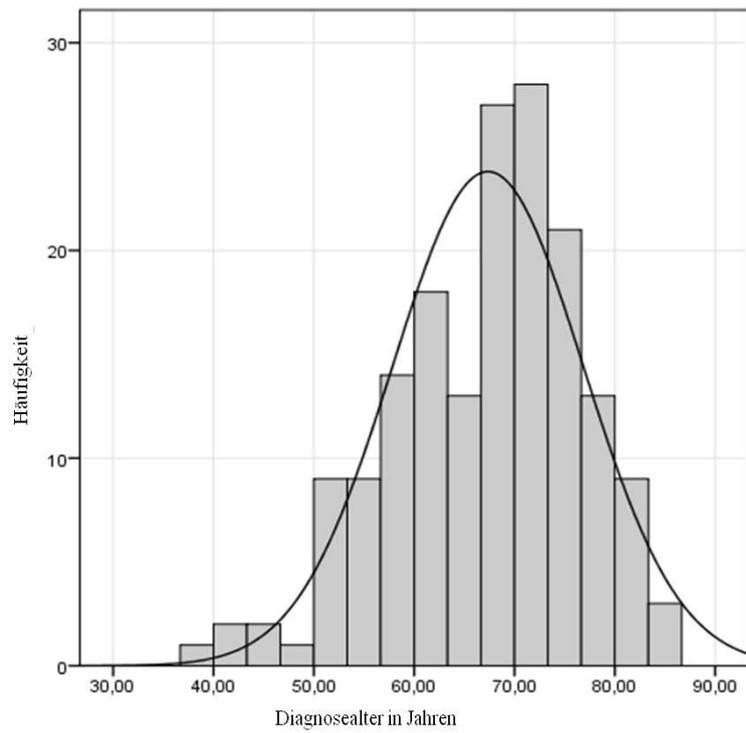


Abbildung 3.1.: Diagnosealter der Studienpopulation

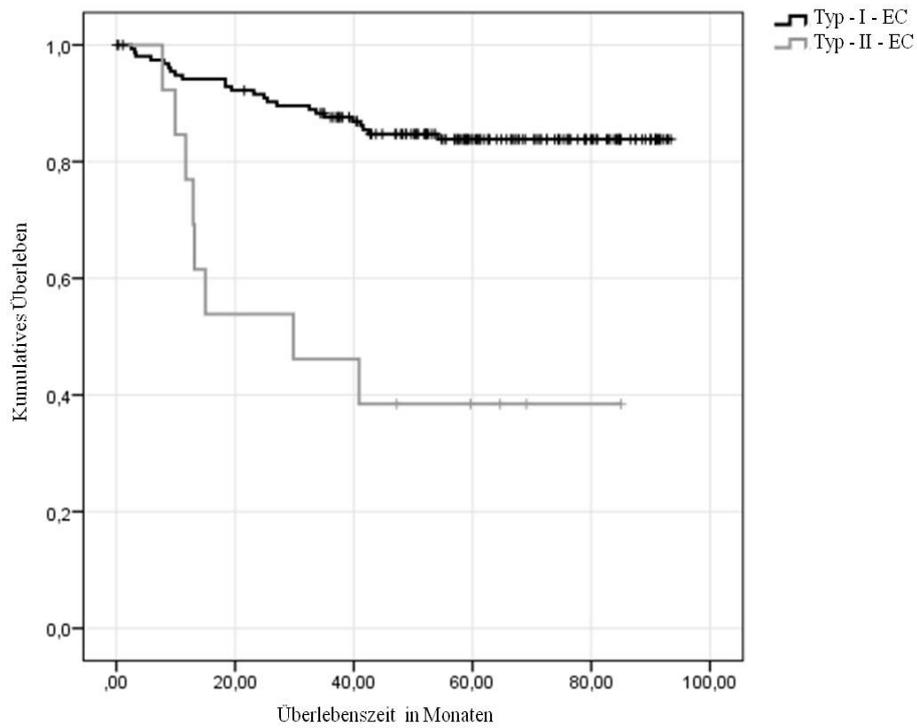


Abbildung 3.2.: Überleben der Studienpopulation

### 3.1.2. Primer

**Tabelle 3.2.:** Verwendete Primer

SNP	Primer	Sequenz 5'-3'
MDM2 SNP 309	SNP309fw	5'-CGGGAGTTCAGGGTAAAGGT-3'
	SNP309c-bw	5'-AAAGCTGAGTCAACCTGC-3'
	SNP309b-bw	5'-TGAGTCAACCTGCCCACTG-3'
MDM4 SNP 31826	MDMX31684fw	5'-GCTTAATTTCCACACAGATTAG-3'
	MDMX32015rev	5'-TTGGCAATGAACTACCATAATG-3'
	MDMX31778fw	5'-TGACAACTCAAGTCTAGACCCAAA-3'
	MDMX31865rev	5'-TGTGTTACCTGTGGCAAGACTAA-3'
MDM4 SNP 34091	MDMX34091fw	5'-AGCATAATGGTAGTACGAACATA-3'
	XEx-2rev	5'-ACAGTCATGAGACAGCTAAACT-3'
p53 Codon72 SNP	p53Ex4199	5'-ATCTACAGTCCCCCTTGCCG-3'
	p53Ex4200	5'-GCAACTGACCGTGCAAGTCA-3'
	p53Ex4fw	5'-CGTTCTGGTAAGGACAAGGGT-3'
	p53Ex4rev	5'-AAGAAATGCAGGGGGATACGG-3'

### 3.1.3. TaqMan SNP Genotyping-Assays

p53 Codon72 SNP (rs1042522)	Applied Biosystem, USA
MDM4 SNP 31826	Applied Biosystem, USA

### 3.1.4. Enzyme

GoTaq Green Master Mix	Promega, Heidelberg
Hot Star Taq	Qiagen, Hilden
HRM-Master Mix	Qiagen, Hilden

### 3.1.5. Kits

BigDye Terminator Sequencing Kit v1.1/v3.1	Applied Biosystem, USA
PCR-Kombi-Kit	Seqlab, Göttingen
Type-it HRM PCR Kit	Qiagen, Hilden

Agarose	Serva, Heidelberg
Bidest. Aqua	
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
DNA Standard (100 bp Leiter)	Invitrogen, Karlsruhe
dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Promega, Heidelberg
EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethanol (96%)	Merck, Darmstadt
Ethanol (70%)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Natriumacetat	Serva, Heidelberg
Q-Solution	Qiagen, Hilden

### 3.1.6. Chemikalien

### 3.1.7. Puffer und Lösungen

10x Puffer	Qiagen, Hilden
5x TBE Puffer:	
54g Tris-HCl	
27,5g Borsäure	
20 ml EDTA (0,5 M, pH 8)	
Aqua bidest. auf 1l auffüllen	

### 3.1.8. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Bioplex	Strehlau & Kruse GmbH, Freiburg
Cubis (Analysewaage)	Sartorius AG, Göttingen
Consort E321	Angewandte Gentechnologie Systeme GmbH, Heidelberg
Fusion Fx7	Vilber Lourmat, Frankreich
Mettler AM 100 (Analysewaage)	Mettler, Giessen
Mikropipetten	Eppendorf, Hamburg
Peltier Thermal Cycler Tetrad 2	Bio Rad, München
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Rotor Gene RG 3000	Qiagen, Hilden
Rotor Gene RG 6000	Qiagen, Hilden
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Vortex-Genie2	Scientific Industries, USA
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg

## 3.2. Methoden

Für die vorliegende Arbeit stand die bereits isolierte und aufgereinigte DNA aus den Tumorproben des oben beschriebenen Studienkollektivs beziehungsweise aus den Blutproben der Kontrollpersonen zur Verfügung. Der Schritt der DNA-Extraktion entfiel somit, und die praktische Arbeit konzentrierte sich auf die Genotypisierung der einzelnen Polymorphismen. Diese erfolgte mithilfe unterschiedlicher Methoden, denen allen das Prinzip der Polymerasekettenreaktion (englisch: polymerase chain reaction, PCR) zugrunde lag. Die Auswahl des geeigneten Verfahrens ergab sich im experimentellen Verlauf in Abhängigkeit von Ressourcenverfügbarkeit und Probenqualität, sodass nicht jede Methode für jeden der vier SNP verwendet werden konnte.

### 3.2.1. Sequenzierung der Genorte nach Sanger

Eine für alle Polymorphismen anwendbare, aber aufwändige Möglichkeit zur Analyse eines Polymorphismus ist die Sequenzierung des ihn beinhaltenden Genorts. Dieser sollte nicht länger als wenige 100 Basenpaare sein und musste daher im ersten Schritt mittels PCR und spezifischer Primer aus der Tumor-DNA isoliert und amplifiziert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde auf folgendes Reaktionsprofil zurückgegriffen:

Pipettieransatz 25 $\mu$ l	Reaktionsprofil
12,5 $\mu$ l GoTaq Green Master Mix	1. Initiale Aktivierung 95°C 15 min
8,0 $\mu$ l bidest. Aqua	2. 40 Zyklen
1,0 $\mu$ l des jeweiligen fw/rev-Primers (20 $\mu$ M)	2.1 Denaturierung 95°C 15 sec
2,5 $\mu$ l DNA	2.2 Annealing 58°C 20 sec
	2.3 Elongation 72°C 30 sec
	3. Finale Elongation 72°C 10 min

**Tabelle 3.3.:** Annealingtemperatur

MDM2 SNP 309	MDM4 SNP 31826	MDM4 SNP 34091	p53 Codon72 SNP
58°C	56°C	55°C	58°C

Um den Erfolg der abgelaufenen Reaktion zu überprüfen, wurden dann jeweils 5,0 $\mu$ l der entstandenen Produkte auf ein 1% Agarosegel (0,3g Agarose und 30ml 0,5x TBE-Puffer versetzt mit 2,5 $\mu$ l Ethidiumbromid) aufgetragen und im elektrischen Feld bei 80V aufgetrennt. Nach 20min wurde das Ergebnis unter UV-Licht betrachtet und

ausgewertet. Die verbliebenen 20 $\mu$ l PCR-Produkte wurden nach erfolgreicher PCR mithilfe des PCR-Kombi-Kit der Firma SeqLab nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. So konnten sie bei -80°C dauerhaft gelagert oder der Sequenzierreaktion zugeführt werden. Diese erfolgte nach dem Prinzip der Kettenabbruchsynthese nach SANGER, basierend auf den Grundlagen der PCR, nach folgendem Reaktionsprofil:

Pipettieransatz 20 $\mu$ l	Reaktionsprofil
12,0 $\mu$ l 5x Puffer	1. Initiale Aktivierung 96°C 1 min
4,0 $\mu$ l des jeweiligen Primers (0,8pM)	2. 26 Zyklen
2,0 $\mu$ l Terminator Mix	2.1 Denaturierung 96°C 10 sec
2,0 $\mu$ l aufgereinigtes PCR-Produkt	2.2 Annealing 50°C 5 sec
	2.3 Elongation 60°C 4 min

Nach abgelaufener Sequenzierreaktion erfolgte die Fällung der erhaltenen Sequenzprodukte. Hierzu wurden die Produkte mit 2 $\mu$ l 125 mM EDTA, 2 $\mu$ l 3 M Natriumacetat und 50 $\mu$ l 96% igem Ethanol für 15min dunkel bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 20min bei 4°C und 6000U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde danach vorsichtig abpipettiert, das verbleibende Pellet mit 70% igem Ethanol gewaschen und für weitere 10min bei 4°C und 6000U/min zentrifugiert. Im Anschluss wurde die Flüssigkeit wieder vorsichtig abpipettiert und das Pellet für 10min bei 80°C im Thermozykler getrocknet. Während aller Schritte sollten die Sequenzprodukte aufgrund der Fluoreszenzmarkierung vor direktem Lichteinfall geschützt werden. Die Auftrennung der Produkte erfolgte im „Zentrum für medizinische Grundlagenforschung“ des Universitätsklinikums Halle.

### 3.2.2. Realtime-PCR

Ein weiteres Verfahren, welches der Genotypisierung der Polymorphismen p53 Codon 72 SNP und MDM4 SNP 31826 diene, ist die „Realtime-PCR“. Hierbei werden fluoreszenzmarkierte, sequenzspezifische Sonden verwendet, von denen eine das Major-Allel und die andere das Minor-Allel des SNP bindet. Entsprechend der Anlagerung der Sonden an die zwei unterschiedlichen Allele des Polymorphismus können vom Rotorgene 3000 noch während der ablaufenden PCR zwei Signale registriert werden. Anhand deren Verläufe kann der Allelstatus mehrerer Proben in Echtzeit beurteilt werden. Voraussetzung für die Durchführbarkeit dieser Methode ist jedoch zum Einen die Verfügbarkeit einer entsprechenden Sonde und zum Anderen eine gute Qualität der DNA-Proben. Die Reaktionsansätze wurden wie folgt erstellt und amplifiziert:

Pipettieransatz 20 $\mu$ l	Reaktionsprofil
10,5 $\mu$ l bidest.Aqua	1. Initiale Aktivierung 95°C 15 min
4,0 $\mu$ l Q-Solution	2. 40 Zyklen
2,0 $\mu$ l 10x Puffer	2.1 Denaturierung 95°C 15 sec
0,5 $\mu$ l TaqMan Genotyping-Assay	2.2 Annealing 60°C 20 sec
0,4 $\mu$ l dNTP's	2.3 Elongation 72°C 20 sec
0,1 $\mu$ l Hot Star Taq	3. Finale Elongation 72°C 10min
2,5 $\mu$ l DNA	

In jedem Lauf wurden drei zuvor sequenzierte Kontrollproben mit bekannten Genotypen sowie eine Negativkontrolle mitgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der Funktion „Allelic discrimination“ der Rotorgene 3000 Software.

### 3.2.3. „High Resolution Melting“-Analyse (HRMA)

Eine dritte Möglichkeit zur Genotypisierung der DNA-Proben, die für den MDM4 SNP 31826 angewendet wurde, ist das Verfahren der „High Resolution Melting“-Analyse. Grundlage stellen die unterschiedlichen Schmelztemperaturen der Nukleobasenbindungen dar. So sind Adenin und Thymin durch zwei, Guanin und Cytosin hingegen durch drei Wasserstoffbrücken kovalent gebunden. Geht man im Falle der SNP-Analyse davon aus, dass sich bestimmte DNA-Sequenzen nur in einem Basenpaar unterscheiden, erwartet man einen geringen Unterschied hinsichtlich der zum Aufschmelzen benötigten Temperatur. Dieser ist bei einem Austausch von Adenin/Thymin gegen Guanin/Cytosin größer und sicherer zu detektieren. Des Weiteren sollte das Amplifikat eine Größe von 100 Basenpaaren nicht übersteigen, da sich der beschriebene, geringe Effekt in Anbetracht der höheren Schmelztemperatur langer Produkte relativieren würde. Bei dieser Methode erfolgt zunächst die Amplifikation des gewünschten Produktes mittels PCR unter Zusatz eines doppelstrangbindenden Fluoreszenzfarbstoffes („EvaGreen“). Im nächsten Schritt werden die entstandenen Produkte erst aufgeschmolzen, um sich im Anschluss wieder in korrekter Weise aneinanderzulagern. Dies ermöglicht eine gleichmäßige Verteilung des Farbstoffes. Erst der letzte Schritt beinhaltet das „High Resolution Melting“. Dabei wird die Temperatur in 2sec dauernden 1°C-Schritten von 65-95°C erhöht, und die Schmelzkurve über die freiwerdende Fluoreszenz vom Rotorgene 6000 registriert.

Pipettieransatz 15 $\mu$ l	Reaktionsprofil		
7,5 $\mu$ l HRM Master Mix	1. Initiale Aktivierung	95°C	5 min
3,3 $\mu$ l bidest. Aqua	2. 45 Zyklen		
3,0 $\mu$ l DNA	2.1 Denaturierung	95°C	10 sec
0,6 $\mu$ l des jeweiligen fw/rev-Primers	2.2 Annealing	60°C	15 sec
	3. Aufschmelzen	95°C	5 min
	4. Zusammenlagern	55°C	2 min
	5. HRM	65-95°C	1°C / 2 sec

In jedem Lauf wurden drei zuvor sequenzierte Kontrollproben sowie eine Negativkontrolle mitgeführt. Die Auswertung erfolgte mithilfe der Funktion „HRM-Analysis“ der Rotorgene 6000 Software.

### 3.2.4. Statistische Analysen

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mithilfe der Software SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) unter Annahme einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  von  $< 5\%$ . Zur besseren Einordnung der Relevanz der Ergebnisse wurde zusätzlich stets das 95%-Konfidenzintervall angegeben. Für die Berechnung der unterschiedlichen Effekte wurden diverse statistische Tests durchgeführt: Für den Vergleich der Allelfrequenzen wurde der  $\chi^2$ -Test verwendet und im Fall der Ungleichverteilung der Allele das „Odds Ratio“ berechnet. Die Diagnosealter wurden mithilfe der einfaktoriellen ANOVA-Analyse (Fisher-Test) gemittelt und in Post Hoc-Tests (Tukey-HSD bei Varianzgleichheit und Tamhane bei Varianzungleichheit) miteinander verglichen. Der Vergleich zweier Gruppen erfolgte durch den t-Test. Für die Untersuchungen zum Überleben der Patientinnen wurden Kaplan-Meier-Analysen (log-rank-Test) durchgeführt und die Risiken mittels Cox-Regression berechnet.

## 4. Ergebnisse

Der in Kapitel 1.2.2 erläuterte Einfluss der genannten SNP auf Karzinomentstehung und deren Prognose wurde in der vorliegenden Arbeit für das EC überprüft. Grundlage dieser Betrachtungen bildete das in 3.1.1 charakterisierte Studienkollektiv aus 170 EC-Patientinnen. Da man, wie in 1.1.2 beschrieben, bei diesem Karzinom zwei Tumorentitäten unterscheidet, die sich klinisch-pathologisch verschieden verhalten, und sich die epidemiologische Ungleichverteilung zudem auch im Studienkollektiv widerspiegelte (157 Typ-I- und 13 Typ-II-Karzinome), wurde der Schwerpunkt der Auswertung auf das Typ-I-EC gelegt. Alle folgenden Ausführungen und Berechnungen beziehen sich dementsprechend auf diese Gruppe aus 157 Patientinnen. Die Daten der Typ-II-EC-Patientinnen wurden mit berechnet, ließen aber aufgrund der geringen Fallzahlen keine statistisch valide Aussage zu. Sie wurden daher am Ende dieses Kapitels (4.7) zusammengefasst. Zur Aufklärung möglicher Zusammenhänge wurde jeder der vier SNP zunächst separat bezüglich Allelverteilung, Diagnosealter und Überlebenszeiten analysiert. Im zweiten Schritt wurden diese Daten in Abhängigkeit von der Östrogenrezeptorexpression betrachtet und schließlich der Einfluss von möglichen Kombinationen verschiedener SNP untersucht.

### 4.1. Einfluss des p53 Codon72 SNP auf das Typ-I-EC

#### 4.1.1. Allelverteilung des p53 Codon72 SNP

Beim Vergleich der Allelverteilung des p53 Codon72 SNP der 157 Patientinnen mit derjenigen von 77 Kontrollen ergab sich kein relevanter Unterschied (siehe Tabelle 4.1;  $p=0,567$ ): In beiden Fällen trat der homozygote Wildtyp (Arg/Arg) am häufigsten auf (59,2% und 61,0%), gefolgt vom heterozygoten Typ (Arg/Pro: 35,0% und 36,4%). Am seltensten konnte die homozygote Prolin-Variante (5,7% und 2,6%) nachgewiesen werden.

**Tabelle 4.1.:** Allelverteilung des p53 Codon72 SNP in der Studienpopulation

	Gesamt	Arg/Arg	Arg/Pro	Pro/Pro	Signifikanz
Kontrollen	77	47	28	2	0,567
Patientinnen	157	93	55	9	

#### 4.1.2. Einfluss des p53 Codon72 SNP auf das Diagnosealter

Die Analyse der allespezifischen Diagnosealter konnte ebenfalls keinen Einfluss des Allelstatus des p53 Codon72 SNP auf selbiges zeigen (siehe Tabelle 4.2 und 4.3;  $p=0,560$ ). Ein Trend ließ sich im nächsten Schritt bei der Analyse des Diagnosealters in Abhängigkeit vom ER-Status erkennen, erreichte jedoch keine statistische Signifikanz: Während der homozygote Pro-Typ bei ER-positiven Tumoren mit einem früheren Diagnosezeitpunkt (63,2 Jahre) einherging, führte er bei ER-negativen Tumoren zu einem späteren Diagnosealter (70,3 Jahre). Im direkten Vergleich bedeutete dies für Trägerinnen der Pro-Variante einen Unterschied von 7,1 Jahren (95%-KI= -9,3-23,6;  $p=0,341$ ).

**Tabelle 4.2.:** Diagnosealter im Vergleich zum Durchschnittserkrankungsalter

Diagnosealter	Fälle	Arg/Arg	Arg/Pro	Pro/Pro	Signifikanz
< 67 Jahre	71	47	20	4	0,246
> 67 Jahre	86	46	35	5	

**Tabelle 4.3.:** Einfluss des p53 Codon72 SNP auf das Diagnosealter

	Fälle	Mittleres Diagnosealter in Jahren	95%-KI	Signifikanz
<b>Alle Patientinnen</b>				
Arg/Arg	93	66,4	64,4-68,4	0,560
Arg/Pro	55	68,2	65,4-70,9	
Pro/Pro	9	66,3	58,3-74,3	
Gesamt	157	67,0	65,5-68,6	
<b>Patientinnen mit ER-positiven Tumoren</b>				
Arg/Arg	54	66,5	63,9-69,1	0,157
Arg/Pro	24	70,6	66,1-75,0	
Pro/Pro	5	63,2	48,8-77,5	
Gesamt	83	67,5	65,3-69,7	
<b>Patientinnen mit ER-negativen Tumoren</b>				
Arg/Arg	39	66,3	63,0-69,6	0,731
Arg/Pro	31	66,3	62,9-69,8	
Pro/Pro	4	70,3	56,7-83,8	
Gesamt	74	66,5	64,3-68,8	

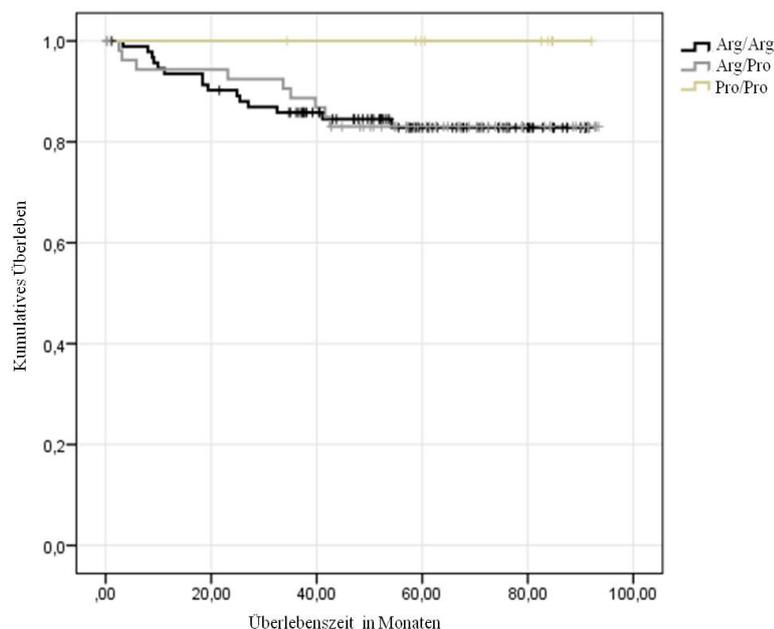
#### 4.1.3. Einfluss des p53 Codon72 SNP auf das Überleben

Die Untersuchungen zum Einfluss des p53 Codon72 SNP auf das Überleben der Patientinnen erbrachte folgende Erkenntnisse (vergleiche Tabelle 4.4): Unter den 24, am Tumor verstorbenen, Frauen konnte bei 15 der homozygote Wildtyp (Arg/Arg), bei 9 der heterozygote (Arg/Pro), jedoch in keinem Fall der Pro/Pro-Typ nachgewiesen

werden. Beide erstgenannten Gruppen zeigten zudem keine relevanten Unterschiede hinsichtlich der mittleren Überlebenszeiten (Arg/Arg 79,7 Monate; Arg/Pro 81,8 Monate;  $p=0,972$ ). Daraus ließ sich ein Überlebensvorteil des homozygoten Cytosin-Allels (Pro/Pro-Typ) bezüglich des p53 Codon72 SNP folgern, obgleich aufgrund der geringen Fallzahlen keine statistische Signifikanz erreicht werden konnte. Dieser Effekt konnte unabhängig vom ER-Status beobachtet werden.

**Tabelle 4.4.:** Einfluss des p53 Codon72 SNP auf das Überleben

	Fälle	Verstorbene Fälle	Mittleres Überleben in Monaten	95%-KI	Signifikanz
<b>Alle Patientinnen</b>					
Arg/Arg	93	15	79,7	74,2-85,3	0,441
Arg/Pro	55	9	81,8	74,7-88,9	
Pro/Pro	9	0	-	-	
Gesamt	157	24	82,1	77,8-86,3	
<b>Patientinnen mit ER-positiven Tumoren</b>					
Arg/Arg	54	9	79,8	72,7-87,0	0,585
Arg/Pro	24	3	82,7	71,7-93,7	
Pro/Pro	5	0	-	-	
Gesamt	83	12	82,2	76,6-87,9	
<b>Patientinnen mit ER-negativen Tumoren</b>					
Arg/Arg	39	6	78,9	70,1-87,7	0,663
Arg/Pro	31	6	80,8	71,5-90,1	
Pro/Pro	4	0	-	-	
Gesamt	74	12	81,5	75,2-87,7	



**Abbildung 4.1.:** Überleben in Abhängigkeit vom p53 Codon72 SNP

#### 4.1.4. Einfluss des p53 Codon72 SNP auf klinisch-pathologische Parameter

Es stellte sich schließlich die Frage, inwieweit sich die Tumoren der verschiedenen Genotypen in Bezug auf Histologie, Differenzierung und Tumorstadium zum Diagnosezeitpunkt unterschieden. Wie in Tabelle 4.5 ersichtlich, gab es keine relevanten Unterschiede in Hinblick auf die Histologie. Betrachtete man hingegen den Differenzierungsgrad der Tumorzellen, zeigte sich, dass Tumoren mit C/C-Genotypen (entspricht Pro/Pro) ausschließlich hochdifferenziert waren (G1), wohingegen etwa ein Viertel der Tumore mit Arg/Arg- oder Arg/Pro-Status eine schlechtere Differenzierung aufwiesen (G2 oder G3). Gleiches konnte für das Tumorstadium festgestellt werden. Diese Effekte erreichten zwar keine statistische Signifikanz, unterstreichen jedoch den prognoseverbessernden Einfluss der Prolin-Variante.

**Tabelle 4.5.:** Einfluss des p53 Codon72 SNP auf klinisch-pathologische Parameter

Klinisch-pathologische Parameter	Fälle	Arg/Arg	Arg/Pro	Pro/Pro	Signifikanz
<b>Histologie</b>					
Endometroid-klassisch	106	63	36	7	0,548
Endometroid-squamös	31	18	13	0	
Endometroid-sekretorisch	15	10	4	1	
Endometroid-villoglandulär	5	2	2	1	
<b>Zelldifferenzierung</b>					
gut (G1)	121	71	41	9	0,352
mäßig (G2)	27	15	12	0	
schlecht (G3)	9	7	2	0	
<b>FIGO-Stadium</b>					
I	117	70	38	9	0,297
II	30	16	14	0	
III	10	7	3	0	
Gesamt	157	93	55	9	

Zusammenfassend ließ sich ein positiver Effekt der Prolin-Variante des p53 Codon72 SNP auf den Verlauf des Typ-I-EC feststellen.

## 4.2. Einfluss des MDM2 SNP 309 auf das Typ-I-EC

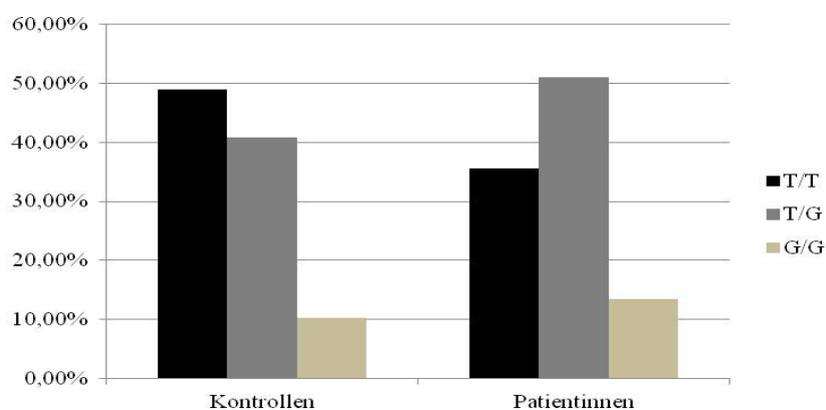
### 4.2.1. Allelverteilung des MDM2 SNP 309

Beim Vergleich der Allelverteilung innerhalb der Studien- mit derjenigen in der Kontrollpopulation aus 98 gesunden Frauen fielen folgende, insignifikante Unterschiede auf (siehe Tabelle 4.6): Während die Patientinnen mehrheitlich den heterozygoten

Genotypen (T/G: 51,0%) aufwiesen, überwog in der Kontrollpopulation der homozygote Wildtyp (T/T: 49,0%). In beiden Fällen kam der homozygote G/G-Genotyp am seltensten vor ( $p=0,109$ ). Demnach hatten Trägerinnen des T/T-Genotypen, im Vergleich zu jenen mit homo-oder heterozyotem G-Allel, ein deutlich reduziertes Risiko, am Typ-I-EC zu erkranken ( $OR=0,58$ ; 95%-KI= 0,35-0,97).

**Tabelle 4.6.:** Allelverteilung des MDM2 SNP 309 in der Studienpopulation

	Gesamt	T/T	T/G	G/G	Signifikanz
Kontrollen	98	48	40	10	0,109
Patientinnen	157	56	80	21	



**Abbildung 4.2.:** Allelverteilung des MDM2 SNP 309 in der Studienpopulation

#### 4.2.2. Einfluss des MDM2 SNP 309 auf das Diagnosealter

Die Analyse der MDM2 SNP 309-abhängigen Diagnosealter erbrachte keine relevanten Unterschiede (siehe Tabellen 4.7 und 4.8). Tendenziell wurde der Tumor mit zunehmender Ausprägung des Guanin-Allels später diagnostiziert. So erkrankten Frauen mit T/T-Genotyp im Mittel 0,7 Jahre (95%-KI= -4,8-3,3) früher (66,4 Jahre) als jene mit T/G- (67,1 Jahre) und etwa 2,3 Jahre (95% -KI= -8,2-3,7) eher als diejenigen mit G/G-Genotyp (68,6 Jahre). Diese Differenzen waren jedoch sehr gering und erreichten keine statistische Signifikanz ( $p=0,661$ ). Betrachtete man die Daten in Abhängigkeit vom ER-Status, verstärkte sich dieser Trend für jene Fälle mit ER-negativen Tumoren ( $p=0,258$ ). T/T-Trägerinnen dieser Gruppe erkrankten sogar 5,8 Jahre (95%-KI= -14,1-2,6) früher (65,0 Jahre) als jene mit G/G-Genotyp (70,8 Jahre;  $p=0,131$ ). Bei Patientinnen mit ER-positiven Tumoren sank hingegen das Diagnosealter mit zunehmender Ausprägung des Guanin-Allels. Diese Unterschiede waren allerdings ohne statistische Signifikanz ( $p=0,942$ ).

**Tabelle 4.7.:** Diagnosealter im Vergleich zum Durchschnittserkrankungsalter

Diagnosealter	Fälle	T/T	T/G	G/G	Signifikanz
< 67 Jahre	71	27	34	10	0,783
> 67 Jahre	86	29	46	11	

**Tabelle 4.8.:** Einfluss des MDM2 SNP 309 auf das Diagnosealter

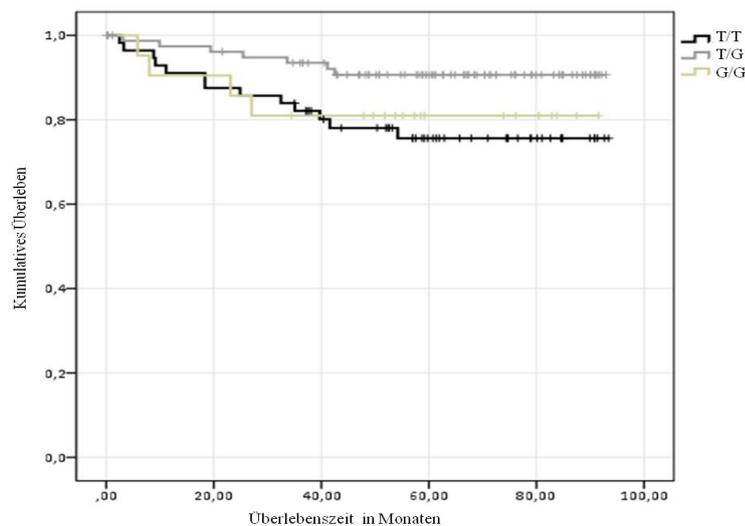
	Fälle	Mittleres Diagnosealter in Jahren	95%-KI	Signifikanz
<b>Alle Patientinnen</b>				
T/T	56	66,4	64,0-68,7	0,661
T/G	80	67,1	64,8-69,4	
G/G	21	68,6	63,9-73,4	
Gesamt	157	67,0	65,5-68,6	
<b>Patientinnen mit ER-positiven Tumoren</b>				
T/T	26	67,9	64,4-71,5	0,942
T/G	46	67,4	64,1-70,7	
G/G	11	66,7	61,2-72,3	
Gesamt	83	67,5	65,3-69,7	
<b>Patientinnen mit ER-negativen Tumoren</b>				
T/T	30	65,0	61,7-68,3	0,258
T/G	34	66,6	63,4-69,9	
G/G	10	70,8	61,9-79,7	
Gesamt	74	66,5	64,3-68,8	

#### 4.2.3. Einfluss des MDM2 SNP 309 auf das Überleben

Die Untersuchungen zum Einfluss des MDM2 SNP 309 auf das Überleben der Patientinnen zeigten einen risikoreduzierenden Effekt des T/G-Genotypen (RR= 0,36; 95%-KI= 0,14-0,90; p=0,029). Nur 8,8% dieser Frauen verstarben am Tumor und wiesen zudem längere Überlebenszeiten (durchschnittlich 86,6 Monaten) auf. Im Vergleich zum mittleren Überleben aller Patientinnen (82,1 Monate), bedeutete dies einen Überlebensvorteil von etwa 4 Monaten. Im Gegensatz dazu verstarben Trägerinnen des T/T-beziehungsweise G/G-Genotypen etwa doppelt so häufig am Karzinom und hatten außerdem kürzere Überlebenszeiten (T/T: 76,5 Monaten; G/G: 77,1 Monaten; p=0,071). Dieser Trend war unabhängig vom ER-Status zu beobachten (vergleiche Tabelle 4.9).

**Tabelle 4.9.:** Einfluss des MDM2 SNP 309 auf das Überleben

	Fälle	Verstorbene Fälle	Mittleres Überleben in Monaten	95%-KI	Signifikanz
<b>Alle Patientinnen</b>					
T/T	56	13	76,5	68,4-84,7	0,071
T/G	80	7	86,6	82,1-91,2	
G/G	21	4	77,2	64,4-90,0	
Gesamt	157	24	82,1	77,8-86,3	
<b>Patientinnen mit ER-positiven Tumoren</b>					
T/T	26	7	72,5	60,7-84,8	0,064
T/G	46	3	87,8	82,1-93,5	
G/G	11	2	77,9	60,6-95,2	
Gesamt	83	12	82,2	76,6-87,9	
<b>Patientinnen mit ER-negativen Tumoren</b>					
T/T	30	6	78,5	67,7-89,4	0,652
T/G	34	4	83,1	76,0-90,2	
G/G	10	2	69,4	52,6-86,2	
Gesamt	74	12	81,5	75,2-87,7	



**Abbildung 4.3.:** Überleben in Abhängigkeit vom MDM2 SNP 309

#### 4.2.4. Einfluss des MDM2 SNP 309 auf klinisch-pathologische Parameter

Gemäß der vorliegenden Daten ließ sich kein Einfluss des MDM2 SNP 309 auf die Histologie der Tumoren nachweisen. Bezogen auf die Differenzierung und das Erkrankungsstadium zum Diagnosezeitpunkt, konnte tendenziell eine Verschlechterung des Gradings und eine Zunahme des FIGO-Stadiums mit Ausprägung des Guanin-Allels beobachtet werden (siehe Tabelle 4.10).

**Tabelle 4.10.:** Einfluss des MDM2 SNP 309 auf klinisch-pathologische Parameter

Klinisch-pathologische Parameter	Fälle	T/T	T/G	G/G	Signifikanz
<b>Histologie</b>					
Endometroid-klassisch	106	44	50	12	0,319
Endometroid-squamös	31	8	17	6	
Endometroid-sekretorisch	15	3	9	3	
Endometroid-villoglandulär	5	1	4	0	
<b>Zelldifferenzierung</b>					
gut (G1)	121	48	62	11	0,013
mäßig (G2)	27	5	13	9	
schlecht (G3)	9	3	5	1	
<b>FIGO-Stadium</b>					
I	117	47	58	12	0,167
II	30	6	17	7	
III	10	3	5	2	
Gesamt	157	56	80	21	

Zusammenfassend ließ sich kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Ausprägung des MDM2 SNP 309 und dem Verlauf von Typ-I-EC feststellen.

### 4.3. Einfluss des MDM4 SNP 31826 auf das Typ-I-EC

#### 4.3.1. Allelverteilung des MDM4 SNP 31826

Der Vergleich der Allelverteilung zeigte keine Unterschiede zwischen der untersuchten Studienpopulation und der Kontrollgruppe aus 84 gesunden Frauen. In beiden Fällen konnte mehrheitlich der homozygote Wildtyp (C/C) und mit absteigender Häufigkeit der C/T- beziehungsweise T/T-Genotyp nachgewiesen werden (siehe Tabelle 4.11;  $p=0,816$ ).

**Tabelle 4.11.:** Allelverteilung des MDM4 SNP 31826 in der Studienpopulation

	Gesamt	C/C	C/T	T/T	Signifikanz
Kontrollen	84	40	35	9	0,816
Patientinnen	157	79	59	19	

#### 4.3.2. Einfluss des MDM4 SNP 31826 auf das Diagnosealter

Untersuchungen zum Einfluss des MDM4 SNP 31826 auf das Diagnosealter der Patientinnen zeigten eine signifikante Zunahme desselbigen bei Vorliegen des homozygoten Minor-Allels (T/T, vergleiche Tabelle 4.12 und 4.13). 79% dieser Fälle erkrankten nach dem 67. Lebensjahr mit etwa 71,6 Jahren und damit etwa 4,6 Jahre

(95%-KI= 0,8-8,4; p=0,020) später als der Durchschnitt aller Frauen des Kollektives. Trägerinnen des C/C- oder C/T-Genotypes erhielten ihre Diagnose im Vergleich durchschnittlich 5,2 Jahre (95%-KI= -9,9 - -0,6; p=0,028) früher (C/C: 66,9 Jahre; C/T: 65,7 Jahre). Dieser Effekt konnte unabhängig von der ER-Expression beobachtet werden.

**Tabelle 4.12.:** Diagnosealter im Vergleich zum Durchschnittserkrankungsalter

Diagnosealter	Fälle	C/C	C/T	T/T	Signifikanz
< 67 Jahre	71	34	33	4	0,025
> 67 Jahre	86	45	26	15	

**Tabelle 4.13.:** Einfluss des MDM4 SNP 31826 auf das Diagnosealter

	Fälle	Mittleres Diagnosealter in Jahren	95%-KI	Signifikanz
<b>Alle Patientinnen</b>				
C/C	79	66,9	64,7-69,1	0,070
C/T	59	65,7	63,1-68,3	
T/T	19	71,6	67,9-75,4	
Gesamt	157	67,0	65,5-68,6	
<b>Patientinnen mit ER-positiven Tumoren</b>				
C/C	38	67,1	64,0-70,2	0,133
C/T	32	65,9	62,0-69,8	
T/T	13	72,4	67,4-77,4	
Gesamt	83	67,5	65,3-69,7	
<b>Patientinnen mit ER-negativen Tumoren</b>				
C/C	41	66,7	63,5-69,9	0,585
C/T	27	65,5	61,8-69,2	
T/T	6	69,9	62,4-77,5	
Gesamt	74	66,5	64,3-68,8	

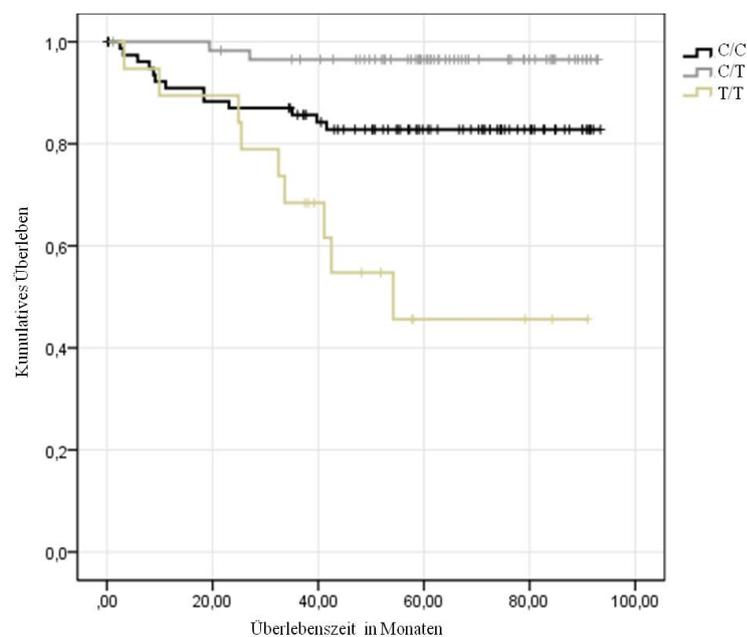
### 4.3.3. Einfluss des MDM4 SNP 31826 auf das Überleben

Bei der Betrachtung der Überlebensdaten in Abhängigkeit vom MDM4 SNP 31826 ergaben sich ebenfalls allelspezifische Unterschiede (siehe Tabelle 4.14; p < 0,000). Im Gegensatz zum Diagnosealter zeigte das homozygote T/T-Allel nachteilige Effekte auf das Überleben. 47,4% der Frauen mit T/T-Genotyp verstarben im Beobachtungszeitraum an den Folgen der Erkrankung. Sie überlebten im Mittel 59,0 Monate, was im Vergleich zum Kollektivdurchschnitt eine verkürzte Überlebenszeit von etwa 2 Jahren bedeutete. Im Vergleich zu Patientinnen mit C/C- oder C/T-Genotypen bedeutete dies ein 5,0-fach erhöhtes Risiko, am Tumor zu versterben (95%-KI = 2,2-11,4; p<0,000). Das beste Überleben hatten Frauen mit heterozygotem Genotyp. Von ihnen verstarben 3,4%, die mit 90,5 Monaten deutlich längere Überlebenszeiten aufwiesen (RR= 0,2; 95%-KI= 0,0-0,8; p=0,026). Diese Effekte verstärkten sich bei

Patientinnen mit ER-negativen Tumoren. 83,3% der T/T-Trägerinnen dieser Gruppe verstarben im Beobachtungszeitraum. Ihre mittlere Überlebenszeit war zudem deutlich verkürzt (29,7 Monate;  $p < 0,000$ ). Dies entsprach, im Vergleich zum Gesamtkollektiv, einem Überlebensnachteil von etwa 4,4 Jahren und bezogen auf die anderen Genotypen ein 11,2-fach erhöhtes Risiko (95%-KI= 3,5-35,8;  $p < 0,000$ ) am Tumor zu versterben.

**Tabelle 4.14.:** Einfluss des MDM4 SNP 31826 auf das Überleben

	Fälle	Verstorbene Fälle	Mittleres Überleben in Monaten	95%-KI	Signifikanz
<b>Alle Patientinnen</b>					
C/C	79	13	80,4	73,8-86,9	<0,000
C/T	59	2	90,5	87,2-93,8	
T/T	19	9	59,0	43,9-74,1	
Gesamt	157	24	82,1	77,8-86,3	
<b>Patientinnen mit ER-positiven Tumoren</b>					
C/C	38	7	77,3	67,3-87,2	0,042
C/T	32	1	90,8	86,7-94,9	
T/T	13	4	70,4	53,9-87,0	
Gesamt	83	12	82,2	76,6-87,9	
<b>Patientinnen mit ER-negativen Tumoren</b>					
C/C	41	6	82,3	73,9-90,6	<0,000
C/T	27	1	89,8	84,4-95,2	
T/T	6	5	29,7	18,1-41,3	
Gesamt	74	12	81,5	75,2-87,7	



**Abbildung 4.4.:** Überleben in Abhängigkeit vom MDM4 SNP 31826

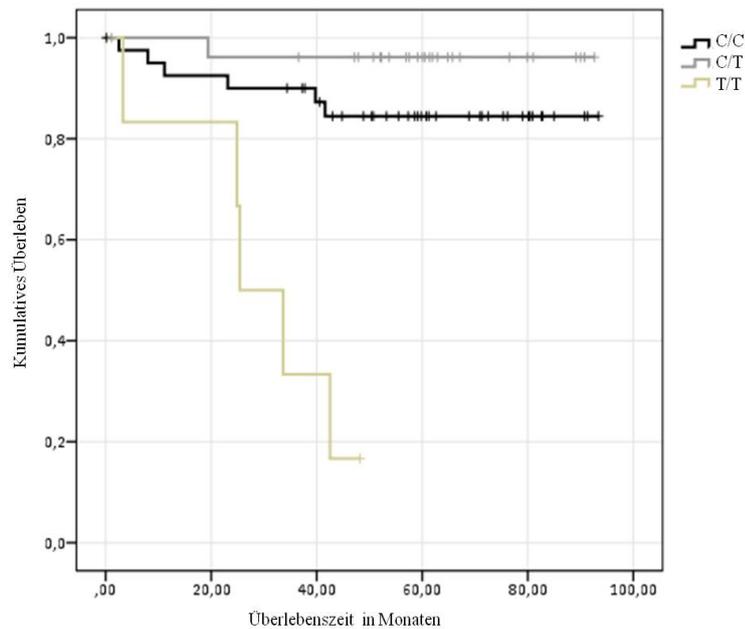


Abbildung 4.5.: Überleben in Abhängigkeit vom MDM4 SNP 31826 bei ER<sup>-</sup> Tumoren

#### 4.3.4. Einfluss des MDM4 SNP 31826 auf klinisch-pathologische Parameter

Anhand der vorliegenden Daten konnte kein Zusammenhang zwischen dem Allelstatus des MDM4 SNP 31826 und der Histologie der Typ-I-EC festgestellt werden ( $p=0,976$ ). Auffällig war hingegen, dass die Tumore der Patientinnen mit heterozygotem Genotyp ausschließlich in frühen FIGO-Stadien (I und II) diagnostiziert wurden und gut differenziert waren (G1 und G2), was sich mit dem oben beschriebenen Überlebensvorteil dieses Genotypes vereinbaren ließ. Der Verdacht, der T/T-Genotyp könnte mit fortgeschrittenen Erkrankungsstadien oder schlechter Differenzierung der Karzinome assoziiert sein, bestätigte sich allerdings nicht. Über 70% dieser Tumore wurden im FIGO-Stadium I mit einer sehr guten Differenzierung (G1) diagnostiziert.

**Tabelle 4.15.:** Einfluss des MDM4 SNP 31826 auf klinisch-pathologische Parameter

Klinisch-pathologische Parameter	Fälle	C/C	C/T	T/T	Signifikanz
<b>Histologie</b>					
Endometroid-klassisch	106	55	39	12	0,976
Endometroid-squamös	31	16	11	4	
Endometroid-sekretorisch	15	6	7	2	
Endometroid-villoglandulär	5	2	2	1	
<b>Zelldifferenzierung</b>					
gut (G1)	121	58	48	15	0,054
mäßig (G2)	27	15	11	1	
schlecht (G3)	9	6	0	3	
<b>FIGO-Stadium</b>					
I	117	56	47	14	0,079
II	30	16	12	2	
III	10	7	0	3	
Gesamt	157	79	59	19	

Alles in allem konnten die Daten einen deutlichen Einfluss des T-Allels des MDM4 SNP 31826 auf das Typ-I-EC zeigen. Sie deuten daraufhin, dass die Ausprägung des homozygoten Minor-Allels (T/T) zwar zu einem späteren Erkrankungsalter führt, bei Eintritt der Krankheit jedoch mit einem aggressiveren Verlauf, verbunden mit einer schlechteren Prognose, zu rechnen ist.

## 4.4. Einfluss des MDM4 SNP 34091 auf das Typ-I-EC

### 4.4.1. Allelverteilung des MDM4 SNP 34091

Der Vergleich der Allelverteilung der Studienpopulation mit 182 gesunden Frauen, die als Kontrollen dienten, zeigte keine wesentlichen Unterschiede (vergleiche Tabelle 4.16;  $p=0,712$ ). Sowohl bei den Patientinnen als auch bei den Kontrollen konnte in über der Hälfte der Fälle der homozygote Wildtyp (A/A), bei etwa einem Drittel der A/C- und bei weniger als 10% der C/C-Genotyp nachgewiesen werden.

**Tabelle 4.16.:** Allelverteilung des MDM4 SNP 34091 in der Studienpopulation

	Gesamt	A/A	A/C	C/C	Signifikanz
Kontrollen	182	105	66	11	0,712
Patientinnen	157	90	54	13	

#### 4.4.2. Einfluss des MDM4 SNP 34091 auf das Diagnosealter

Analysen zum Einfluss des MDM4 SNP 34091 auf das Diagnosealter der Patientinnen zeigten keinen signifikanten Zusammenhang (siehe Tabellen 4.17 und 4.18;  $p=0,290$ ). Tendenziell wurden die Karzinome bei Frauen mit homozygoten Minor-Allel (C/C: 70,2 Jahre) 3,4 Jahre (95% -KI= -9,0-2,2;  $p=0,23$ ) später diagnostiziert als bei Trägerinnen der A/A- und A/C-Genotypen (A/A: 67,4 Jahre; A/C: 65,7 Jahre). Dieser Trend konnte unabhängig vom ER-Status beobachtet werden.

**Tabelle 4.17.:** Diagnosealter im Vergleich zum Durchschnittserkrankungsalter

Diagnosealter	Fälle	A/A	A/C	C/C	Signifikanz
< 67 Jahre	71	36	30	5	0,169
> 67 Jahre	86	54	24	8	

**Tabelle 4.18.:** Einfluss des MDM4 SNP 34091 auf das Diagnosealter

	Fälle	Mittleres Diagnosealter in Jahren	95%-KI	Signifikanz
<b>Alle Patientinnen</b>				
A/A	90	67,4	65,4-69,4	0,290
A/C	54	65,7	62,9-68,4	
C/C	13	70,2	64,5-75,9	
Gesamt	157	67,0	65,5-68,6	
<b>Patientinnen mit ER-positiven Tumoren</b>				
A/A	43	67,8	65,0-70,7	0,449
A/C	30	66,0	61,8-70,1	
C/C	10	70,5	63,6-77,3	
Gesamt	83	67,5	65,3-69,7	
<b>Patientinnen mit ER-negativen Tumoren</b>				
A/A	47	67,0	64,1-69,9	0,701
A/C	24	65,3	61,5-69,1	
C/C	3	69,1	41,6-96,6	
Gesamt	74	66,5	64,3-68,8	

#### 4.4.3. Einfluss des MDM4 SNP 34091 auf das Überleben

Die Betrachtungen der Überlebenszeiten in Abhängigkeit vom Allelstatus des MDM4 SNP 34091 zeigte, im Gegensatz zum Diagnosealter, einen deutlichen, negativen Effekt des homozygoten Minor-Allels (C/C; siehe Tabelle 4.19;  $p=0,002$ ). C/C-Trägerinnen erkrankten zwar zu einem tendenziell späteren Zeitpunkt, wiesen jedoch bei Eintritt der Erkrankung ein 4,3-fach (95%-KI= 1,7-10,8;  $p=0,002$ ) erhöhtes Risiko für einen tumorbedingten Tod auf im Vergleich zu Frauen mit A/A- oder A/C-Genotypen. Demnach verstarben 46,2% dieser Patientinnen im Beobachtungszeitraum. Ihre mittlere Überlebenszeit nach Diagnosestellung betrug 59,1 Monate,

was eine reduzierte Lebenserwartung von etwa 2,1 Jahren im Vergleich zu den anderen Genotypen bedeutete (84,0 Monate; 95%-KI= 79,9-88,1; p=0,001). Das Überleben der Frauen mit A/A-und A/C-Genotypen unterschied sich nicht signifikant. Wie beim MDM4 SNP 31826 verstärkte sich der Effekt des C-Allels bei Patientinnen mit ER-negativen Karzinomen. Das Relative Risiko, am Tumor zu versterben, verdoppelte sich in dieser Gruppe für Trägerinnen des C/C-Genotypen (RR=7,6; 95%-KI= 1,6-35,0; p=0,010). 66,7% von ihnen verstarben. Sie überlebten nach Diagnosestellung durchschnittlich 25,5 Monate. Ihre Lebenserwartung war damit etwa 4,8 Jahre geringer als bei Patientinnen mit A/A-oder A/C-Genotyp, deren mittlere Überlebenszeit 83,3 Monate betrug (95%-KI= 77,3-89,8; p=0,002).

**Tabelle 4.19.:** Einfluss des MDM4 SNP 34091 auf das Überleben

	Fälle	Verstorbene Fälle	Mittleres Überleben in Monaten	95%-KI	Signifikanz
<b>Alle Patientinnen</b>					
A/A	90	13	81,9	76,0-87,7	0,002
A/C	54	5	86,9	81,9-92,0	
C/C	13	6	59,1	40,3-78,0	
Gesamt	157	24	82,1	77,8-86,3	
<b>Patientinnen mit ER-positiven Tumoren</b>					
A/A	43	7	79,0	70,1-87,9	0,019
A/C	30	1	90,7	86,3-95,0	
C/C	10	4	65,5	46,1-84,8	
Gesamt	83	12	82,2	76,6-87,9	
<b>Patientinnen mit ER-negativen Tumoren</b>					
A/A	47	6	83,5	75,9-91,0	0,009
A/C	24	4	82,2	72,8-91,6	
C/C	3	2	25,5	4,7-46,2	
Gesamt	74	12	81,5	75,2-87,7	

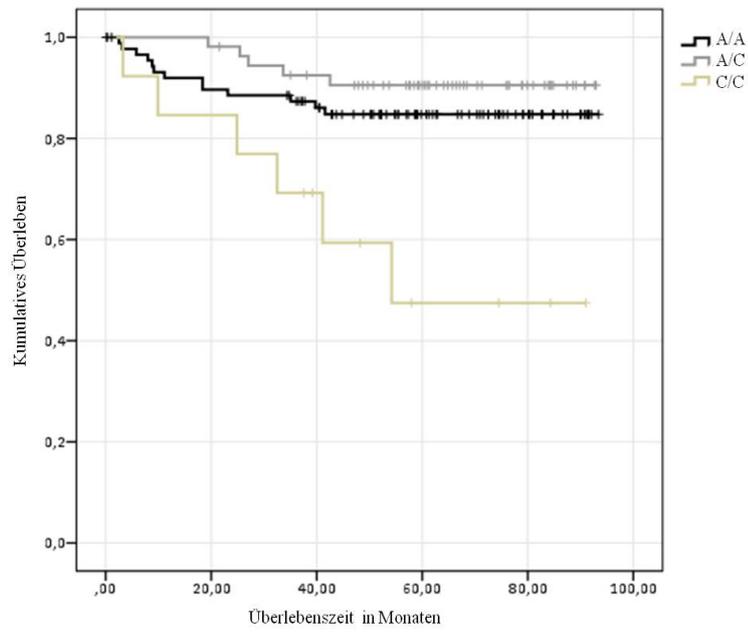


Abbildung 4.6.: Überleben in Abhängigkeit vom MDM4 SNP 34091

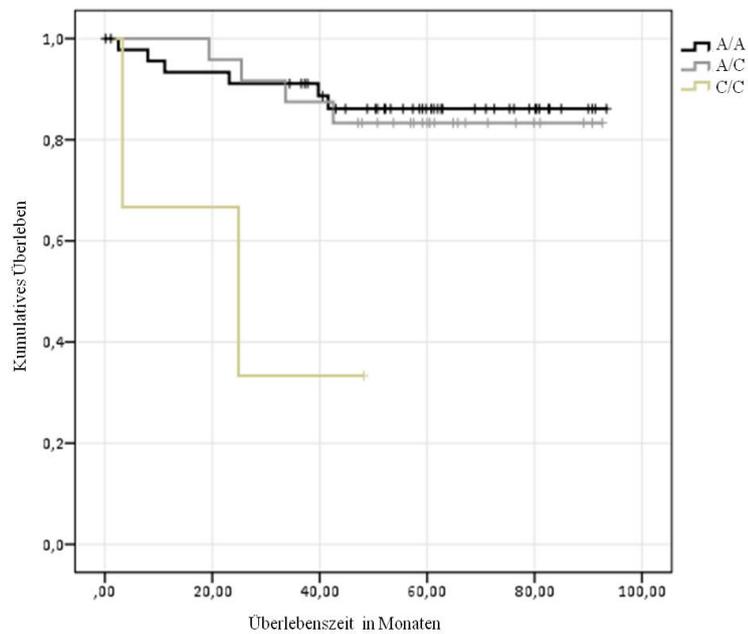


Abbildung 4.7.: Überleben in Abhängigkeit vom MDM4 SNP 34091 bei ER<sup>-</sup> Tumoren

#### 4.4.4. Einfluss des MDM4 SNP 34091 auf klinisch-pathologische Parameter

Gemäß der vorliegenden Daten konnte kein Zusammenhang zwischen der Ausprägung des MDM4 SNP 34091 und der Histologie, der Zelldifferenzierung sowie dem Erkrankungsstadium zum Diagnosezeitpunkt festgestellt werden (siehe Tabelle 4.20).

**Tabelle 4.20.:** Einfluss des MDM4 SNP 34091 auf klinisch-pathologische Parameter

Klinisch-pathologische Parameter	Fälle	A/A	A/C	C/C	Signifikanz
<b>Histologie</b>					
Endometroid-klassisch	106	60	38	8	0,916
Endometroid-squamös	31	19	10	2	
Endometroid-sekretorisch	15	8	5	2	
Endometroid-villoglandulär	5	3	1	1	
<b>Zelldifferenzierung</b>					
gut (G1)	121	66	44	11	0,493
mäßig (G2)	27	17	9	1	
schlecht (G3)	9	7	1	1	
<b>FIGO-Stadium</b>					
I	117	64	42	11	0,402
II	30	18	11	1	
III	10	8	1	1	
Gesamt	157	90	54	13	

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass beide MDM4 Polymorphismen (SNP 34091 und 31826) einen ähnlichen Einfluss auf das Typ-I-EC haben. Auch hier konnte gezeigt werden, dass das homozygote Minor-Allel (C/C) zum Einen mit einem späteren Diagnosealter und zum Anderen mit einer deutlich schlechteren Prognose, vor allem bei ER-negativen Karzinomen, assoziiert war.

#### 4.5. Einfluss beider MDM4 SNP 31826 und 34091 auf das Typ-I-EC

Bei den Analysen der beiden Polymorphismen des MDM4-Proteins (SNP 31826 und 34091) in den Kapiteln 4.3 und 4.4 fiel auf, dass in beiden Gruppen das homozygote Minor-Allel (T/T beziehungsweise C/C) mit einem späteren Diagnosealter und signifikant schlechterem Überleben assoziiert war. Auch aus der Literatur (siehe Kapitel 1.2.2) ist bekannt, dass diese beiden Polymorphismen häufig in Kombination auftreten und gleichsinnige Effekte haben. Aus diesen Gründen wurde im Folgenden zum Einen untersucht, ob das von ATWAL et al. postulierte Kopplungsgleichgewicht auch in der Studienpopulation nachvollziehbar ist und zum Anderen, ob sich

die Effekte auf das Diagnosealter und die Überlebenszeit bei Kombination der beiden SNP verstärken. Hierzu wurden aus den jeweiligen Genotypkombinationsmöglichkeiten neun Gruppen gebildet und miteinander verglichen.

#### 4.5.1. Überprüfung des Kopplungsgleichgewichts

Sowohl in der vorliegenden Kontroll- als auch Studienpopulation konnte das beschriebene Kopplungsgleichgewicht zwischen dem MDM4 SNP 31826 und 34091 nachgewiesen werden. In circa 90% der Fälle (74 von 84 Kontrollen beziehungsweise 137 von 157 Patientinnen) konnte an beiden Genorten entweder das homozygote Major-beziehungsweise Minor-Allel oder ein heterozygoter Genotyp gefunden werden (vergleiche Tabelle 4.21).

**Tabelle 4.21.:** Genotypenkombinationen der MDM4 SNP 31826 und 34091

MDM4 SNP31826	MDM4 SNP34091	Kontrollen	Fälle	Fälle mit ER-positiven Tumoren	Fälle mit ER-negativen Tumoren
<b>Patientinnen mit Kopplungsgleichgewicht</b>					
C/C	A/A	40	77	37	40
C/T	A/C	30	48	28	20
T/T	C/C	4	12	9	3
<b>Patientinnen ohne Kopplungsgleichgewicht</b>					
C/C	A/C	0	1	0	1
C/C	C/C	0	1	1	0
C/T	A/A	4	11	4	7
C/T	C/C	1	0	0	0
T/T	A/A	0	2	2	0
T/T	A/C	5	5	2	3

#### 4.5.2. Einfluss der MDM4 SNP 31826 und 34091 auf das Diagnosealter

Der Vergleich der Diagnosealter ergab weder in der Gesamtanalyse ( $p=0,335$ ) noch in den separaten Berechnungen für Patientinnen mit ( $p=0,156$ ) beziehungsweise ohne ( $p=0,404$ ) Kopplungsgleichgewicht ein signifikantes Ergebnis (vergleiche Tabelle 4.22). Für die Erstgenannten war ein ähnlicher Trend, wie in den Einzelbetrachtungen der Polymorphismen (vergleiche Kapitel 4.3.2 und 4.4.2) sichtbar: Patientinnen mit den homozygoten Minor-Allelen erkrankten tendenziell später als jene mit homo- oder heterozygoten Major-Allelen. Auch unter Berücksichtigung des ER-Status verstärkte sich dieser Effekt nicht ( $p[\text{ER-positive}]=0,253$ ;  $p[\text{ER-negative}]=0,643$ ). Für Patientinnen ohne Kopplungsgleichgewicht deuteten die Daten daraufhin, dass die Wirkung des MDM4 SNP 31826 in Bezug auf das Manifestationsalter überwog: Trägerinnen des T/T-Genotypen (SNP 31826) erhielten die Diagnose, unabhängig vom

Allelstatus des MDM4 SNP 34091, zu einem späteren Zeitpunkt. Auch in dieser Gruppe ergaben sich unter Berücksichtigung der ER-Expression keine Unterschiede ( $p[\text{ER-positive}] = 0,290$ ;  $p[\text{ER-negative}] = 0,613$ ).

**Tabelle 4.22.:** Einfluss der MDM4 SNP 31826 + 34091 auf das Diagnosealter

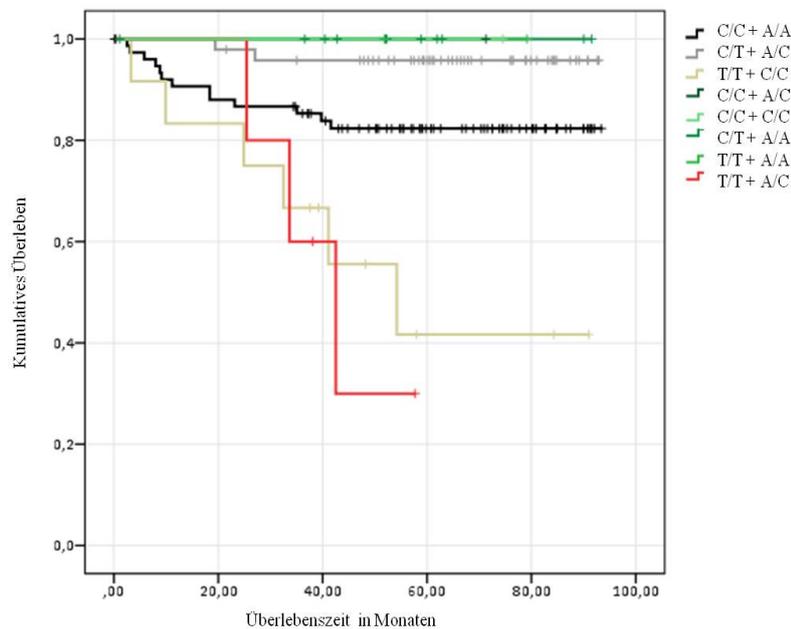
MDM4 SNP31826	MDM4 SNP34091	Fälle	Mittleres Diagnosealter in Jahren	95%-KI	Signifikanz
<b>Patientinnen mit Kopplungsgleichgewicht</b>					
C/C	A/A	77	67,0	41,1-85,8	0,156
C/T	A/C	48	64,9	39,8-86,0	
T/T	C/C	12	70,9	56,4-83,2	
<b>Patientinnen ohne Kopplungsgleichgewicht</b>					
C/C	A/C	1	61,7	-	0,404
C/C	C/C	1	61,1	-	
C/T	A/A	11	69,2	56,3-82,1	
T/T	A/A	2	70,5	68,8-72,2	
T/T	A/C	5	73,8	68,9-80,7	

#### 4.5.3. Einfluss der MDM4 SNP 31826 und 34091 auf das Überleben

Die Überlebensanalysen in Abhängigkeit vom kombinierten Auftreten des MDM4 SNP 31826 und 34091 ergaben für diejenigen Patientinnen, bei denen das Kopplungsgleichgewicht vorlag, den Einzelberechnungen (vergleiche Kapitel 4.3.3 und 4.4.3) entsprechende Ergebnisse (siehe Tabelle 4.23). Trägerinnen der homozygoten Minor-Allele wiesen auch in diesem Vergleich ein erhöhtes Risiko ( $RR = 3,4$ ;  $95\% \text{-KI} = 1,3-9,0$ ;  $p = 0,013$ ) für einen tumorbedingten Tod und verkürzte Überlebenszeiten (55,9 Monate) im Vergleich zu den Frauen mit homo- oder heterozygoten Major-Allelen auf. Dieser Unterschied erreichte jedoch keine statistische Signifikanz ( $p = 0,339$ ). Unter Berücksichtigung der ER-Expression verstärkte sich die beschriebene Wirkung der homozygoten Minor-Allele, wie in der Einzelanalyse, insbesondere für Patientinnen mit ER-negativen Karzinomen ( $p = 0,005$ ). Für diese Fälle stieg das Relative Risiko, am Tumor zu versterben ( $RR = 6,2$ ;  $95\% \text{-KI} = 1,2-30,8$ ;  $p = 0,027$ ), und die mittlere Überlebenszeit sank auf 25,5 Monate. Die Daten der Patientinnen ohne Kopplungsgleichgewicht wiesen daraufhin, dass sich die Wirkungen der „guten“ Major- und „schlechten“ Minor-Allele ausgleichen. So gab es keine tumorbedingten Todesfälle unter jenen Patientinnen, bei denen für einen SNP das homozygote Major- und für den Anderen das homozygote Minor-Allel ermittelt wurde. Insgesamt verstarben in dieser Gruppe nur drei von 20 Frauen an den Folgen der Erkrankung ( $p = 0,021$ ). Bei all diesen konnte der gleiche Genotyp, bezogen auf die beiden SNP (T/T-A/C), und ER-negative Karzinome gefunden werden.

**Tabelle 4.23.:** Einfluss der MDM4 SNP 31826 + 34091 auf das Überleben

MDM4 SNP 31826	MDM4 SNP 34091	Fälle	Verstorbene Fälle	Mittleres Überleben in Monaten	95%-KI	Signifikanz
<b>Patientinnen mit Kopplungsgleichgewicht</b>						
C/C	A/A	77	13	80,0	73,3-86,7	0,339
C/T	A/C	48	2	90,0	86,0-94,0	
T/T	C/C	12	6	55,9	36,2-75,6	
<b>Patientinnen mit Kopplungsgleichgewicht und ER-positiven Tumoren</b>						
C/C	A/A	40	6	76,9	66,6-87,1	0,016
C/T	A/C	20	1	90,5	85,8-95,2	
T/T	C/C	3	2	62,0	41,2-82,8	
<b>Patientinnen mit Kopplungsgleichgewicht und ER-negativen Tumoren</b>						
C/C	A/A	37	7	82,0	73,4-90,5	0,005
C/T	A/C	28	1	88,9	81,9-95,9	
T/T	C/C	9	4	25,5	4,7-46,2	
<b>Patientinnen ohne Kopplungsgleichgewicht</b>						
C/C	A/C	1	0	-	-	0,021
C/C	C/C	1	0	-	-	
C/T	A/A	11	0	-	-	
T/T	A/A	2	0	-	-	
T/T	A/C	5	3	41,9	30,8-53,0	



**Abbildung 4.8.:** Überleben in Abhängigkeit vom MDM4 SNP 31826 und 34091

In der Zusammenschau dieser Ergebnisse ließ sich feststellen, dass die MDM4 Polymorphismen 31826 und 34091 im Kopplungsgleichgewicht vorliegen. Die Daten

deuteten daraufhin, dass sich ihre Wirkungen auf das Typ-I-EC ergänzen jedoch nicht verstärken.

#### **4.6. Einfluss der MDM4 SNP 31826 und 34091 in Kombination mit dem p53 Codon 72 SNP auf das Überleben der Typ-I-EC**

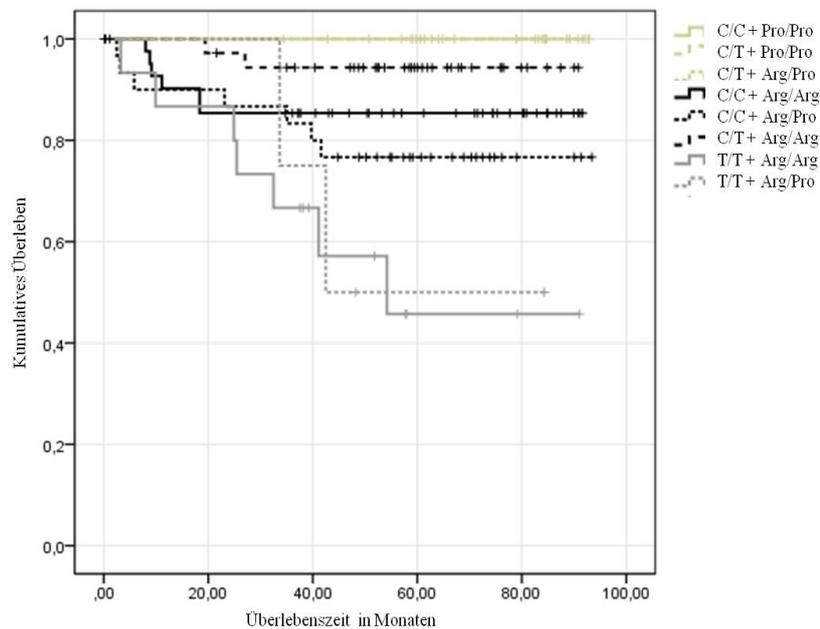
In den separaten Analysen konnte ein, wie in den Kapiteln 4.1, 4.3 und 4.4 beschrieben, prognoseverschlechternder Effekt des homozygoten Minor-Allels der MDM4 SNP 31826 (T/T) beziehungsweise 34091 (C/C) und ein prognoseverbessernder Effekt der homozygoten Prolin-Variante des p53 Codon 72 SNP beobachtet werden. Es stellte sich nun die Frage, inwieweit sich diese beiden Wirkungen beim kombinierten Auftreten der Polymorphismen beeinflussen. Für diese Betrachtung wurden zunächst neun Gruppen durch Kombination der verschiedenen Genotypen gebildet. Diese wurden im zweiten Schritt in Abhängigkeit vom Verlauf ihrer Überlebenskurve in drei Gruppen zusammengefasst.

##### **4.6.1. Einfluss des MDM4 SNP 31826 in Kombination mit dem p53 Codon 72 SNP**

Für die Kombination des MDM4 SNP 31826 mit dem p53 Codon 72 SNP fiel bei der oben genannten Unterteilung auf, dass es keine Fälle gab, bei denen beide Polymorphismen im homozygoten Minor-Allel vorlagen. Eine Aussage darüber, welcher Polymorphismus in seiner Wirkung überwiegt, ließ sich aus diesen Daten dementsprechend nicht treffen. Die in Tabelle 4.24 dargestellten Daten zeigten jedoch, dass Patientinnen, die bezüglich des p53 Codon 72 SNP das homozygote Minor-Allel (C/C entspricht Pro/Pro) trugen oder in beiden SNP den heterozygoten Genotypen aufwiesen (Gruppe 1), innerhalb des Beobachtungszeitraumes nicht verstarben und demnach das beste Überleben hatten. Im Gegensatz dazu hatten Frauen mit T/T-Genotypen, bezogen auf den MDM4 SNP 31826, weiterhin das schlechteste Überleben. Ihr Relatives Risiko für einen tumorbedingten Tod betrug das 5 fache (95%-KI= 2,2-11,4;  $p < 0,000$ ) im Vergleich zu den Frauen mit anderen Genotypen. Etwa die Hälfte dieser Patientinnen (47,4%) verstarb im Beobachtungszeitraum (Gruppe 1: 0,0%; Gruppe 2: 13,6%) und wies zudem mit durchschnittlich 59,0 Monaten wesentlich kürzere Überlebenszeiten auf (Gruppe 1 + 2: 84,9 Monate; 95%-KI= 80,9-89,0;  $p < 0,000$ ). Auch in dieser kombinierten Analyse erhöhte sich das Risiko für Patientinnen mit ER-negativen Karzinomen auf das 11,2 fache (95% -KI= 3,5-35,8;  $p < 0,000$ ).

**Tabelle 4.24.:** Einfluss des MDM4 SNP 31826 + p53 Codon72 auf das Überleben

	MDM4 SNP 31826	p53 Codon72 SNP	Fälle	Verstorbene Fälle	Mittleres Überleben in Monaten	95%-KI	Signifikanz
1	C/C	Pro/Pro	6	0	-	-	<0,000
	C/T	Pro/Pro	3				
	C/T	Arg/Pro	19				
2	C/C	Arg/Arg	41	15	82,7	77,6-87,8	
	C/C	Arg/Pro	32				
	C/T	Arg/Arg	37				
3	T/T	Arg/Arg	15	9	59,0	43,9-74,1	
	T/T	Arg/Pro	4				



**Abbildung 4.9.:** Überleben in Abhängigkeit vom MDM4 SNP 31826 und p53 Cd72 SNP

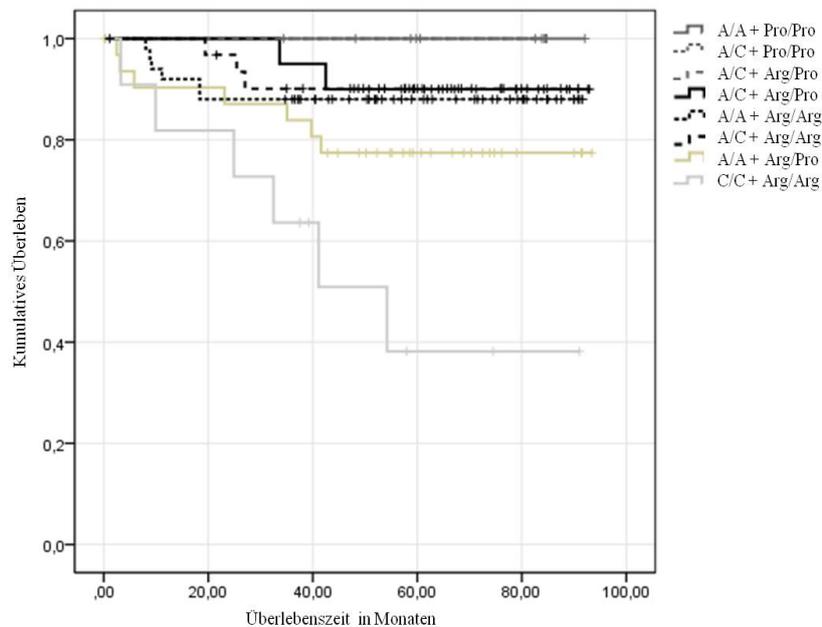
#### 4.6.2. Einfluss des MDM4 SNP 34091 in Kombination mit dem p53 Codon 72 SNP

Die Kombination der Polymorphismen MDM4 SNP 34091 und p53 Codon 72 erbrachte folgende Ergebnisse: Zum Einen gab es auch hier keine Fälle, bei denen bei beiden SNP das homozygote Minor-Allel nachgewiesen werden konnte. Zum Anderen konnte wiederum der prognoseverbessernde Effekt des Pro/Pro-Genotypes beobachtet werden. Allerdings zeigte sich die prognoseverschlechternde Wirkung des homozygoten Minor-Allels des MDM4 SNP 34091 (C/C) weniger deutlich: In Abhängigkeit von dem Allelstatus des p53 Codon 72 SNP hatten Frauen mit C/C-Genotyp ein sehr gutes (C/C + Arg/Pro) oder ein sehr schlechtes Überleben (C/C

+ Arg/Arg). Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die Effekte des p53 Codon 72 SNP die des MDM4 SNP 34091 überwogen.

**Tabelle 4.25.:** Einfluss des MDM4 SNP 34091 + p53 Codon72 auf das Überleben

	MDM4 SNP 34091	p53 Codon72 SNP	Fälle	Verstorbene Fälle	Mittleres Überleben in Monaten	95%-KI	Signifikanz
1	A/A A/C C/C	Pro/Pro Pro/Pro Arg/Pro	6 3 2	0	-	-	<0,000
2	A/A A/C A/C	Arg/Arg Arg/Arg Arg/Pro	51 31 20	11	84,9	80,4-89,4	
3	A/A	Arg/Pro	33	7	77,2	66,3-88,1	
4	C/C	Arg/Arg	11	6	53,3	32,9-73,7	



**Abbildung 4.10.:** Überleben in Abhängigkeit vom MDM4 SNP 34091 und p53 Cd72 SNP

Zusammenfassend ließ sich ein prognostisch günstiger Effekt des homozygoten Minor-Allels des p53 Codon 72 SNP (Pro/Pro) auf das Typ-I-EC feststellen, der unabhängig von anderen Polymorphismen und dem ER-Status auftrat. Während sich das Diagnosealter dieser Patientinnen nicht vom Gesamtkollektiv unterschied, hatten sie ein wesentlich besseres Überleben in dem Maße, dass keine von ihnen im Beobachtungszeitraum an den Folgen der Erkrankung verstarb. Im Gegensatz dazu konnte für die homozygoten Minor-Allele der MDM4-Polymorphismen 31826 (T/T) und 34091 (C/C) ein prognoseverschlechternder Effekt festgestellt werden, welcher

sich bei ER-negativen Typ-I-EC verstärkte. Tumore mit diesen Genotypen traten zwar signifikant später in Erscheinung, hatten dann aber einen aggressiveren Verlauf, verbunden mit einem verkürzten Überleben, obwohl sie zum Diagnosezeitpunkt weder spätere Krankheitsstadien noch schlechtere Differenzierungen aufwiesen. Bei kombiniertem Vorliegen der MDM4 SNP ergänzten sich diese Effekte. Ob sich diese positiven und negativen Effekte dieser 3 SNP gegenseitig aufheben, konnte anhand der vorliegenden Daten nicht eindeutig gezeigt werden. Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die Wirkungen der Polymorphismen MDM4 SNP 31826 und p53 Codon 72 etwa gleichwertig waren, wohingegen der Effekt des MDM4 SNP 34091 dem des p53 Codon 72 unterlag.

#### 4.7. Einfluss der Polymorphismen auf das Typ-II-EC

Wie bereits eingangs erläutert, beinhaltete das betrachtete Studienkollektiv eine sehr begrenzte Anzahl an Typ-II-EC-Patientinnen (13). Aussagen über etwaige Zusammenhänge konnten aus diesen Daten dementsprechend nicht gezogen werden. Im Folgenden werden die erhaltenen Ergebnisse aus Gründen der Vollständigkeit kurz tabellarisch zusammengefasst.

**Tabelle 4.26.:** Einfluss des p53 Codon 72 SNP auf das Typ-II-EC

	Gesamt	Arg/Arg	Arg/Pro	Pro/Pro	Signifikanz
<b>Allelverteilung</b>					
Kontrollen	77	47	28	2	0,013
Patientinnen	13	3	8	2	
<b>Diagnosealter</b>					
Mittleres Diagnosealter in Jahren	71,3 (69,9-72,8)	71,2 (64,4-78,1)	71,3 (68,9-73,6)	71,8 (67,4-76,1)	0,969
<b>Überleben</b>					
Verstorbene Fälle	8	2	6	0	0,664
Mittleres Überleben in Monaten (95%-KI)	43,6 (25,2-62,0)	40,0 (12,6-40,9)	32,6 (11,2-54,0)	-	

**Tabelle 4.27.:** Einfluss des MDM2 SNP 309 auf das Typ-II-EC

	Gesamt	T/T	T/G	G/G	Signifikanz
<b>Allelverteilung</b>					
Kontrollen	98	48	40	10	0,383
Patientinnen	13	9	3	1	
<b>Diagnosealter</b>					
Mittleres Diagnosealter in Jahren	71,3 (69,9-72,8)	71,5 (69,4-73,7)	71,0 (66,6-75,4)	70,5	0,908
<b>Überleben</b>					
Verstorbene Fälle	8	6	1	1	0,565
Mittleres Überleben in Monaten (95%-KI)	43,6 (25,2-62,0)	34,1 (18,6-49,7)	61,1	15,0	

**Tabelle 4.28.:** Einfluss des MDM4 SNP 31826 auf das Typ-II-EC

	Gesamt	C/C	C/T	T/T	Signifikanz
<b>Allelverteilung</b>					
Kontrollen	84	40	35	9	0,027
Patientinnen	13	5	3	5	
<b>Diagnosealter</b>					
Mittleres Diagnosealter in Jahren	71,3 (69,9-72,8)	70,8 (66,2-75,3)	72,5 (69,0-76,0)	71,2 (69,5-72,9)	0,652
<b>Überleben</b>					
Verstorbene Fälle	8	4	2	2	0,464
Mittleres Überleben in Monaten (95%-KI)	43,6 (25,2-62,0)	27,5 (13,8-41,1)	30,7 (0,0-61,4)	56,6 (26,1-87,1)	

**Tabelle 4.29.:** Einfluss des MDM4 SNP 34091 auf das Typ-II-EC

	Gesamt	A/A	A/C	C/C	Signifikanz
<b>Allelverteilung</b>					
Kontrollen	182	105	66	11	0,259
Patientinnen	13	5	6	2	
<b>Diagnosealter</b>					
Mittleres Diagnosealter in Jahren	71,3 (69,9-72,8)	70,8 (66,2-75,3)	71,9 (70,6-73,2)	70,9 (48,6-93,2)	0,752
<b>Überleben</b>					
Verstorbene Fälle	8	4	3	1	0,696
Mittleres Überleben in Monaten (95%-KI)	43,6 (25,2-62,0)	27,5 (13,8-41,1)	40,9 (18,2-63,5)	49,1	

## 5. Diskussion

### 5.1. Einfluss der Polymorphismen auf das Typ-I-EC

#### 5.1.1. MDM4 SNP 31826

In der vorliegenden Arbeit konnte ein relevanter Einfluss des Minor-Allels (T) des MDM4 SNP 31826 bei homozygoter Ausprägung auf das endometroide EC gezeigt werden. Frauen, bei denen der T/T-Genotyp nachgewiesen werden konnte, erkrankten zwar 5,2 Jahre später als jene mit homozygotem C/C- und heterozygotem Genotyp, hatten im Vergleich zu ihnen dann aber ein wesentlich schlechteres Überleben. Dieses äußerte sich in einem fünffach erhöhten Relativen Risiko für einen tumorbedingten Tod und in einer um durchschnittlich 2 Jahre verkürzten Überlebenszeit. Besonders deutlich konnte dieser prognoseverschlechternde Effekt bei Betroffenen mit ER-negativen Karzinomen beobachtet werden. Das Relative Risiko verdoppelte sich für diese Gruppe und 83,3% dieser Patientinnen verstarben an den Folgen der Erkrankung. Sie überlebten im Mittel 29,7 Monate und damit circa 4,4 Jahre weniger als das Gesamtkollektiv. Entgegen der Erwartungen wurden die Karzinome dieser Frauen überwiegend in frühen Tumorstadien (FIGO I) diagnostiziert, wiesen eine sehr gute histologische Differenzierung (G1) auf und unterschieden sich damit nicht von den Tumoren anderer Genotypen. Diese Daten deuten daraufhin, dass die Ausprägung des MDM4 SNP 31826 weniger die Entstehung als vielmehr den Verlauf und/oder das Therapieansprechen des endometroiden EC beeinflusst. Auf welchen zellbiologischen Mechanismen dieser Effekt beruht, konnte bislang noch nicht abschließend geklärt werden und ist Teil aktueller und künftiger Studien. Auch die Ergebnisse dieser Arbeit beschränken sich auf rein deskriptive Aussagen und lassen keine Rückschlüsse auf mögliche Pathomechanismen zu. Ein Effekt des MDM4 SNP 31826 auf die Tumorgenese wurde bisher erst in zwei Publikationen an Ovarial- und Mamma-, nicht jedoch an Endometriumkarzinomen untersucht. Da man genetische Alterationen, insbesondere wenn sie sich auf einen Einzelbasenaustausch beschränken, immer im gewebspezifischen und tumorbiologischen Kontext betrachten muss, ist die Vergleichbarkeit dieser Ergebnisse mit den hier beschriebenen begrenzt. Diesbezügliche Unterschiede könnten eine Ursache dafür sein, dass die bereits publizierten Daten von den Arbeitsgruppen um ATWAL und KULKARNI von den hier

vorliegenden abweichen. ATWAL et al. untersuchten unter anderem den MDM4 SNP 31826 an 110 sporadischen und 95 familiären Ovarialkarzinomen und beobachteten für Patientinnen mit dem T/T-Genotyp, im Vergleich zu denjenigen mit C/C- und C/T-Genotyp, ein signifikant früheres Diagnosealter und längeres Überleben [91]. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen KULKARNI et al. für ER-negative Mammakarzinome in ihrer Untersuchung an insgesamt 823 Brustkrebspatientinnen [92]. Diese Ergebnisse würden also eher auf einen prognoseverbessernden Effekt des homozygoten Minor-Allels (T/T) schließen lassen und stünden damit im Gegensatz zu den Erkenntnissen der vorliegenden Arbeit. Als mögliche Einflussgrößen auf den Effekt des Allelstatus des SNP 31826 auf die Tumorgenese wurden in diesen Untersuchungen populationspezifische Eigenschaften und der Östrogenrezeptorstatus angegeben. Sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch in den beiden genannten, entstammt die Mehrheit der untersuchten Fälle der kaukasischen Bevölkerung. Zudem entsprechen die Allelfrequenzen des hier betrachteten Studienkollektivs denjenigen, die in Gendatenbanken veröffentlicht wurden (siehe Tabelle A.2 im Anhang), so dass diese Störgröße die Ergebnisse nicht beeinflussen sollte. Eine Abhängigkeit des Effektes vom Östrogenrezeptorstatus konnte auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden: Wie oben beschrieben, verdoppelte sich das Relative Risiko für einen tumorbedingten Tod für Patientinnen mit T/T-Genotyp und ER-negativen Tumoren. KULKARNI et al. führte dieses Phänomen auf den höheren Grad genomischer Instabilität zurück, der für diese Subgruppe charakteristisch ist [128]. Auch beim EC könnte dies ein Grund für den verstärkten Effekt des T/T-Genotypen auf das Überleben der Patientinnen sein, da verschiedene Studien den Verlust des Östrogenrezeptors mit dem Auftreten von „high-grade“-EC, einem höheren Metastasierungs- und Rezidivrisiko sowie einer damit einhergehenden schlechteren Prognose assoziieren konnten [129–131]. In der vorliegenden Arbeit konnte dieser Zusammenhang jedoch nicht gezeigt werden: Frauen mit ER-negativen Tumoren und T/T-Genotyp wurden, entgegen der Erwartungen, nicht häufiger in fortgeschrittenen Tumorstadien diagnostiziert und ihre Karzinome wiesen auch keine schlechte Differenzierung auf. Allerdings umfasste diese Subgruppe zum Einen lediglich sechs Patienten und zum Anderen wiesen nur neun Patientinnen eine schlechte Tumordifferenzierung (G3) auf. Die Wertigkeit dieser Aussage ist damit sehr begrenzt. Des Weiteren vermuteten KULKARNI et al. eine direkte oder indirekte Interaktion zwischen dem Östrogenrezeptor  $\alpha$  (ER  $\alpha$ ) und MDM4, wie sie beim Strukturhomologen MDM2 bekannt ist [75, 132]. Inzwischen gelang es, eine derartige Interaktion, im Sinne einer negativen Rückkopplungsschleife, auf Expressions- und Proteinebene nachzuweisen [127]. Inwieweit dieses Zusammenspiel die Tumorgenese oder die Wirkung des MDM4 SNP 31826 tatsächlich beeinflusst, ist zum aktuellen Zeitpunkt noch unklar und könnte Gegenstand künftiger Studien sein. Als wesentliche Unterschiede dieser und der publizierten Arbeiten, lassen sich letztlich die Kollektivgröße und

die untersuchte Tumorentität benennen. Sowohl diese als auch ATWALs Studie befasste sich mit einer relativ geringen Fallzahl (157 versus 205 Fälle). Von den 157 untersuchten Patientinnen wiesen nur 19 den T/T-Genotyp auf, was die Aussagekraft der Ergebnisse deutlich einschränkt. Ovarial- und Mammakarzinome unterscheiden sich bezüglich ihrer Tumorbiologie und Mutationsprofile erheblich von den Endometriumkarzinomen [133]. Dies beeinflusst die Vergleichbarkeit der Auswirkung eines Einzelbasenaustausches, wie beim MDM4 SNP 31826, vermutlich am stärksten. Eine aktuelle Studie von GANSMO et al. konnte zum Beispiel zeigen, dass die MDM4-Expression in Endometriumkarzinomzellen wesentlich stärker ist als in Ovarialkarzinomzellen [114]. Für eine solche Überexpression konnte in einer anderen Arbeit die Blockade der Zellseneszenz und eine damit einhergehende begünstigte Tumorförderung gezeigt werden [134]. Zudem bestätigten Untersuchungen an diversen Tumorzellen, darunter Mamma-, Bronchial- und Kolonkarzinome, Melanome [135], Glioblastome [136] und Weichteilsarkome [96], den Zusammenhang zwischen einer hohen MDM4-Expression und der Tumorgenese. Gemäß der aktuellen Datenlage, die von einem Einfluss des MDM4 SNP 31826 auf das Expressionsprofil des MDM4 ausgeht, sind variable Effekte desselbigen, insbesondere in Geweben deren MDM4-Konzentrationen sich unterscheiden, zu erwarten und eine Verstärkung des Effektes in Tumoren mit MDM4-Überexpression, wie dem EC, vorstellbar. Man geht derzeit davon aus, dass der Einzelbasenaustausch (Cytosin > Thymin) einen direkten oder indirekten Einfluss auf alternative Spleißvorgänge der MDM4-mRNA hat. Dabei soll die Thymin-Ausprägung zur Expression kürzerer MDM4-Isoformen (MDM4-S und MDM4-211) führen, für die eine Stabilisierung von MDM2 und MDM4 und infolgedessen eine effektivere Hemmung des Tumorsuppressors p53 gezeigt werden konnte [93–95]. Daraus resultieren eine höhere Mutationsrate, die verminderte Fähigkeit zur DNA-Reparatur, reduzierter Zellzyklusarrest, Seneszenz und Apoptose sowie letztlich eine beschleunigte Kanzerogenese und Tumorprogression [91]. Eine bevorzugte Expression kurzer MDM4-mRNA-Isoformen bedeutet außerdem eine reduzierte Konzentration gewöhnlicher, der „full-length“- , MDM4-mRNA (MDM4-FL), sodass sich das zelluläre Verhältnis MDM4-S / MDM4-FL zugunsten der kurzen Spleißvariante verschiebt. Verschiedene Studien an Weichteil- [96] und Osteosarkomen [97], Glioblastomen [98] und papillären Schilddrüsenkarzinomen [99] konnten dieses Ungleichgewicht beobachten und mit fortgeschrittenen Tumorstadien, einem höheren Metastasierungsrisiko und schlechteren Überleben assoziieren. Ob die Ausprägung des Thymin-Allels des MDM4 SNP 31826 der Grund für die Überexpression kurzen MDM4-Isoformen ist, wurde in diesen Studien allerdings nicht untersucht. Gleichfalls wurden die MDM4-Konzentrationen im vorliegenden Kollektiv nicht gemessen, sodass eine eindeutige Kausalität zum jetzigen Zeitpunkt nicht angegeben werden kann. Diese Zusammenhänge könnten den negativen Einfluss des T/T-Genotyp auf

den Verlauf des Typ-I-EC jedoch plausibel erklären und sollten in größeren Studien weiter untersucht werden.

### 5.1.2. MDM4 SNP 34091

Als weiterer Negativprädiktor konnte in dieser Arbeit die Ausprägung des homozygoten Minor-Allels (C/C) des MDM4 SNP 34091 identifiziert werden. Der Einfluss dieses SNP auf das Verhalten des EC entsprach dabei demjenigen des oben beschriebenen MDM4 SNP 31826. Auch hier korrelierte der C/C-Genotyp, im Vergleich zu den anderen Genotypen, mit einem tendenziell späteren Erkrankungsalter und einem schlechteren Überleben, ohne mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium oder einer schlechteren Differenzierung assoziiert zu sein. So konnte bei Trägerinnen des homozygoten Minor-Allels ein 4,3 fach erhöhtes Risiko festgestellt werden, am Tumor zu versterben. Etwa die Hälfte von ihnen erlag den Folgen der Erkrankung und wies zusätzlich eine deutlich verkürzte Überlebenszeit von 59,1 Monaten auf. Im Vergleich zu Patientinnen mit anderen Genotypen bedeutete dies eine reduzierte Lebenserwartung von 2,1 Jahren. Wie beim MDM4 SNP 31826 verdoppelte sich das Relative Risiko für einen tumorbedingten Tod bei jenen Frauen mit ER-negativen Karzinomen. Zwei Drittel von ihnen verstarben im Beobachtungszeitraum durchschnittlich nach 25,5 Monaten. Im Gegensatz zum oben beschriebenen MDM4 SNP 31826 sind die zellbiologischen Veränderungen, zu denen der Einzelbasenaustausch (Adenin > Cytosin) des MDM4 SNP 34091 führt, bekannt. Die Ausprägung des Cytosins an dieser Stelle schafft eine neue Bindungsstelle für mikro-RNA (hsa-miR-191 und miR-887) [101, 102]. Die Bindung dieser mikro-RNA hat die Destabilisierung und Reduktion der Konzentration der MDM4-mRNA zur Folge. Die daraus resultierenden dezimierten MDM4-Proteinlevel führen zu einer Stabilisierung des Tumorsuppressors p53, einhergehend mit einer effektiveren zellulären Stressantwort und retardierten Tumorgenese [105]. Dementsprechend würde man für das Minor-Allel (Cytosin), im Gegensatz zu den hier gezeigten negativen Auswirkungen, eher reduzierte Erkrankungsrisiken und einen prognoseverbessernden Effekt erwarten. Seit der Erstbeschreibung dieses SNP im Jahr 2010 durch WYNENDAELE et al. befasste sich eine Vielzahl von Studien mit dem Einfluss des SNP auf das Risiko an verschiedenen Tumorentitäten zu erkranken und kam zu heterogenen Ergebnissen. Für Non-Hodgkin-Lymphome [106], Prostata- [102, 107] und Ösophaguskarzinome [108] ließ sich der postulierte, prognoseverbessernde Effekt des C-Allels bestätigen. An Ovarial- und Mammakarzinomen konnten in verschiedenen Untersuchungen sowohl risikoreduzierende [101, 109, 110] als auch risikoe erhöhende [111–114] Effekte beobachtet werden. Eine aktuelle Studie von GANSMO et al. an 1404 norwegischen EC-Patientinnen konnte schließlich, wie die vorliegende Arbeit, keinen Zusammenhang zwischen dem Allelstatus des MDM4 SNP 34091 und dem Risiko für das Auf-

treten des EC feststellen. Eine Wirkung auf das Diagnosealter oder das Überleben wurde bislang noch nicht untersucht. Als mögliche Erklärung für diese konträren Ergebnisse wurden, wie bereits für den MDM4 SNP 31826 beschrieben, zum Einen populationsspezifische Unterschiede der Allelverteilung angegeben und zum Anderen divergierende Mutationsprofile der einzelnen Karzinome in Betracht gezogen [114]. Vor diesem Hintergrund lassen sich die Ergebnisse dieser Arbeit am ehesten mit denen der Arbeitsgruppe um GANSMO vergleichen, obgleich sich deren Aussagen auf das Erkrankungsrisiko beschränken. Beide Untersuchungen stimmen in populations- und tumorspezifischen Merkmalen weitestgehend überein, unterscheiden sich aber erheblich in der Kollektivgröße (170 versus 1404; darunter C/C-Genotypen: 15 versus 106). Die Aussagekraft der hier beschriebenen Effekte ist damit deutlich geringer als in der norwegischen Studie und sollte an größeren Kollektiven überprüft werden. Des Weiteren bezogen GANSMO et al. ihre Analysen auf alle EC und ließen dabei Subklassifizierungen, insbesondere die Trennung zwischen Typ-I- und Typ-II-EC, und den Östrogenrezeptorstatus außer Acht. Dies könnte zur Maskierung möglicher Effekte führen, da auch das EC aus zellulärer Sicht keine homogene Tumorentität darstellt und gravierende Unterschiede bezüglich Differenzierungsgrad und häufigen Mutationen nachgewiesen werden konnten. Diese Arbeit konzentrierte sich aufgrund mangelnder Fallzahlen auf das endometroide EC und konnte beispielsweise eine verstärkte Wirkung des MDM4 SNP 34091 bei fehlendem Östrogenrezeptorbesatz zeigen. Wie bereits beschrieben, deutet dieser bei gynäkologischen Tumoren auf eine schlechtere Differenzierung und höhere genomische Instabilität des Gewebes hin, was eine Verstärkung der beobachteten Wirkung bei ER-negativen Karzinomen erklären könnte [129–131]. Letztlich sprechen die Daten dafür, dass der MDM4 SNP 34091 zwar keinen relevanten Effekt auf die Entstehung des endometroiden EC hat, da weder das Tumorrisiko noch das Diagnosealter signifikante Unterschiede aufweisen, jedoch der Verlauf und/oder das Therapieansprechen von dem Allelstatus des SNP beeinflusst werden können.

### **5.1.3. Kombination von MDM4 SNP 31826 und 34091**

Der Einfluss des C-Allels des MDM4 SNP 34091 auf das Erkrankungsalter und die Überlebenszeit zeigte sich weniger deutlich als beim MDM4 SNP 31826. Für die Kombination beider SNPs konnten einander ergänzende Effekte beobachtet werden. Es besteht demnach die Möglichkeit, dass die zellulären Mechanismen, auf denen die Wirkungen der SNP basieren, miteinander interagieren und sich überlagern können. ATWAL et al. postulierten, dass zwischen beiden Polymorphismen ein Kopplungsgleichgewicht („linkage disequilibrium“) bestehe, sich ihr Allelstatus also gleichsinnig verändere [91]. Dieses konnte auch in der hier untersuchten Studienpopulation

beobachtet werden: Bei etwa 90% der Frauen lag an beiden Stellen entweder das homozygote Major- /Minor-Allel oder Heterozygotie vor. Da man für den MDM4 SNP 31826 bisher keinen definitiven Pathomechanismus identifizieren konnte, schrieb man dem SNP 34091 den vorrangigen Effekt zu [114]. Ein eindeutiger Beweis steht allerdings bislang aus. Die Daten dieser Arbeit lassen eher auf eine entgegengesetzte Hierarchie schließen und zeigen die Wichtigkeit der Integration einzelner genetischer Alterationen und/oder Variationen in das komplexe Zellgefüge. Die Klärung definitiver Zusammenhänge der Interaktion der beiden SNP untereinander und mit anderen Proteinen im EC ist bis auf Weiteres ausstehend und sollte Gegenstand künftiger Studien sein.

#### **5.1.4. p53 Codon 72 Polymorphismus**

Neben den Minor-Allelen der beiden MDM4-Polymorphismen, die mit einem negativen Einfluss auf den Verlauf des Typ-I-EC assoziiert waren, konnte in dieser Arbeit außerdem ein mutmaßlicher Positivprädiktor identifiziert werden. Die Daten ließen darauf schließen, dass sich die Prognose der Pro/Pro-Trägerinnen bezüglich des p53 Codon72 SNP verbesserte. Diese Ergebnisse erreichten zwar keine statistische Signifikanz, waren aber als deutlicher Trend sichtbar und sollten in größeren Studien verifiziert werden. Während kein relevanter Einfluss dieses SNP auf das Erkrankungsrisiko oder -alter festgestellt werden konnte, fiel bei der Überlebensanalyse auf, dass keine der Pro/Pro - Patientinnen im Beobachtungszeitraum an den Folgen des Tumors verstarb. Zudem wurden ihre Karzinome alle im frühen Tumorstadium (FIGO I) diagnostiziert und wiesen einen hohen Differenzierungsgrad (G1) auf. Diese kleine Gruppe von neun Frauen hatte demnach einen deutlichen Überlebensvorteil, im Vergleich zu jenen Patientinnen mit homo- oder heterozygotem Arg-Status. Wo bei für die beiden letztgenannten Gruppen kein tatsächlicher Überlebensnachteil in Bezug auf das Gesamtkollektiv gefunden werden konnte. Die Wahrscheinlichkeit, am Tumor zu versterben und ihre Überlebenszeiten entsprachen den Durchschnittswerten aller Typ-I-EC-Patientinnen. Dieser Effekt lässt sich durch die zellbiologischen Veränderungen, die für den SNP beschrieben wurden, erklären: Man geht davon aus, dass die beiden Allele des SNP die Funktionsweise von p53 modulieren. Für die Arginin-(Wildtyp)-Form beobachtete man eine verstärkte Apoptoseinduktion, was den Organismus zunächst vor der Entstehung von Tumoren schützt, im Gegenzug jedoch, bei Manifestation tumoröser Erkrankungen, eine verkürzte Überlebenszeit zur Folge hat [69]. Die Prolin-Form leitet hingegen häufiger den G1-Zellzyklusarrest ein, woraus eine höhere Kapazität zur DNA-Reparatur resultiert. Dementsprechend konnte man dieses Allel mit einer höheren Tumorzinzidenz auf der einen Seite und einem verlängerten Überleben auf der anderen Seite korrelieren [63, 71]. Dieser Überlebensvorteil der Pro/Pro-Trägerinnen zeigte sich auch in der vorliegenden Arbeit,

obgleich weder eine Assoziation zu Tumorinzidenz oder Diagnosezeitpunkt gefunden wurde noch ein Effekt der Arginin-Form auftrat. Bisher befasste sich bereits eine Vielzahl kleiner Studien an unterschiedlichen Populationen mit dem Einfluss des p53 Codon72 SNP auf das EC. TANG et al. fassten 2012 die Daten aus neun bis dato veröffentlichten Fall-Kontroll-Studien [87, 88, 137–143], die insgesamt 829 EC-Patientinnen inkludierten, in einer großen Metaanalyse zusammen. Diese konnte, weder für die kaukasische noch für die asiatische Population, eine signifikante Assoziation zwischen dem Allelstatus des p53 Codon72 SNP und dem Risiko für das EC zeigen [144], was dem Ergebnis der hier vorliegenden Arbeit entspricht. 2014 veröffentlichten ZAJAC et al. eine weitere diesbezügliche Studie an 152 polnischen EC-Patientinnen und beobachtete eine Senkung des Erkrankungsrisikos für Pro-Trägerinnen [90]. Auch diese Untersuchung beschränkt sich allerdings auf eine relativ geringe Fallzahl und unterliegt in ihre Aussagekraft damit der großen Metaanalyse. Keine der bisher publizierten Studien betrachtete zudem den Einfluss auf das Diagnosealter oder die Überlebenszeiten, sodass etwaige Zusammenhänge möglicherweise unentdeckt blieben. Des Weiteren unterschieden sie nicht zwischen den verschiedenen Tumorentitäten, was, wie bereits erläutert, bestehende Effekte verschleiern könnte. Vor dem Hintergrund, dass die Tumorgenese nicht auf singulären genetischen Veränderungen beruht, untersuchten einige dieser und anderer Studien, neben dem Einzeleffekt des p53 Codon72 SNP, zusätzlich die Auswirkung dieses SNP in Kombination mit dem MDM2 SNP 309 auf das EC [87–90]. Dabei konnten sie für die Kombination MDM2 SNP 309 G/G-p53 Codon72 Arg/Arg ein erhöhtes Erkrankungsrisiko und eine Assoziation zur schlechteren Differenzierung der Tumoren feststellen. Sie folgerten aus diesen Beobachtungen einen größeren Effekt der kombinierten Genotypen, auf die sich künftige Studien fokussieren sollten. Auch in dieser Arbeit wurde dieser Zusammenhang untersucht, erbrachte allerdings keine relevanten Ergebnisse. Ein Grund dafür könnten die geringen Fallzahlen sein.

#### **5.1.5. Kombination der MDM4- und des p53 Codon72 Polymorphismus**

Es stellte sich schließlich die Frage, inwieweit sich der negative Einfluss der homozygoten Minor-Allele der beiden MDM4 SNP und der lebensverlängernde Effekt der homozygoten Pro-Variante des p53 Codon72 SNP ergänzen. Bei dieser kombinierten Analyse fiel zunächst auf, dass es keine Fälle gab, bei denen an beiden SNP das homozygote Minor-Allel nachgewiesen werden konnte. Dies ist vermutlich der Tatsache geschuldet, dass diese Genotypen, für sich betrachtet, nur bei etwa 10% der europäischen Population vorhanden sind und deren Kombination in einem Studienkollektiv aus 157 Patientinnen unwahrscheinlich ist. Aus diesem Grund lässt sich anhand der hier vorliegenden Daten keine definitive Aussage darüber treffen, welcher Effekt bei

gleichzeitigem Auftreten des „guten“ (Pro/Pro) und „schlechten“ (T/T beziehungsweise C/C) Allels überwiegt. Im Fall des MDM4 SNP 31826 entsprachen die Ergebnisse der verbleibenden Genotyp-Kombinationen denen der Einzelanalysen. Das bedeutet Patientinnen mit dem T/T-Genotyp zeigten weiterhin, unabhängig vom Allelstatus des p53 Codon72 SNP, das kürzeste Überleben (59,0 versus 84,9 Monate) und ein fünffach erhöhtes Risiko für einen tumorbedingten Tod im Vergleich zu jenen Frauen mit C/C-oder C/T-Genotypen. Pro/Pro-Trägerinnen verstarben hingegen nicht und hatten damit einen Überlebensvorteil. In Anbetracht der Tatsache, dass relevante Überlebensunterschiede nur für die homozygoten Minor-Allele gefunden wurden, entsprachen diese Ergebnisse den Erwartungen. Für die Kombination p53 Codon72 SNP und MDM4 SNP 34091 ergab sich Ähnliches: Der prognoseverbessernde Effekt des Pro/Pro-Status setzte sich auch hier durch, während der negative Einfluss des homozygoten C-Allels nicht dominierte. In Abhängigkeit von dem Allelstatus des p53 Codon72 SNP zeigten C/C-Trägerinnen ein besseres (C/C + Arg/Pro) oder schlechteres (C/C + Arg/Arg) Überleben, im Vergleich zum Gesamtkollektiv. Daraus lässt sich schließen, dass die Wirkungen des p53 Codon72 SNP diejenigen des MDM4 SNP 34091 überwiegen. Dies unterstreicht den Verdacht, dass der Effekt dieses Polymorphismus auf das EC weniger relevant ist. Mögliche Zusammenhänge und/oder Interaktionen zwischen diesen drei Polymorphismen wurden bisher noch nicht beschrieben, was Anlass für weitere Studien an größeren Kollektiven sein sollte.

#### **5.1.6. MDM2 SNP 309**

In der vorliegenden Studie konnte kein relevanter Einfluss des MDM2 SNP 309 auf das EC gezeigt werden. Zwar ließ sich ein tendenziell erniedrigtes Erkrankungsrisiko für Patientinnen mit T/T-Genotypen beobachten (OR= 0,58; 95%-KI = 0,35-0,97), welches jedoch, in Anbetracht des großen Konfidenzintervalls, keine statistische Signifikanz erreichte. Auch in Bezug auf das Diagnosealter und das Überleben der Patientinnen war kein statistisch signifikanter Effekt feststellbar. Wie in Kapitel 1.2.2 beschrieben, handelt es sich beim MDM2 SNP 309 um einen vielfach untersuchten Polymorphismus, für dessen Minor-Allel (G) erhöhte zelluläre MDM2-Konzentrationen verbunden mit einer abgeschwächten p53-Aktivität gezeigt werden konnten. Daraus resultierend beobachtete man bei Patienten, die das G-Allel trugen, eine beschleunigte Kanzerogenese, einhergehend mit früher Tumormanifestation und häufigerem Auftreten von Zweittumoren [73]. Für diese Effekte konnten im Folgenden östrogenabhängige Unterschiede gezeigt werden, was den Fokus der Forschung auf hormonrezeptorpositive Karzinome, wie das EC, lenkte [75, 76]. Man fand heraus, dass das Guanin-Allel die Bindungsaffinität des Transkriptionsfaktors SP1 verstärkt und dieser, insbesondere in Kooperation mit dem Östrogen-

ER $\alpha$ -Komplex, die MDM2-Expression aktiviert [84–86]. Infolgedessen steigen die MDM2-Konzentrationen in ER-positiven Zellen bis auf das 30 fache, im Vergleich zu ER-negativen, an [83]. WANG et al. fassten 2014 die Daten aus sieben, bis dahin veröffentlichten, Fall-Kontroll-Studien mit insgesamt 1967 EC-Fällen [79, 80, 87, 89, 90, 145] in einer großen Metaanalyse zusammen. Die Autoren folgerten aus diesen Daten ein signifikant reduziertes Erkrankungsrisiko für das T-Allel im Vergleich zum G-Allel (OR= 0.76; 95%-KI= 0.64-0.90, p=0.002). Sie konstatierten daraus einen relevanten Einfluss des MDM2 SNP 309 auf die Karzinogenese des EC, insbesondere für das östrogenabhängige endometroide EC der postmenopausalen Frau [146]. Die hier gezeigten Daten bestätigen dieses Ergebnis, obgleich keine statistische Signifikanz gezeigt werden konnte. Dies lässt sich vermutlich mit der verhältnismäßig kleinen Kollektivgröße begründen. Einige dieser Studien untersuchten weiterhin den Einfluss des SNP auf das Diagnosealter und Tumorstadien des EC [79, 80, 141, 145]. Nur einer dieser vier Studien gelang es dabei, eine insignifikante Assoziation des G-Allels zu einem früheren Diagnosealter zu beobachten (KNAPPSKOG et al.: T/T 66,5 Jahre; T/G 66,0 Jahre; G/G 64,9 Jahre [145]). Auch in den vorliegenden Daten konnte diesbezüglich kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden. Jedoch zeigte sich in der ER-abhängigen Analyse der von KNAPPSKOG et al. postulierte Effekt des G-Allels, für die ER-positiven Fälle (T/T 67,9 Jahre; T/G 67,4 Jahre; G/G 66,7 Jahre; p=0,942). Für ER-negative Karzinome konnte zudem ein reziproker ebenfalls nicht statistisch signifikanter Trend des G-Allels gezeigt werden (T/T 65,0 Jahre; T/G 66,6 Jahre; G/G 70,8 Jahre; p=0,258). Obwohl diese Beobachtungen keine allgemeingültige Aussage zulassen, unterstreichen sie die beschriebenen östrogenabhängigen Effekte des MDM2 SNP 309 und geben Anlass für weitere Studien an größeren Kollektiven.

## 5.2. Limitationen der Studie

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden anhand der Daten von 170 EC-Patientinnen durchgeführt, die im Zeitraum zwischen 1998 und 2002 in Halle und Merseburg behandelt wurden. Als Kontrollen dienten insgesamt 182 gesunde Blutspenderinnen aus derselben Region und Altersgruppe. Relevante alters-, geschlechts- und populationsspezifische Unterschiede konnten damit weitestgehend ausgeschlossen werden. Zudem entsprachen die nachgewiesenen Allelfrequenzen der Kontrollen, den in SNP-Datenbanken publizierten, sodass man diesbezüglich von der Repräsentativität dieses Kollektivs ausgehen kann (siehe Tabelle A.2 im Anhang). Allerdings wurden nicht alle Kontrollen für alle untersuchten Polymorphismen genotypisiert, weshalb ihre Gruppengröße relativ klein war und für die einzelnen SNP variierte. Es konnte sich daher nicht immer auf dieselben Vergleichspersonen bezogen wer-

den, worin eine Fehlerquelle liegen könnte. Der größte Kritikpunkt dieser Arbeit ist jedoch, wie auch schon mehrfach erwähnt, in der relativ geringen Kollektivgröße zu suchen. So lassen sich anhand der Daten von 170 Fällen nur schwerlich allgemeingültige, definitive Aussagen über beobachtete Effekte treffen. Zumal sich die Fallzahl durch die Separierung der beiden Tumorentitäten und diverse Gruppeneinteilungen, die im Verlauf der Auswertung nötig wurden, zusätzlich minimierte. Entsprechend der populationsspezifischen Allelfrequenzen resultierten daraus, für die seltenen Minor-Allele, von denen man die größten Effekte erwartete, Gruppengrößen von neun bis 21 Fällen, was bei Weitem nicht als repräsentativ zu bewerten ist. Allerdings sollten sich relevante Effekte, sofern sie vorhanden sind, auch in kleinen Kollektiven, zumindest als Trend zeigen. Als eben solche sind die hier beschriebenen Ergebnisse zu werten. Sie sollten in jedem Fall an größeren Kollektiven überprüft werden. Aus der Literatur ist weiterhin bekannt, dass genetische Alterationen, wie SNP, insbesondere bei Typ-II-EC und „high-grade“ Typ-I-EC von Bedeutung sind. Diese sind in der vorliegenden Studie deutlich unterrepräsentiert. Neben den 13 Typ-II-EC-Patientinnen, die aufgrund der geringen Fallzahlen von vornherein ausgeschlossen wurden, zeigten nur neun von 157 endometrioiden EC einen schlechten Differenzierungsgrad (G3). 94% der untersuchten Tumore wiesen damit eine sehr gute oder mäßige Differenzierung (G1 oder G2) auf und gehörten damit nicht zu der beschriebenen Risikogruppe. Für diese Patientinnen, mit sogenannten „low-grade“ EC, spielen, wie in Kapitel 1.1.2 erläutert, andere Risikofaktoren, wie Östrogenexposition und Übergewicht, eine vordergründige Rolle. Dies schließt zwar zusätzliche, möglicherweise additive, Einflüsse durch genetische Alterationen nicht aus, könnte sie jedoch aufgrund der größeren Effektstärke maskieren. Daten zu diesen patientenbezogenen Merkmalen wurden für das vorliegende Kollektiv nicht erhoben und konnten daher nicht mit den Polymorphismen korreliert oder in die statistischen Berechnungen als mögliche Confounder einbezogen werden. Des Weiteren sind diese „low-grade“-Tumore mit einer sehr guten Prognose assoziiert, welche auch in dieser Arbeit bestätigt werden konnte. Nur 24 der 157 Patientinnen (14,1%) verstarben innerhalb des Beobachtungszeitraumes an den Folgen des EC. Die Analyse zum Einfluss der SNP auf das Überleben beschränkte sich infolgedessen auf die Daten dieser 24 Fälle, womit sich der Kreis zur begrenzten Aussagekraft der geringen Kollektivgröße schließt.

### **5.3. Ausblick und klinische Relevanz**

Insgesamt gelang es dieser Arbeit einige Effekte verschiedener Polymorphismen auf das Typ-I-EC zu zeigen. Insbesondere die Aussagen über die Beeinflussung des Diagnosealters und das Überleben der Patientinnen ergänzen die aktuelle Datenlage,

obgleich sie natürlich an größeren Kollektiven verifiziert werden sollten. Künftige Studien sollten außerdem die hier unterrepräsentierten Gruppen der Typ-II- und „high-grade“ Typ-I-EC fokussieren, da für diese bisher zum Einen keine präventiv beeinflussbaren Risikofaktoren bekannt sind und es zum Anderen bisher nicht gelang, ihre schlechte Prognose therapeutisch zu verbessern. Die Identifizierung genetischer Veränderungen und Zellinteraktionen sollte daher weiter im Mittelpunkt der Forschung stehen, um Biomarker zu finden, die eine frühe Diagnose und Risikostratifizierung ermöglichen und um zielgerichtete Therapiemöglichkeiten zu entwickeln.

## 6. Zusammenfassung

Mit dieser Arbeit konnte ein weiterer Beitrag zur Aufklärung der Wirkung verschiedener Einzelnukleotidpolymorphismen auf das Typ-I-EC geleistet werden. Insbesondere die Aussagen über die Beeinflussung des Diagnosealters und das Überleben der Patientinnen ergänzen dabei die aktuelle Datenlage. Die Ergebnisse des vorliegenden Studienkollektivs deuten auf einen prognoseverschlechternden Effekt der Minor-Allele der beiden MDM4 Polymorphismen 31826 und 34091 hin. Tumore mit diesen Genotypen traten zwar signifikant später in Erscheinung, hatten dann aber einen aggressiveren Verlauf, verbunden mit einem verkürzten Überleben, obwohl sie zum Diagnosezeitpunkt weder spätere Krankheitsstadien noch schlechtere Differenzierungen aufwiesen. So wurden die Diagnosen bei Frauen mit T/T-Genotyp, bezüglich des SNP 31826, im Mittel mit 71,6 Jahren (95%-KI= 67,9-75,4,  $p=0,070$ ) gestellt und damit 5,2 Jahre (95%-KI= 0,6-9,9 ;  $p=0,028$ ) später als bei Patientinnen mit anderen Genotypen. Auf der anderen Seite zeigten sie von diesem Zeitpunkt an, ein deutlich erhöhtes Relatives Risiko für einen tumorbedingten Tod (RR= 5,0; 95%-KI = 2,2-11,4;  $p<0,000$ ) und ein verkürztes Überleben von durchschnittlich 59,0 Monaten (95%-KI= 43,9-74,1,  $p<0,000$ ), was im Vergleich zum Kollektivdurchschnitt eine reduzierte Überlebenszeit von etwa 2 Jahren bedeutete. Dieser Effekt verstärkte sich bei Patientinnen mit ER-negativen Tumoren. Sie hatten ein 11,2 fach erhöhtes Relatives Risiko (95%-KI= 3,5-35,8;  $p<0,000$ ), am Tumor zu versterben und überlebten im Durchschnitt nur 29,7 Monate (95%-KI= 18,1-41,3;  $p<0,000$ ). Ähnliche Ergebnisse ergaben sich für den SNP 34091. Auch hier zeigte sich, bei Trägerinnen des homozygoten Minor-Allels, ein tendenziell späteres Erkrankungsalter (C/C: 70,3 Jahre; 95%-KI= 64,5-75,9;  $p=0,290$ ), ein erhöhtes Relatives Risiko für einen tumorbedingten Tod (RR= 4,3; 95%-KI= 1,7-10,8;  $p=0,002$ ) sowie ein verkürztes Überleben von durchschnittlich 59,1 Monaten (95%-KI= 40,3-78,0,  $p=0,002$ ). Im Vergleich zu jenen Fällen mit anderen Genotypen bedeutete dies eine Verschlechterung der Prognose von etwa 2,1 Jahren (A/A und A/C= 84,0 Monate; 95%-KI= 79,9-88,1;  $p=0,001$ ). Wie beim SNP 31826 verstärkte sich der Effekt des C-Allels bei Patientinnen mit ER-negativen Karzinomen. Das Relative Risiko, am Tumor zu versterben, verdoppelte sich (RR=7,6; 95%-KI= 1,6-35,0;  $p=0,010$ ) und die Überlebenszeit sank auf durchschnittlich 25,5 Monate (95%-KI= 4,7-46,2,  $p= 0,009$ ). Bei kombiniertem Vorliegen der MDM4 SNP ergänzten sich diese Effekte. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die MDM4 Polymorphismen 31826 und 34091 zum Einen

im Kopplungsgleichgewicht vorliegen und miteinander interagieren. Zum Anderen geben sie Anhalt dafür, dass sie weniger die Tumorentstehung als viel mehr den -progress beziehungsweise das Therapieansprechen beeinflussen und ihre Wirkung in Abhängigkeit vom Östrogenrezeptorstatus betrachtet werden muss. Im Gegensatz dazu, konnte außerdem ein prognostisch günstiger Effekt des homozygoten Minor-Allels des p53 Codon 72 SNP auf das Typ-I-EC beobachtet werden. Dieser trat unabhängig von anderen Polymorphismen und dem ER-Status auf. Während sich das Diagnosealter dieser Patientinnen nicht vom Gesamtkollektiv unterschied, hatten sie ein wesentlich besseres Überleben in dem Maße, dass keine von ihnen im Beobachtungszeitraum an den Folgen der Erkrankung verstarb. Ob sich die positiven und negativen Effekte dieser drei SNP gegenseitig aufheben, konnte anhand der vorliegenden Daten nicht eindeutig gezeigt werden. Des Weiteren gelang es in dieser Arbeit nicht, einen relevanten Einfluss des Polymorphismus MDM2 SNP 309 auf das Typ-I-EC nachzuweisen sowie eine Aussage über die Wirkung aller vier SNP auf „high-grade“-Typ-I-EC und Typ-II-EC zu treffen. Hierfür und zur Bestätigung der beschriebenen Ergebnisse sollten künftig weitere Studien an größeren Kollektiven angestrebt werden.

## Literatur

1. Trabert, B., Wentzensen, N., Felix, A. S. *u. a.* Metabolic syndrome and risk of endometrial cancer in the united states: a study in the SEER-medicare linked database. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **24**, 261–267 (2015).
2. Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R. *u. a.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer* **136**, E359–86 (2015).
3. Siegel, R., Miller, K. & Jemal, A. Cancer statistics, 2015. *A cancer Journal for Clinicians*, 5–29 (2015).
4. Robert Koch Institut. Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland: Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010: Eine Veröffentlichung des Zentrums für Krebsregisterdaten am RKI, 88–93 (2010).
5. Robert Koch Institut. Krebs in Deutschland 2011/2012, 86–89 (2015).
6. Key, T. J. & Pike, M. C. The dose-effect relationship between 'unopposed' oestrogens and endometrial mitotic rate: its central role in explaining and predicting endometrial cancer risk. *British journal of cancer* **57**, 205–212 (1988).
7. Furness, S., Roberts, H., Marjoribanks, J. *u. a.* *Cochrane Database of Systematic Reviews: Hormone therapy in postmenopausal women and risk of endometrial hyperplasia* 8. Aufl. (John Wiley & Sons, Ltd, Chichester und UK, 2012).
8. Von Gruenigen, V. E., Gil, K. M., Frasure, H. E. *u. a.* The impact of obesity and age on quality of life in gynecologic surgery. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **193**, 1369–1375 (2005).
9. Renehan, A. G., Tyson, M., Egger, M. *u. a.* Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet (London, England)* **371**, 569–578 (2008).
10. Deutsche Krebsgesellschaft e.V. AWMF S1-Leitlinie Onkologie / Gynäkologie: Diagnostik und Therapie des Endometriumkarzinom (2008).

11. Grady, D., Gebretsadik, T., Kerlikowske, K. *u. a.* Hormone replacement therapy and endometrial cancer risk: a meta-analysis. *Obstetrics and gynecology* **85**, 304–313 (1995).
12. Pike, M. C., Peters, R. K., Cozen, W. *u. a.* Estrogen-progestin replacement therapy and endometrial cancer. *Journal of the National Cancer Institute* **89**, 1110–1116 (1997).
13. Nagamani, M., Stuart, C. A., Dunhardt, P. A. *u. a.* Specific binding sites for insulin and insulin-like growth factor I in human endometrial cancer. *American journal of obstetrics and gynecology* **165**, 1865–1871 (1991).
14. O’Mara, B. A., Byers, T. & Schoenfeld, E. Diabetes mellitus and cancer risk: a multisite case-control study. *Journal of chronic diseases* **38**, 435–441 (1985).
15. Friberg, E., Orsini, N., Mantzoros, C. S. *u. a.* Diabetes mellitus and risk of endometrial cancer: a meta-analysis. *Diabetologia* **50**, 1365–1374 (2007).
16. Goerke, K., Steller, J. & Valet, A. *Klinikleitfaden Gynäkologie, Geburtshilfe* 9. Aufl., 515–520 (Elsevier Urban Fischer, München, 2015).
17. Morice, P., Leary, A., Creutzberg, C. *u. a.* Endometrial cancer. *Lancet (London, England)* **387**, 1094–1108 (2016).
18. Bokhman, J. V. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecologic Oncology* **15**, 10–17 (1983).
19. Brinton, L. A., Felix, A. S., McMeekin, D. S. *u. a.* Etiologic heterogeneity in endometrial cancer: evidence from a Gynecologic Oncology Group trial. *Gynecologic Oncology* **129**, 277–284 (2013).
20. Cancer Genome Atlas Research Network, Kandoth, C., Schultz, N. *u. a.* Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature* **497**, 67–73 (2013).
21. Byron, S. A. & Pollock, P. M. FGFR2 as a molecular target in endometrial cancer. *Future oncology (London, England)* **5**, 27–32 (2009).
22. Kuhn, E., Ayhan, A., Bahadirli-Talbott, A. *u. a.* Molecular characterization of undifferentiated carcinoma associated with endometrioid carcinoma. *The American journal of surgical pathology* **38**, 660–665 (2014).
23. Astrup, K. & Olivarius, N. F. Frequency of spontaneously occurring postmenopausal bleeding in the general population. *Acta obstetrica at gynecologica Scandinavica* **83**, 203–207 (2004).
24. Salman, M. C., Bozdog, G., Dogan, S. *u. a.* Role of postmenopausal bleeding pattern and women’s age in the prediction of endometrial cancer. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 484–488 (2013).

25. Kommission Uterus der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V. *Empfehlungen für die Diagnostik und Therapie des Endometriumkarzinoms* (Hrsg. Kommission Uterus der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V.) 2013.
26. Havrilesky, L. J., Maxwell, G. L., Chan, J. K. *u. a.* Cost effectiveness of a test to detect metastases for endometrial cancer. *Gynecologic oncology* **112**, 526–530 (2009).
27. Werner, H. M. J., Trovik, J., Halle, M. K. *u. a.* Stathmin protein level, a potential predictive marker for taxane treatment response in endometrial cancer. *PLoS ONE* **9**, e90141 (2014).
28. Zeimet, A. G., Reimer, D., Huszar, M. *u. a.* L1CAM in early-stage type I endometrial cancer: results of a large multicenter evaluation. *Journal of the National Cancer Institute* **105**, 1142–1150 (2013).
29. Pathiraja, P., Haldar, K. & Dhar, S. Serous endometrial intraepithelial carcinoma: a case series and literature review. *Cancer Management and Research*, 117 (2013).
30. Arem, H., Park, Y., Pelsler, C. *u. a.* Prediagnosis Body Mass Index, Physical Activity, and Mortality in Endometrial Cancer Patients. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* **105**, 342–349 (2013).
31. Calle, E. E., Rodriguez, C., Walker-Thurmond, K. *u. a.* Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *The New England journal of medicine* **348**, 1625–1638 (2003).
32. Lane, D. P. & Crawford, L. V. T antigen is bound to a host protein in SY40-transformed cells. *Nature* **278**, 261–263 (1979).
33. Linzer, D. I. & Levine, A. J. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* **17**, 43–52 (1979).
34. Malkin, D., Li, F. P., Strong, L. C. *u. a.* Germ Line p53 Mutations in a Familial Syndrome of Breast Cancer, Sarcomas, and Other Neoplasms. *Science*, 1233–1238 (1990).
35. Hainaut, P. & Hollstein, M. p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Advances in cancer research* **77**, 81–137 (2000).
36. Vousden, K. p53: Death Star. *Cell*, 691–694 (2000).
37. Chen, X., Ko, L. J., Jayaraman, L. *u. a.* p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. *Genes & Development* **10**, 2438–2451 (1996).

38. Ginsberg, D., Mehta, F., Yaniv, M. *u. a.* Wild-type p53 can down-modulate the activity of various promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **88**, 9979–9983 (1991).
39. Zhang, L., Yu, D., Hu, M. *u. a.* Wild-Type p53 Suppresses Angiogenesis in Human Leiomyosarcoma and Synovial Sarcoma by transcriptional Suppression of Vascular Endothelial growth Factor Expression. *Cancer research*, 3655–3661 (2000).
40. Ashcroft, M. & Vousden, K. H. Regulation of p53 stability. *Oncogene* **1999**, 7637–7643.
41. Chen, D., Kon, N., Li, M. *u. a.* ARF-BP1/Mule Is a Critical Mediator of the ARF Tumor Suppressor. *Cell* **121**, 1071–1083 (2005).
42. Dornan, D., Bheddah, S., Newton, K. *u. a.* COP1, the Negative Regulator of p53, Is Overexpressed in Breast and Ovarian Adenocarcinomas. *Cancer research*, 7226–7230 (2004).
43. Leng, R. P., Lin, Y., Ma, W. *u. a.* Pirh2, a p53-Induced Ubiquitin-Protein Ligase, Promotes p53 Degradation. *Cell* **112**, 779–791 (2003).
44. Yamasaki, S., Yagishita, N., Sasaki, T. *u. a.* Cytoplasmic destruction of p53 by the endoplasmic reticulum-resident ubiquitin ligase ‘Synoviolin’. *The EMBO Journal*, 113–122 (2007).
45. Kubbutat, M. H. G., Vousden, K. H. & Jones, S. N. Regulation of p53 stability by mdm2. *Nature*, 299–303 (1997).
46. Toledo, F. & Wahl, G. MDM2 and MDM4: p53 regulators as targets in anti-cancer therapy. *Biochem Cell Biol*, 1476–1482. (2008).
47. Oliner, J. D., Kinzler, K. W., Meltzer, P. S. *u. a.* Amplifikation of gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature*, 80–83 (1992).
48. Barak, Y., Gottlieb, E., Juven-Gershon, T. *u. a.* Regulation of mdm2 expression by p53: alternative promoters produce transcripts with nonidentical translation potential. *Genes & Development* **8**, 1739–1749 (1994).
49. Oliner, J. D., Pietenpol, J. A., Thiagalingam, S. *u. a.* Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature* **362**, 857–860 (1993).
50. Jayaraman, L. & Prives, C. Covalent and noncovalent modifiers of the p53. *Cellular and Molecular Life Science*, 76–87 (1999).
51. Lakin, N. & Jackson, S. Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene*, 7644–7655 (1999).

52. Ma, Y., Yuan, R., Meng, I. D. Q. Goldberg *u. a.* p53-Independent Down-Regulation of Mdm2 in Human Cancer Cells Treated with Adriamycin. *Molecular Cell Biology Research Communications* **3**, 122–128 (2000).
53. Midgley, C., Desterro, J., Saville, M. *u. a.* An N-terminal p14ARF peptide blocks Mdm2-dependent ubiquitination in vitro and can activate p53 in vivo. *Oncogene*, 2312–2323 (2000).
54. Shvarts, A., Steegenga, W., Riteco, N. *u. a.* MDMX: a novel p53-binding protein with some functional properties of MDM2. *The EMBO Journal* **15**, 5349–5357 (1996).
55. Sharp, D. Stabilization of the MDM2 Oncoprotein by Interaction with the Structurally Related MDMX Protein. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 38189–38196 (1999).
56. Jackson, M. & Berberich, S. MdmX Protects p53 from Mdm2-Mediated Degradation. *Molecular and Cellular Biology* **20**, 1001–1007 (2000).
57. Sakaguchi, K., Sakamoto, H., Lewis, M. *u. a.* Phosphorylation of Serine 392 Stabilizes the Tetramer Formation of TumorSuppressor Protein p53. *Biochemistry*, 10117–10124 (1997).
58. Gu, W. & Roeder, R. Activation of p53 Sequence-Specific DNA Binding by Acetylation of the p53 C-Terminal Domain. *Cell*, 595–606 (1997).
59. Shaw, P., Freeman, J., Bovey, R. *u. a.* Regulation of specific DNA binding by p53: evidence for a role for O-glycosylation and charged residues at the carboxy-terminus. *Oncogene* **12**, 921–930 (1996).
60. Simbulan-Rosenthal, C., Rosenthal, D., Luo, R. *u. a.* Poly(ADP-ribosyl)ation of p53 during Apoptosis in Human Osteosarcoma Cells. *Cancer research*, 2190–2194 (1999).
61. Gostissa, M., Hengstermann, A., Fogal, V. *u. a.* Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1. *The EMBO Journal*, 6462–6471 (1999).
62. Sakaguchi, K., Herrera, J., Saito, S. *u. a.* DNA damage activates p53 through a phosphorylation–acetylation cascade. *Genes & Development*, 2831–2841 (1998).
63. Bojesen, S. & Nordestgaard, B. The common germline Arg72Pro polymorphism of p53 and increased longevity in humans. *Cell Cycle*, 158–163 (2008).
64. Bond, G., Hu, W. & Levine, A. A Single Nucleotide Polymorphism in the MDM2 Gene From a Molecular and Cellular Explanation to Clinical Effect. *Cancer Res*, 5481–5484 (2005).
65. Buchman, V., Chumakov, P., Ninkina, N. *u. a.* A variation in the structure of the protein-coding region of the human p53 gene. *Gene* **70**, 245–252 (1988).

66. Sakamuro, D., Sabbatini, P., White, E. *u. a.* The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest. *Oncogene*, 887–898 (1997).
67. Thomas, M., Kalita, A., Labrecque, S. *u. a.* Two Polymorphic Variants of Wild-Type p53 Differ Biochemically and Biologically. *Molecular and Cellular Biology* **19**, 1092–1100 (1999).
68. Marin, M., Jost, C., Brooks, L. *u. a.* A common polymorphism acts as an intragenic modifier of mutant p53 behaviour. *Nature Genetics*, 47–54 (2000).
69. Dumont, P., Leu, J., Della, P. *u. a.* The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nature Genetics* **33**, 357–365 (2003).
70. Sullivan, A., Syed, N., Gasco, M. *u. a.* Polymorphism in wild-type p53 modulates response to chemotherapy in vitro and in vivo. *Oncogene* **23**, 3328–3337 (2004).
71. Pim, D. & Banks, L. p53 polymorphic variants at codon 72 exert different effects on cell cycle progression. *International Journal of Cancer* **108**, 196–199 (2004).
72. Dahabreh, I., Schmid, C., Lau, J. *u. a.* Genotype Misclassification in Genetic Association Studies of the rs1042522 TP53 (Arg72Pro) Polymorphism: A Systematic Review of Studies of Breast, Lung, Colorectal, Ovarian, and Endometrial Cancer. *American Journal of Epidemiology* **177**, 1317–1325 (2013).
73. Bond, G., Hu, W., Bond, E. *u. a.* A Single Nucleotide Polymorphism in the MDM2 Promoter Attenuates the p53 Tumor Suppressor Pathway and Accelerates Tumor Formation in Humans. *Cell* **119**, 591–602 (2004).
74. Zaubermann, A., Flusberg, D., Haupt, Y. *u. a.* A functional p53responsive intronic promoter is contained within the human mdm2 gene. *Nucleic Acids Research* **23**, 2584–2592 (1995).
75. Bond, G. L., Hirshfield, K., Kirchhoff, T. *u. a.* MDM2 SNP309 Accelerates Tumor Formation in a Gender-Specific and Hormone-Dependent Manner. *Cancer research* **66**, 5104–5110 (2006).
76. Alhopuro, P., Ylisaukko-Oja, S., Koskinen, W. *u. a.* The MDM2 promoter polymorphism SNP309T–G and the risk of uterine leiomyosarcoma, colorectal cancer, and squamous cell carcinoma of the head and neck. *Journal of medical genetics* **42**, 694–698 (2005).
77. Galic, V., Willner, J., Wollan, M. *u. a.* Common polymorphisms in TP53 and MDM2 and the relationship to TP53 mutations and clinical outcomes in women with ovarian and peritoneal carcinomas. *Genes, Chromosomes and Cancer* **46**, 239–247 (2007).

78. Yarden, R., Friedman, E., Metsuyanin, S. *u. a.* MDM2 SNP309 accelerates breast and ovarian carcinogenesis in BRCA1 and BRCA2 carriers of Jewish–Ashkenazi descent. *Breast Cancer Research and Treatment* **111**, 497–504 (2008).
79. Walsh, C., Miller, C., Karlan, B. *u. a.* Association between a functional single nucleotide polymorphism in the MDM2 gene and sporadic endometrial cancer risk. *Gynecologic Oncology* **104**, 660–664 (2007).
80. Terry, K., McGrath, M., Lee, I. *u. a.* MDM2 SNP309 Is Associated with Endometrial Cancer Risk. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* **17**, 983–986 (2008).
81. Ueda, M., Yamamoto, M., Nunobiki, O. *u. a.* Murine double-minute 2 homolog single nucleotide polymorphism 309 and the risk of gynecologic cancer. *Human Cell* **22**, 49–54 (2009).
82. Wo, X., Han, D., Sun, H. *u. a.* MDM2 SNP309 contributes to tumor susceptibility: A meta-analysis. *Journal of Genetics and Genomics* (2011).
83. Sheikh, M., Shao, Z., Hussain, A. *u. a.* The p53-binding Protein MDM2 Gene Is Differentially Expressed in Human Breast Carcinoma. *Cancer research*, 3226–3228 (1993).
84. Stoner, M., Wormke, M., Saville, B. *u. a.* Estrogen regulation of vascular endothelial growth factor gene expression in ZR-75 breast cancer cells through interaction of estrogen receptor alpha and SP proteins. *Oncogene* **23**, 1052–1063 (2003).
85. Kinyamu, H. & Archer, T. Estrogen receptor-dependent proteasomal degradation of the glucocorticoid receptor is coupled to an increase in mdm2 protein expression. *Molecular and Cellular Biology*, 5867–5881 (2003).
86. Petz, L., Ziegler, Y., Schultz, J. *u. a.* Differential regulation of the human progesterone receptor gene through an estrogen response element half site and Sp1 sites. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **88**, 113–122 (2004).
87. Ashton, K., Proietto, A., Otton, G. *u. a.* Polymorphisms in TP53 and MDM2 combined are associated with high grade endometrial cancer. *Gynecologic Oncology*, 10–114 (2009).
88. Nunobiki, O., Ueda, M., Yamamoto, M. *u. a.* Polymorphisms of p53 codon 72 and MDM2 promoter 309 and the risk of endometrial cancer. *Human Cell* **22**, 101–106 (2009).
89. Yoneda, T., Kuboyama, A., Kato, K. *u. a.* Association of MDM2 SNP309 and TP53 Arg72Pro polymorphisms with risk of endometrial cancer. *Oncology Reports*, 25–34 (2013).

90. Zajac, A., Smolarz, B., Stachowiak, G. *u. a.* TP53 and MDM2 polymorphisms and the risk of endometrial cancer in postmenopausal women. *Medical oncology (Northwood, London, England)* **31**, 286 (2014).
91. Atwal, G., Kirchhoff, T., Bond, E. *u. a.* Altered tumor formation and evolutionary selection of genetic variants in the human MDM4 oncogene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 10236–10241 (2009).
92. Kulkarni, D., Vazquez, A., Haffty, B. *u. a.* A polymorphic variant in human MDM4 associates with accelerated age of onset of estrogen receptor negative breast cancer. *Carcinogenesis* **30**, 1910–1915 (2009).
93. Rallapalli, R., Strachan, G., Cho, B. *u. a.* A Novel MDMX Transcript Expressed in a Variety of Transformed Cell Lines Encodes a Truncated Protein with Potent p53 Repressive Activity. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 8299–8308 (1999).
94. Giglio, S., Mancini, F., Gentiletti, F. *u. a.* Identification of an Aberrantly Spliced Form of HDMX in Human Tumors: A New Mechanism for HDM2 Stabilization. *Cancer research* **65**, 9687–9694 (2005).
95. LeBron, C., Chen, L., Gilkes, D. *u. a.* Regulation of MDMX nuclear import and degradation by Chk2 and 14-3-3. *The EMBO Journal* **25**, 1196–1206 (2006).
96. Bartel, F., Schulz, J., Böhnke, A. *u. a.* Significance of HDMX-S (or MDM4) mRNA splice variant overexpression and HDMX gene amplification on primary soft tissue sarcoma prognosis. *International Journal of Cancer* **177**, 496 (2005).
97. Lenos, K., Grawenda, A. M., Lodder, K. *u. a.* Alternate splicing of the p53 inhibitor HDMX offers a superior prognostic biomarker than p53 mutation in human cancer. *Cancer research* **72**, 4074–4084 (2012).
98. Riemenschneider, M., Knobbe, C. & Reifenberger, G. Refined mapping of 1q32 amplicons in malignant gliomas confirms MDM4 as the main amplification target. *International Journal of Cancer* **104**, 752–757 (2003).
99. Prodosmo, A., Giglio, S., Moretti, S. *u. a.* Analysis of human MDM4 variants in papillary thyroid carcinomas reveals new potential markers of cancer properties. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* **86**, 585–596 (2008).
100. Zhang, H., Cui, J., Jia, L. *u. a.* Comparison of laparoscopy and laparotomy for endometrial cancer. *International Journal of Gynecology & Obstetrics* **116**, 185–191 (2012).

101. Wynendaele, J., Böhnke, A., Leucci, E. *u. a.* An illegitimate microRNA target site within the 3' UTR of MDM4 affects ovarian cancer progression and chemosensitivity. *Cancer research* **70**, 9641–9649 (2010).
102. Stegeman, S., Moya, L., Selth, L. A. *u. a.* A genetic variant of MDM4 influences regulation by multiple microRNAs in prostate cancer. *Endocrine Related Cancer* **22**, 265–276 (2015).
103. Yekta, S., Shih, I. & Bartel, D. MicroRNA-Directed Cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* **304**, 594–596 (2004).
104. Pillai, R., Bhattacharyya, S., Artus, C. *u. a.* Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human Cells. *Science*, 1573–1576 (2005).
105. Wu, L., Fan, J. & Belasco, J. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 4034–4039 (2006).
106. Fan, C., Wei, J., Yuan, C. *u. a.* The functional TP53 rs1042522 and MDM4 rs4245739 genetic variants contribute to Non-Hodgkin lymphoma risk. *PLoS ONE* **9**, e107047 (2014).
107. Eeles, R. A., Olama, A. A. A., Benlloch, S. *u. a.* Identification of 23 new prostate cancer susceptibility loci using the iCOGS custom genotyping array. *Nature Genetics* **45**, 385–91, 391e1–2 (2013).
108. Zhou, L., Zhang, X., Li, Z. *u. a.* Association of a Genetic Variation in a miR-191 Binding Site in MDM4 with Risk of Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *PLoS ONE* **8**, e64331 (2013).
109. Liu, J., Tang, X., Li, M. *u. a.* Functional MDM4 rs4245739 genetic variant, alone and in combination with P53 Arg72Pro polymorphism, contributes to breast cancer susceptibility. *Breast Cancer Research and Treatment* **140**, 151–157 (2013).
110. Gansmo, L. B., Knappskog, S., Romundstad, P. *u. a.* Influence of MDM2 SNP309 and SNP285 status on the risk of cancer in the breast, prostate, lung and colon. *International Journal of Cancer* **137**, 96–103 (2015).
111. Garcia-Closas, M., Couch, F. J., Lindstrom, S. *u. a.* Genome-wide association studies identify four ER negative-specific breast cancer risk loci. *Nature Genetics* **45**, 392–8, 398e1–2 (2013).
112. Stevens, K. N., Vachon, C. M. & Couch, F. J. Genetic susceptibility to triple-negative breast cancer. *Cancer research* **73**, 2025–2030 (2013).
113. Purrington, K. S., Slager, S., Eccles, D. *u. a.* Genome-wide association study identifies 25 known breast cancer susceptibility loci as risk factors for triple-negative breast cancer. *Carcinogenesis* **35**, 1012–1019 (2014).

114. Gansmo, L. B., Bjørnslett, M., Halle, M. K. *u. a.* The MDM4 SNP34091 (rs4245739) C-allele is associated with increased risk of ovarian—but not endometrial cancer. *Tumor Biology* (2016).
115. Miller, V. & Duckles, S. Vascular Actions of Estrogens: Functional Implications. *Pharmacological Reviews* **60**, 210–241 (2008).
116. Yue, W., Santen, R., Wang, J. *u. a.* Genotoxic metabolites of estradiol in breast: potential mechanism of estradiol induced carcinogenesis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **86**, 477–486 (2003).
117. Kuiper, G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M. *u. a.* Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 5925–5930 (1996).
118. Gosden, J., Middleton, P. & Rout, D. Localization of the human oestrogen receptor gene to chromosome 6q24—q27 by in situ hybridization. *Cytogenetics and cell genetics* **43**, 218–220 (1986).
119. Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Grandien, K. *u. a.* Human Estrogen Receptor -Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **82**, 4258–4265 (1997).
120. Liang, J. & Shang, Y. Estrogen and Cancer. *Annual Review of Physiology* **75**, 225–240 (2013).
121. Weihua, Z., Saji, S., Mäkinen, S. *u. a.* Estrogen receptor (ER) beta, a modulator of ERalpha in the uterus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 5936–5941 (2000).
122. Liu, G., Schwartz, J. & Brooks, S. Estrogen receptor protects p53 from deactivation by human double minute-2. *Cancer research* **60**, 1810–1814 (2000).
123. Liu, G., Schwartz, J. & Brooks, S. p53 down-regulates ER-responsive genes by interfering with the binding of ER to ERE. *Biochemical and biophysical research communications* **264**, 359–364 (1999).
124. Musgrove, E., Caldon, C., Barraclough, J. *u. a.* Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nature Reviews Cancer* **11**, 558–572 (2011).
125. Caldon, C., Sutherland, R. & Musgrove, E. Cell cycle proteins in epithelial cell differentiation: implications for breast cancer. *Cell Cycle* **9**, 1918–1928 (2010).
126. Duong, V., Boule, N., Daujat, S. *u. a.* Differential Regulation of Estrogen Receptor Turnover and Transactivation by Mdm2 and Stress-Inducing Agents. *Cancer research* **67**, 5513–5521 (2007).

127. Swetzig, W. M., Wang, J. & Das, G. M. Estrogen receptor alpha (ERalpha/ESR1) mediates the p53-independent overexpression of MDM4/MDMX and MDM2 in human breast cancer. *Oncotarget* **7**, 16049–16069 (2016).
128. Alli, E., Sharma, V. B., Sunderesakumar, P. *u. a.* Defective repair of oxidative dna damage in triple-negative breast cancer confers sensitivity to inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase. *Cancer research* **69**, 3589–3596 (2009).
129. Salvesen, H. B., Haldorsen, I. S. & Trovik, J. Markers for individualised therapy in endometrial carcinoma. *The Lancet. Oncology* **13**, e353–61 (2012).
130. Trovik, J., Wik, E., Werner, Henrica M J *u. a.* Hormone receptor loss in endometrial carcinoma curettage predicts lymph node metastasis and poor outcome in prospective multicentre trial. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* **49**, 3431–3441 (2013).
131. Bartosch, C., Monteiro-Reis, S., Vieira, R. *u. a.* Endometrial Endometrioid Carcinoma Metastases Show Decreased ER-Alpha and PR-A Expression Compared to Matched Primary Tumors. *PLoS ONE* **10**, e0134969 (2015).
132. Phelps, M., Darley, M., Primrose, J. *u. a.* p53-independent activation of the hdm2-P2 promoter through multiple transcription factor response elements results in elevated hdm2 expression in estrogen receptor alphapositive breast cancer cells. *Cancer Res* 2003;63(10):2616–23. (2003).
133. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **490**, 61–70 (2012).
134. Miller, K. R., Kelley, K., Tuttle, R. *u. a.* HdmX overexpression inhibits oncogene induced cellular senescence. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* **9**, 3376–3382 (2010).
135. Danovi, D., Meulmeester, E., Pasini, D. *u. a.* Amplification of Mdmx (or Mdm4) directly contributes to tumor formation by inhibiting p53 tumor suppressor activity. *Molecular and Cellular Biology* **24**, 5835–5843 (2004).
136. Riemenschneider, M., Büschges, R., Wolter, M. *u. a.* Amplification and Overexpression of the MDM4 (MDMX) Gene from 1q32 in a Subset of Malignant Gliomas without TP53 Mutation or MDM2 Amplification. *Cancer research* **59**, 6091–6096 (1999).
137. Esteller, M., Garcia, A., Martinez-Palones, J. *u. a.* Susceptibility to endometrial cancer: influence of allelism at p53, glutathione S-transferase (GSTMI and GSTTI) and cytochrome P-450 (CYPIA1) loci. *British Journal of Cancer* **75**, 1385–1388 (1997).
138. Peller, S., Halperin, R., Schneider, D. *u. a.* Polymorphisms of the p53 gene in women with ovarian or endometrial carcinoma. *Oncology Reports* **6**, 193–197 (1999).

139. Agorastos, T., Masouridou, S., Lambropoulos, A. F. *u. a.* P53 codon 72 polymorphism and correlation with ovarian and endometrial cancer in Greek women. *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)* **13**, 277–280 (2004).
140. Niwa, Y., Hirose, K., Matsuo, K. *u. a.* Association of p73 G4C14-to-A4T14 polymorphism at exon 2 and p53 Arg72Pro polymorphism with the risk of endometrial cancer in Japanese subjects. *Cancer letters* **219**, 183–190 (2005).
141. Ueda, M., Terai, Y., Kanda, K. *u. a.* Germline polymorphism of p53 codon 72 in gynecological cancer. *Gynecologic Oncology* **100**, 173–178 (2006).
142. Zubor, P., Stanclova, A., Kajo, K. *u. a.* The p53 Codon 72 Exon 4 BstUI Polymorphism and Endometrial Cancer in Caucasian Women. *Oncology* **76**, 173–183 (2009).
143. Ghasemi, N., Karimi-Zarchi, M., Mortazavi-Zadeh, M. R. *u. a.* Evaluation of the frequency of TP53 gene codon 72 polymorphisms in Iranian patients with endometrial cancer. *Cancer genetics and cytogenetics* **196**, 167–170 (2010).
144. Tang, W., He, X., Chan, Y. *u. a.* Lack of association between p53 codon 72 polymorphism and endometrial cancer: a meta-analysis. *Cancer Epidemiology* **36**, e153–7 (2012).
145. Knappskog, S., Trovik, J., Marcickiewicz, J. *u. a.* SNP285C modulates oestrogen receptor/Sp1 binding to the MDM2 promoter and reduces the risk of endometrial but not prostatic cancer. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* **48**, 1988–1996 (2012).
146. Wang, L.-H., Wang, X., Xu, W.-T. *u. a.* MDM2 rs2279744 polymorphism and endometrial cancer: a meta-analysis. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* **35**, 3167–3170 (2014).

## 7. Thesen

1. Die vorliegende Arbeit untersuchte den Einfluss der Einzelnukleotidpolymorphismen p53 Codon 72 SNP, MDM2 SNP 309, MDM4 SNP 31826 und 34091 auf das Erkrankungsrisiko, -alter und Überleben von 170 Endometriumkarzinompatientinnen (157 Typ-I, 13 Typ-II).
2. Die MDM4-Polymorphismen 31826 und 34091 lagen in einem Kopplungsgleichgewicht vor und ihre Effekte ergänzten sich.
3. Das Vorliegen der homozygoten Minor-Allele der beiden MDM4-Polymorphismen 31826 (T/T) und 34091 (C/C) konnte mit einem späteren Diagnosealter und einer verkürzten Überlebenszeit, insbesondere östrogenrezeptornegativen Karzinomen, korreliert werden.
4. Die homozygote Prolin-Variante des p53 Codon 72 Polymorphismus zeigte einen tendenziell lebensverlängernden Effekt auf die Studienpopulation, unabhängig vom Allelstatus der beiden MDM4-Polymorphismen.
5. Das Erkrankungsalter und Überleben des Studienkollektivs war unabhängig vom Allelstatus des MDM2 SNP 309.
6. Alle 4 untersuchten Polymorphismen hatten keinen relevanten Einfluss auf das Erkrankungsrisiko der untersuchten Population.
7. Eine Aussage über die Effekte der vier Polymorphismen auf das Typ-II-Endometriumkarzinom konnte aufgrund der geringen Fallzahl nicht getroffen werden.

## A. Anhang

	Endometrioid	Serous	Carcinosarcoma	Clear cell
Bokhman subtype	I	II	II	II
TP53 mutation	Rare	>90%	60-90%	35%
PI3K alterations	PTEN mutation (75-85%) PIK3CA mutation (50-60%) PIK3R1 mutation (40-50%)	PTEN mutation (11%) PIK3CA amplification (45%) PIK3CA mutation (35%) PIK3R1 mutation (12%)	PTEN mutation (19%) PIK3CA mutation (35%) PIK3CA amplification (14%)	PTEN loss (80%) PIK3CA mutation (18%)
KRAS mutation	20-30%	3%	17%	0%
ERBB alterations	None	ERBB2 amplification (25-30%)	ERBB2 amplification (13-20%) ERBB3 amplification or mutation (13%)	ERBB2 mutation (12%) ERBB2 amplification (16%)
FGFR amplification or mutation	FGFR2 mutation (12%)	FGFR2 mutation (5%) Frequent FGFR1 and FGFR3 amplification	FGFR3 amplification (20%)	..
Wnt/ $\beta$ -catenin	CTNNB1 mutation (25%)	CTNNB1 mutation (3%)	..	..
Other	ARID1A mutation (35-40%)	PPP2R1A mutation (20%) FBXW7 mutation (20% of undifferentiated endometrial carcinoma) LRP1B deletion Frequent amplifications in MYC, CCNE1, and SOX17	PPP2R1A mutation (28%) FBXW7 mutation (35-40%) ARID1A mutation (25%) CCNE1 amplification (42%) SOX17 amplification (25%)	ARID1A (25%) TERT promoter mutations

Abbildung A.1.: Mutationsprofile des EC [entnommen aus 17]

	POLE ultramutated	MSI hypermutated	Copy-number low, MSS	Copy-number high, serous-like
Mutation load				
Somatic copy number alterations load				
Histology	Endometrioid	Endometrioid	Endometrioid	Serous and endometrioid
Grade				
PI3K alterations				
KRAS mutation				
TP53 mutation	35%	5%	1%	>90%
Prognosis	Excellent	Intermediate	Intermediate	Poor

Abbildung A.2.: Molekulargenetische Klassifikation des EC [entnommen aus 17]

**Tabelle A.1.:** Stadieneinteilung des EC nach TNM und FIGO [entnommen aus 25]

TNM-Kategorien	FIGO-Stadien	Definitionen
TX	-	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	-	Kein Anhalt für Primärtumor
T1	I	Tumor begrenzt auf Corpus uteri
T1a	IA	Tumor begrenzt auf Endometrium
T1b	IB	Tumor begrenzt auf Endometrium oder infiltriert < 50% des Myometriums
T1c	IC	Tumor infiltriert $\geq$ 50% des Myometriums
T2	II	Tumor infiltriert Zervix, breitet sich jedoch nicht jenseits des Uterus aus
T3	III	Tumor breitet sich lokal oder regional aus
T3a	IIIA	Tumor befällt Serosa und/oder Adnexe
T3b	IIIB	Tumor befällt Vagina oder Parametrien
N1	IIIC	Metastasen in Becken- und/oder paraaortalen Lymphknoten
	IIIC1	Metastasen in Beckenlymphknoten
	IIIC2	Metastasen in paraaortalen Lymphknoten
T4	IV	Tumor infiltriert Harnblase und/oder Darmschleimhaut oder Fernmetastasierung
	IVA	Tumor infiltriert Harnblase und/oder Rektumschleimhaut
M1	IVB	Fernmetastasierung (ausgenommen Metastasen in Vagina, Beckenserosa oder Adnexen, einschließlich Metastasen in inguinalen und anderen intraabdominalen Lymphknoten als paraaortalen und/oder Beckenlymphknoten)

**Tabelle A.2.:** SNP - Allelfrequenzen in Kontroll- und europäischer Population [entnommen aus ncbi - SNP - Datenbank]

	Allelfrequenzen in %		
	A/A	A/C	C/C
<b>ESR1 SNP rs9479130</b>			
Kontrollpopulation	23,6	51,7	24,7
Europäische Population	33,9	51,8	14,3
<b>MDM2 SNP 309</b>	<b>T/T</b>	<b>T/G</b>	<b>G/G</b>
Kontrollpopulation	49,0	40,8	10,2
Europäische Population			
<b>MDM4 SNP 31826</b>	<b>C/C</b>	<b>C/T</b>	<b>T/T</b>
Kontrollpopulation	47,6	41,7	10,7
Europäische Population	43,4	43,4	13,3
<b>MDM4 SNP 34091</b>	<b>A/A</b>	<b>A/C</b>	<b>C/C</b>
Kontrollpopulation	57,7	36,3	6,0
Europäische Population	48,7	41,6	9,7
<b>p53 Codon72 SNP</b>	<b>Arg/Arg</b>	<b>Arg/Pro</b>	<b>Pro/Pro</b>
Kontrollpopulation	61,0	36,4	2,6
Europäische Population	61,7	30,0	8,3

## Eidesstattliche Erklärung

Ich, Frederike Keller, versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Thema

*Bedeutung von ausgewählten Polymorphismen auf das  
Endometriumkarzinom*

, ohne unzulässige Hilfe Dritter, selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe, wobei ich alle wörtlichen und sinn-gemäßen Zitate als solche gekennzeichnet habe. Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung dieser Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Ich erkläre weiterhin, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

Ich erkläre abschließend, dass ich mich auch an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

Halle, den 20. September 2017

---

FREDERIKE KELLER

## Danksagung

Mein Dank gilt Herrn PD Dr. Frank Bartel für die Überlassung des Themas, für die geduldige Betreuung und die gute Zusammenarbeit sowie allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Pathologie.

Für die Unterstützung bei der Durchführung der Versuche und die vielen Hilfestellungen möchte ich mich insbesondere bei Frau Dr.rer.nat. Anja Wolf, Frau Stefanie Hammer, Frau Dr.rer.nat. Anja Haak Frau Sandra Ehrhardt bedanken. Ein großer Dank gilt in diesem Zusammenhang außerdem Herrn Dr.rer.nat. Jens Wulfänger (Institut für Physiologische Chemie der medizinischen Fakultät Halle) und dem Institut für Immunologie, mit deren Technik und Expertise die Etablierung der HRM - Analyse ermöglicht wurde. Einen weiteren Dank möchte ich dem „Zentrum für medizinische Grundlagenforschung“ insbesondere Frau Dr.rer.nat. Dorothea Darmer für die zuverlässige Sequenzierung der Proben aussprechen.

Zu guter Letzt möchte ich meinem Freund, meiner Familie und meinen Freunden einen besonderen Dank für die langjährige sowohl finanzielle als auch emotionale Unterstützung aussprechen, die den Weg für die unbeschwerte Fertigstellung des Studiums und dieser Arbeit ebnete.