

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

(Direktorin: Prof. Dr. med. C. Wickenhauser)

**Der Einfluss von Einzelnukleotid-Polymorphismen in *TP53*,
MDM2, *MDMX* und *LGR6* auf die Entstehung und die
klinische Ausprägung des Mammakarzinoms der Frau**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (*Dr. med.*)

vorgelegt

der medizinischen Fakultät

der Martin- Luther- Universität Halle- Wittenberg

von Marcus Bauer

geboren am 13.10.1989 in Zwickau/Sachsen

Betreuer: PD Dr. rer. nat. Frank Bartel

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Christoph Thomssen

2. Prof. Dr. rer. nat. Klaus Römer, Bad Homburg

20.09.2016

10.01.2018

Referat

Brustkrebs ist die Krebserkrankung mit der höchsten Inzidenz bei der Frau und ist trotz stetig verbesserter Therapien auch heute noch die häufigste Krebstodesursache. Als prädisponierende Faktoren sind neben dem Lebensstil Veränderungen des Erbguts zu nennen, oft finden sich Mutationen in den Genen des p53-Pathway. Auch Einzelnukleotid-Polymorphismen, mit der Keimbahn vererbte genetische Varianten, die definitionsgemäß bei über einem Prozent der Bevölkerung auftreten, haben einen Einfluss auf die Entstehung und die Prognose von Mammakarzinomen. Ziel dieser Arbeit war es, an einem großen Tumorprobenkollektiv von 815 Patientinnen mit einem Mammakarzinom die Frequenz von Polymorphismen in *TP53*, dessen negativen Regulatoren *MDM2* und *MDMX* einschließlich des SNP *LGR6* rs6678914 zu analysieren und anschließend diese Ergebnisse mit dem pathologischen Befund, dem Rezeptorstatus, sowie dem klinischen Verlauf der individuellen Patientinnen zu korrelieren. Die molekularpathologischen Untersuchungen wurden mit der Sequenzierungsmethode nach Sanger und der Realtime-PCR durchgeführt, mit Hilfe dieser Methoden wurden die Polymorphismen *TP53* Codon 72, *MDM2* SNP 309 und 285, *LGR6* rs6678914 sowie *MDMX* SNP 31826 und 34091 untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Arginin-Variante in *TP53* Codon 72 signifikant mit einem positiven Östrogenrezeptorstatus und einem besseren Grading assoziiert ist. Patientinnen mit der Prolin-Variante erkrankten durchschnittlich in einem jüngeren Lebensalter. Patientinnen mit dem Polymorphismus *MDM2* SNP 309 und einem negativen Östrogenrezeptorstatus erkrankten im Mittel 5,2 Jahre früher. Frauen mit dem Genotyp C/C in *MDM2* SNP 285 erkrankten mit durchschnittlich 44,3 Jahren signifikant früher im Vergleich zu den Genotypen G/G und G/C. Die Variante A/A in *MDMX* SNP 31826 war mit einer fortgeschrittenen Lymphgefäßinfiltration zum Diagnosezeitpunkt und - in Abhängigkeit des Östrogenrezeptorstatus - mit einem früheren Erkrankungsalter assoziiert. Patientinnen unter 40 Jahren mit dem C-Allel in *MDMX* SNP 34091 hatten signifikant öfter östrogenrezeptornegative Mammakarzinome, des Weiteren hatten diese Patientinnen häufiger Luminal-A-Mammakarzinome. Der 2013 als Risikofaktor identifizierte Polymorphismus *LGR6* rs6678914 war signifikant mit einer fortgeschrittenen lymphnodalen Metastasierung und einem späteren Erkrankungsalter assoziiert. Wir zeigten erstmals Zusammenhänge zwischen den SNPs *MDMX* SNP 34091 sowie *LGR6* rs6678914 und der Entstehung sowie der klinischen Ausprägung von Mammakarzinomen.

Bauer, Marcus: Der Einfluss von Einzelnukleotid-Polymorphismen in *TP53*, *MDM2*, *MDMX* und *LGR6* auf die Entstehung und die klinische Ausprägung des Mammakarzinoms der Frau. Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2016

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Das Mammakarzinom	1
1.1.1 Ätiologie des Mammakarzinoms	2
1.1.2 Histologie des Mammakarzinoms	2
1.1.3 Klinik und Verlauf des Mammakarzinoms	3
1.1.4 Prognose des Mammakarzinoms	4
1.1.5 Therapie	6
1.2 Der p53-Pathway	7
1.2.1 Wirkungsweise von p53	8
1.2.2 Regulation und Kontrolle von p53	9
1.2.3 Regulation und Kontrolle von Mdm2 und Mdmx	10
1.3 Einzelnukleotid-Polymorphismen	11
1.3.1 <i>TP53</i> Codon 72 SNP (rs1042522)	12
1.3.2 <i>MDM2</i> SNP 309 (rs2279744)	13
1.3.3 <i>MDM2</i> SNP 285 (rs117039649)	14
1.3.4 <i>MDMX</i> SNP 31826 (rs1563828)	14
1.3.5 <i>MDMX</i> SNP 34091 (rs4245739)	15
1.3.6 <i>LGR6</i> rs6678914	15
2. Zielstellung	17
3. Material und Methodik	18
3.1 Gewebematerial	18
3.2 Primer und Oligonukleotide	19
3.3 Taqman Assays	20
3.4 Enzyme	20
3.5 Kits	20
3.6 Chemikalien	20
3.7 Geräte und Verbrauchsmaterialien	21
3.8 Puffer und Lösungen	22
3.9 DNA-Isolation mit Qiagen DNA Mini Kit	23
3.10 DNA-Konzentrationsmessung	24
3.11 Genotypisierung mittels Sequenzierungsreaktion	24
3.11.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)	24
3.11.2 Agarose-Gelelektrophorese	25
3.11.3 DNA-Isolation mit QIAquick Gel Extraction Kit aus Agarosegel	25
3.11.4 Sequenzierungsreaktion	26
3.11.5 Fällung der Sequenzierungsprodukte aus dem BigDye Terminator Kit	27

3.11.6 Vorbereitung der Analyse-----	27
3.12 Genotypisierung mittels Real-Time PCR-----	28
3.13 Statistische Auswertung-----	29
4. Ergebnisse-----	30
4.1. <i>TP53</i> Codon 72 SNP (rs1042522)-----	30
4.1.1 Häufigkeiten der Allele-----	30
4.1.2 Assoziation mit dem Alter-----	30
4.1.3 Assoziation mit dem Tumorstadium-----	31
4.1.4 Assoziation mit der histologischen Differenzierung und dem Grading-----	31
4.1.5 Assoziation mit den Hormonrezeptoren-----	32
4.1.6 Assoziation mit den intrinsischen Subtypen des Mammakarzinoms-----	33
4.2 <i>MDM2</i> SNP 309 (rs2279744)-----	35
4.2.1 Häufigkeit der Allele-----	35
4.2.2 Assoziationen mit dem Alter-----	36
4.2.3 Assoziationen mit dem Tumorstadium-----	36
4.2.4 Assoziationen mit der histologischen Differenzierung und dem Grading-----	36
4.2.5 Assoziationen mit dem Hormonrezeptorstatus-----	37
4.2.6 Assoziation mit den intrinsischen Subtypen-----	38
4.3 <i>MDM2</i> SNP 285 (rs117039649)-----	40
4.3.1 Häufigkeit der Allele-----	40
4.3.2 Assoziation mit dem Alter-----	40
4.3.3 Wechselwirkungen zwischen <i>MDM2</i> SNP 285 und 309 und dem Erkrankungsalter -----	40
4.3.4 Assoziation mit dem Tumorstadium-----	42
4.3.5 Assoziation mit der histologischen Differenzierung und dem Grading-----	42
4.4 <i>MDMX</i> SNP 31826 (rs1563828)-----	44
4.4.1 Häufigkeiten der Allele-----	44
4.4.2 Assoziation mit dem Alter-----	44
4.4.3 Assoziation mit dem Tumorstadium-----	46
4.4.4 Assoziation mit der histologischen Differenzierung und dem Grading-----	46
4.4.5 Zusammenhang mit den intrinsischen Subtypen-----	47
4.5 <i>MDMX</i> SNP 34091 (rs4245739)-----	48
4.5.1 Häufigkeit der Allele-----	48
4.5.2 Assoziation mit dem Alter-----	49
4.5.3 Assoziation mit dem Tumorstadium-----	51
4.5.4 Assoziation mit der histologischen Differenzierung und dem Grading-----	52
4.5.5 Assoziation mit dem Hormonrezeptorstatus-----	52

4.5.6 Zusammenhang mit den intrinsischen Subtypen -----	54
4.6 LGR6 rs6678914 -----	57
4.6.1 Häufigkeit der Allele -----	57
4.6.2 Assoziation mit dem Alter -----	57
4.6.3 Assoziation mit dem Tumorstadium -----	58
4.6.4 Assoziation mit der histologischen Differenzierung und dem Grading -----	59
4.6.5 Assoziation mit dem Hormonrezeptorstatus -----	59
4.6.6 Zusammenhang mit den intrinsischen Subtypen -----	60
5. Diskussion -----	61
5.1 Die genetischen Ursachen des Mammakarzinoms -----	61
5.2 TP53 Codon 72 -----	62
5.3 Einzelnukleotid-Polymorphismen in MDM2 -----	64
5.4 Einzelnukleotid-Polymorphismen in MDMX -----	65
5.5 LGR6 rs667891 -----	69
5.6 Methodenkritik -----	70
6. Zusammenfassung und Ausblick -----	71
7. Literaturverzeichnis -----	73
8. Thesen -----	80
9. Lebenslauf -----	

Abkürzungen und Symbole

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
bzw.	Beziehungsweise
C	Cytosin
CDK	Cyclin-depent Kinase
DNA	desoxyribonuclein acid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER-Status	Östrogenrezeptorstatus
et al.	et altera
g	Gramm
G	Guanin
G1	Grading: gut differenziert
G2	Grading: mäßig differenziert
G3	Grading: schlecht differenziert
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
HR-Status	Hormonrezeptorstatus
KI	Konfidenzintervall
Ki67	Antigen der Zelle in der Interphase, Zellteilungsmarker
L	Liter
L0	keine Lymphgefäßinvasion
L1	Lymphgefäßinvasion
M0/1	M-Stadium (TNM), Fernmetastasen
<i>MDM2</i>	murine double minute gene 2
mRNA	messenger RNA
miRNA	mikro-RNA
µl	Mikroliter

N0-3	N-Stadium (TNM), Lymphknotenmetastasen
OR	Odds ratio
p	p-value/-Wert (Signifikanzwert)
PBS	Phosphat- gepufferte Kochsalzlösung
PCR	polymerase chain reaction/ Polymerasekettenreaktion
PR-Status	Progesteronrezeptor-Status
rpm	revolutions per minute
RNA	ribonuclein acid/ Ribonucleinsäure
SNP	Single nucleotide polymorphism
T	Thymin
T1-4	T-Stadium (TNM), Größe Primärtumor
Tab.	Tabelle
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
UTR	untranslated region/ nicht-translatierter Bereich
V0	keine Veneninvasion
V1	Veneninvasion
WHO	world health organization/ Weltgesundheitsorganisation

1. Einleitung

1.1 Das Mammakarzinom

Das Mammakarzinom der Frau ist auf Grund seiner hohen Prävalenz in der Bevölkerung und weiterhin steigender Inzidenz eine der größten onkologischen Herausforderungen der Medizin. Durch seine starke Assoziation mit dem Lebensstil westlicher Länder, sind die Inzidenzraten in den Industrieländern am höchsten (Tavassoli und Devilee, 2003). Mit einem Anteil von 28% an allen Krebserkrankungen stellt das Mammakarzinom die häufigste Krebsentität der Frau in Deutschland dar, etwa jede zehnte Frau in Deutschland ist in Ihrem Leben davon betroffen. Im Jahr 2004 erkrankten in der Bundesrepublik etwa 57.000 Frauen, im Mittel lag das Erkrankungsalter bei 63 Jahren (Bertz et al., 2010). Neben einer gestiegenen Inzidenz von Mammakarzinomen zeigt sich jedoch auch eine Verbesserung der 5-Jahres-Überlebensraten. In den 1980er Jahren lebten noch 69% der Patientinnen nach fünf Jahren (Bertz et al., 2010), in einer prospektiven Studie, welche von 2003 bis 2010 durchgeführt wurde, lebten fünf Jahre nach Diagnose noch 86,3% der Patienten, 79,8% von Ihnen waren krankheitsfrei (Heil et al., 2012). Männer entwickeln vergleichsweise selten ein Mammakarzinom, die Inzidenz in Deutschland liegt bei 400-500 Neuerkrankungen pro Jahr (Untch et al., 2011). Das Mammakarzinom des Mannes gilt als prognostisch ungünstig (Blümcke et al., 1995).

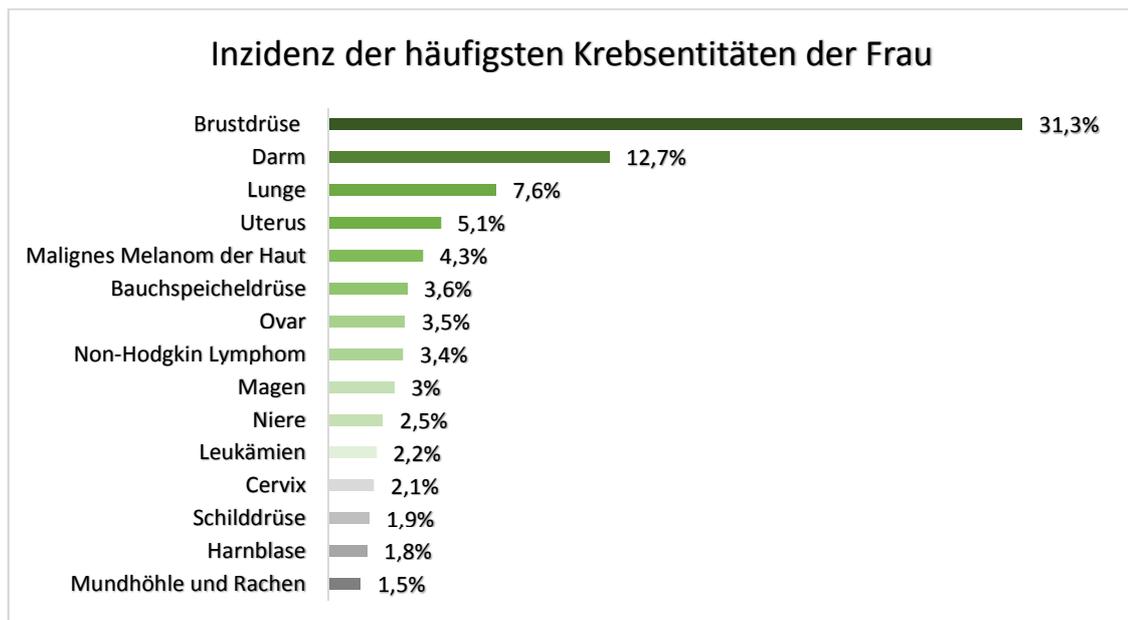


Abb. 1 Prozentualer Anteil der häufigsten malignen Erkrankungen der Frau in Deutschland (modifiziert nach Robert-Koch-Institut, 2010)

1.1.1 Ätiologie des Mammakarzinoms

Das invasive Mammakarzinom, eine maligne epitheliale Neoplasie der terminalen duktulo-lobulären Einheit, entwickelt sich zumeist auf dem Boden intraepithelialer Vorstufen, genannt Carcinoma in situ (Klöppel et al., 2013a). Für das Risiko der Entwicklung eines Mammakarzinoms spielen insbesondere hormonelle Einflüsse eine entscheidende Rolle. Hierzu gehören eine frühe Menarche, eine späte Menopause, Nullipara oder Geburt des ersten Kindes nach dem 35. Lebensjahr sowie erhöhte Östrogenspiegel (Böcker et al., 2012, Klöppel et al., 2013b). Mehrere Geburten und Stillzeiten sollen hingegen einen protektiven Einfluss haben. Als weitere, beeinflussbare Risikofaktoren sind eine Hormonsubstitution in der Menopause und postmenopausal, Übergewicht und Bewegungsmangel in der Menopause, sowie Alkohol- und Nikotinabusus zu nennen (Bertz et al., 2010). Darüber hinaus sind hereditäre Einflüsse, nicht zuletzt bei einer positiven Familienanamnese, von großer Bedeutung. Prominente Beispiele für hereditäre Faktoren mit hoher Penetranz sind Keimbahnmutationen im *BRCA1*- und *2*-Gen (Breast Cancer 1 und 2), welche neben einer erhöhten Rate an Brustkrebs auch mit ovariellen Tumoren assoziiert sind (Scalia-Wilbur et al., 2016; Vasema et al., 2015). Auch das Li-Fraumeni-Syndrom, Folge einer *TP53*-Keimbahnmutation (Scalia-Wilbur et al., 2016), sowie eine Amplifikation des HER2-Rezeptors (Böcker et al., 2012) sind in diesem Zusammenhang zu nennen. Frauen, welche eine Mutation in den Genen *BRCA1* und *BRCA2* aufweisen, haben ein Erkrankungsrisiko von 50-85%, und somit ein bis zu 8-fach erhöhtes Risiko der Entwicklung eines Mammakarzinoms im Vergleich zur Normalbevölkerung. Die Erkrankung manifestiert sich bei diesen Patienten zumeist bereits vor Erreichen der Menopause (Matthies et al., 2004). In den letzten Jahren wurden eine Reihe weiterer Mutationen entdeckt, die ebenfalls zu einer Erhöhung des Brustkrebsrisikos führen. Hierzu zählen *CHEK2*, *PALB2*, *ATM* oder *BRIP1* (Scalia-Wilbur et al., 2016; Vasema et al., 2015). Außerdem sind Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) wie in Codon 72 von *TP53* mit einem erhöhten Risiko und früherem Erkrankungsalter assoziiert (Al-Quasem et al., 2011).

1.1.2 Histologie des Mammakarzinoms

Mammakarzinome entsprechen klonalen epithelialen Neoplasien, die sich aus der terminalen duktulo-lobulären Einheit (TDLE) des Brustdrüsenkörpers entwickeln und die überwiegend unter dem Bild eines Adenokarzinoms auftreten (Tavassoli und Devilee, 2003). Eine ältere Klassifikation der Mammakarzinome unterscheidet invasiv duktales und invasiv lobuläres

Einleitung

Mammakarzinome. In der neuen WHO-Klassifikation (2014) entfiel der Terminus „duktal“. Die häufigste Subgruppe sind die invasiven Mammakarzinome „no special type“ (NST), welche 50-80% aller Erkrankungen umfassen. Daneben existieren Karzinome mit tubulärer, kribriformer, medullärer, muszinöser oder mikropapillärer Differenzierung (Lebeau et al., 2014). Das invasive lobuläre Mammakarzinom zeigt ein typisches, dissoziiertes Wachstumsmuster, welches durch die fehlende Expression des Adhäsionsmoleküls E-Cadherin bedingt ist (Böcker et al., 2012). Von den invasiven, metastasierungsfähigen Karzinomen abzugrenzen sind die nicht invasiven Carcinoma in situ, die durch klonale Proliferation atypischer Epithelzellen innerhalb eines Drüsenlumens ohne Überschreiten der Basalmembran charakterisiert sind. Hier unterscheidet man zwischen lobulär und duktal differenzierten Varianten. Das duktales Carcinoma in situ ist mit 70-80% häufiger (Malhotra et al., 2010), nach histologischer Sicherung schreiten ohne Therapie 50% dieser Läsionen binnen zehn Jahren in ein invasives Mammakarzinom voran (Blümcke et al., 1995).

1.1.3 Klinik und Verlauf des Mammakarzinoms

Mammakarzinome verlaufen meistens symptomarm, zudem unterscheiden sich die ersten Symptome kaum von benignen Erkrankungen der Brust (Tavassoli und Devilee, 2003). Lediglich in 5-10% der Fälle werden Schmerzen angegeben. Mamilläre Absonderungen sind unspezifische, jedoch abklärungsbedürftige Befunde, besonders bei Einseitigkeit oder blutiger Sekretion. Inspektorisch können ein asymmetrisches Verhalten der Brüste bei Bewegungen der oberen Extremitäten, umschriebene Einziehungen der Haut, perimamilläre Ekzeme oder Ulzerationen bis hin zu Größenunterschieden der Brüste auffallen. Besonders in Kombination mit tastbaren Knoten im Bereich der Brust oder axillären Lymphknoten, sowie wenig verschiebbliche oder schwer abgrenzbare Verhärtungen, sind hoch suspekt. Die Abklärung uneindeutiger Befunde sollte über einen Spezialisten erfolgen. Dazu ist der Einsatz von Sonografie, Magnetresonanztomografie oder Mammografie möglich. Die Mammografie hat sich als wesentliche diagnostische Methode durchgesetzt. Zur definitiven Sicherung, oder dem Ausschluss eines behandlungswürdigen Befundes, sollte eine gezielte Gewebeentnahme zur histologischen Untersuchung erfolgen (Matthiesen et al., 2004). Mammakarzinome entwickeln sich in 50% der Fälle im äußeren, oberen Quadranten der Brust, da sich in diesem Bereich ein Großteil des Brustdrüsengewebes befindet (Böcker et al., 2012). Mammakarzinome können synchron entstehen, bei multizentrischen Befunden sollte die Möglichkeit einer bereits erfolgten Metastasierung innerhalb der Brust in Erwägung gezogen werden. Unbehandelt

Einleitung

breiten sich Mammakarzinome kontinuierlich innerhalb des Brustdrüsengewebes aus. Die Infiltration des Gewebes erfolgt kanalikulär oder über die Lymphgefäße bis in die Haut und die Thoraxwand (Blümcke et al., 1995). Die Metastasierung erfolgt sowohl lymphogen als auch hämatogen. Zunächst sind meist die axillären Lymphknoten entlang der *Vena axillares* betroffen (Böcker et al, 2012). Die Lymphdrainage der Brüste erfolgt jedoch auch über retrosternale und supraklavikuläre Lymphknoten (Matthiesen et al., 2005). Als Sentinellymphknoten bezeichnet man in diesen Zusammenhang den ersten, im Lymphabfluss dem Karzinom nachgeschalteten, Lymphknoten. Hämatogene Absiedlungen findet man häufig in Knochen, Lunge und Leber (Böcker et al., 2012.). Oft werden diese in den ersten Jahren nach Diagnose auffällig, Spätmetastasierungen sind möglich. Nach klinischer Manifestation von Fernmetastasen überleben 50% der Patientinnen noch 2 Jahre (Matthiesen et al., 2004). Rezidive der Erkrankungen treten meist 3 Jahre nach Erstdiagnose auf (Blümcke et a, 1995).

1.1.4 Prognose des Mammakarzinoms

Die 5-Jahres Überlebensrate bei Mammakarzinomen wird wesentlich durch das TNM-Stadium bestimmt (Blümcke et al., 1995). Dieses System zur Einteilung maligner Tumoren wurde 1943 bis 1952 durch P. Denoix (Frankreich) entwickelt. Die Einteilung erfolgt anhand klinischer und histopathologischer Kriterien zur anatomischen Ausbreitung der Erkrankung (Wittekind und Meyer, 2010). Primärtumoren mit einer Größe zwischen 6-10 Millimeter im größten Durchmesser haben in 10-25% der Fälle bereits in die axillären Lymphknoten metastasiert. Je größer der Primärtumor ist, desto höher ist das Risiko der bereits erfolgten Dissemination und Metastasierung (Matthiesen et al., 2005).

Darüber hinaus wird das biologische Verhalten der Karzinome maßgeblich durch den histologischen Typ und den Grad der zellulären Differenzierung (Grading) beeinflusst. Lobulär invasive Mammakarzinomen, welche häufig einen multizentrischen Befall der Brust aufweisen (Matthiesen et al., 2004), gehen mit 10-Jahres-Überlebensraten über alle Stadien von 35% einher. Im Vergleich dazu beträgt das 10-Jahres-Überleben bei duktal invasiven Mammakarzinomen mit einer tubulären Differenzierung über 90% (Böcker et al., 2012). Neben dem invasiv tubulären Mammakarzinom stellt insbesondere das invasive kribriforme Mammakarzinom einen histologischen Typ dar, welcher mit einer günstigen Prognose assoziiert ist (Lebeau et al, 2014). In der aktuellen WHO Klassifikation haben neben diesen etablierten Prognosefaktoren zusätzliche molekulare Charakteristika Eingang gefunden und es erfolgt nun die Einteilung die Einteilung der Mammakarzinome zusätzlich in molekulare

Einleitung

Subgruppen (Lakhani et al., 2012). Fünf Gruppen können über die Parameter Hormonrezeptorstatus, Grading, Wachstumsrate (Ki-67), HER2-Status sowie dem Mutationsstatus der Gene *BRCA1* und *2* definiert werden. Die Bestimmung der einzelnen Parameter, ausgenommen des *BRCA1*- und *2*-Mutationsstatus, kann mittels immunhistochemischer Verfahren durchgeführt werden. Entscheidend ist dabei, dass die unterschiedlichen Phänotypen der Karzinome auch prognoserelevant sind (Untch et al., 2011). Patientinnen mit Tumoren, welche als Luminal-A zu klassifizieren sind, haben ein bei Weitem günstigeres Outcome als Patienten aus den anderen Subgruppen. Das Gesamtüberleben der Patienten ist deutlich besser (Naume und Sørliera, 2005). Patientinnen mit einem Luminal-A-Mammakarzinom erhalten seltener eine Chemotherapie. Da es sich bei diesen Karzinomen um klassische endokrinsensitive Tumoren handelt, ist der Einsatz antihormoneller Substanzen zu empfehlen. Luminal-B- und Basal-like-Mammakarzinome sollten auf Grund des höheren Risikos chemotherapiert werden (Untch et al., 2011). Gleichzeitig zeigen diese beiden Subtypen ein besseres Ansprechen auf eine Chemotherapie (Sørliera et al., 2011).

Tab. 1 Die molekularen Subtypen des Mammakarzinoms (modifiziert, Naume und Sørliera, 2005 und Goldhirsch et al., 2013)

Subtypbezeichnung	Hormonrezeptorstatus	Grading	Ki-67	HER2-Status
Luminal-A	ER+/PR+	G1, G2	< 20%	HER2 -
Luminal-B	ER+/PR-	G3 (G2)	> 20%	HER2 -
HER2 +	ER-/PR- oder ER+/PR+	G3 (G1, G2)		HER2 +
Basal-like <i>BRCA 1/2</i> negativ	ER-/PR-	G3	50-60%	HER2 -
Basal-like <i>BRCA 1/2</i> positiv	ER-/PR-	G3	50-60%	HER2 -

Zur Optimierung der Prognose des Mammakarzinoms und Senkung der Sterblichkeit wird in der aktuellen S3-Leitlinie zur Behandlung von Brustkrebs eine verbesserte Früherkennung als aussichtsreichste Möglichkeit diskutiert. Ziel soll es sein, Mammakarzinome in frühen Stadien zu diagnostizieren. Damit wird die Hoffnung verbunden, 5-Jahres-Überlebensraten von über 90% zu erreichen. Gleichzeitig soll durch das Aufdecken von präinvasiven Befunden die Inzidenz des Mammakarzinoms gesenkt werden. Beginnend mit dem 30. Lebensjahr soll allen Frauen eine klinische Untersuchung der Brust, bestehend aus Inspektion und Palpation, angeboten werden. Bei auffälligen Befunden ist die Diagnostik mit bildgebenden Verfahren sowie einer histologischen Untersuchung zu komplementieren (Albert U.-S. et al., 2008,

Einleitung

Kreienberg et al., 2012). Wichtig in diesem Zusammenhang ist auch die Erhebung einer genauen Familienanamnese. Neben dem Einsatz der Sonografie und der Kontrastmittel-Magnetresonanztomografie hat sich die Mammografie als wirksame Methode zur Früherkennung von Mammakarzinomen bewährt. Frauen im Alter zwischen 50 und 70 Jahren haben, unter Berücksichtigung der Strahlenbelastung, den höchsten Nutzen von einer, im Rahmen eines Screenings durchgeführten, Mammografie (Nothacker et al., 2007).

1.1.5 Therapie

Grundsätzlich ist bei der Therapie des Mammakarzinoms zwischen einer lokalen Therapie der erkrankten Brust, sowie des Lymphabflussgebietes und einer systemischen Therapie zu unterscheiden. Die lokale Therapie des Mammakarzinoms erfolgt in der Regel durch eine brusterhaltenden Therapie mit einer vollständigen Resektion des Herdbefundes (R0-Resektion) sowie einer standardmäßigen postoperativen Strahlentherapie. Alternativ kann eine Mastektomie durchgeführt werden. Zusätzlich besteht die Indikation einer anschließenden Axilladisektion bei klinisch oder sonografisch auffälliger Axilla oder dem histologischen Nachweis von Tumorinfiltraten größer zwei Millimeter in mindestens zwei Lymphknoten (Makrometastasen). Der immunhistochemische Nachweis isolierter Tumorzellcluster stellt allein keine Indikation für eine komplette Axilladisektion dar. Bei Diagnose einer präinvasiven Vorläuferläsion des Mammakarzinoms, dem duktalem Carcinoma in situ (DCIS), sollte eine komplette Resektion (R0-Resektion) des Herdbefundes erfolgen, anschließend wird eine lokale Strahlentherapie zur Senkung des Rezidivrisikos empfohlen (Untch et al., 2011). Eine adjuvante systemische Chemotherapie ist bei Tumoren mit einer schlechten bzw. niedrigen histologischen Differenzierung (G3), einem Ki67-Wert >14%, einer geringen Hormonrezeptorexpression (<50%) oder einem positiven HER2-Status indiziert. Der Lymphknotenstatus ist aktuell der wichtigste, bekannte prognostische Faktor, ein positiver Nodalstatus allein führt jedoch nicht zwingend zur Indikation einer postoperativen Chemotherapie. Bei Tumoren mit HER2-Überexpression ist eine Chemotherapie in Kombination mit Trastuzumab zu empfehlen. Bei hormonsensitiven Mammakarzinomen mit positiven Hormonrezeptorstatus ist eine antihormonelle Therapie zu erwägen. Daneben gibt es die Möglichkeit der Durchführung einer neoadjuvanten Chemotherapie. Ziel dieser ist, die Rate brusterhaltender Therapien zu erhöhen. Zukünftig könnten die Ergebnisse von Genexpressionsanalysen ein wichtige Indikatoren für Therapieentscheidungen werden, nach

dem aktuellen Stand können jedoch noch keine generellen Empfehlungen gegeben werden (Untch et al., 2011).

1.2 Der p53-Pathway

P53 ist ein Tumorsuppressor, der die Zelle vor der Akkumulation von DNA-Schädigungen bewahren soll. Tumorsuppressoren sind Gene die Einfluss auf Zellzyklus, Apoptose und die genetische Stabilität nehmen. Ihre Inaktivierung führt häufig zur Entstehung von Karzinomen (Müller-Esterl et al., 2010a). Erstmals beschrieben wurde *TP53* 1979 (DeLeo et al., 1979; Levine und Oren, 2009), seine Funktion als Tumorsuppressor wurde jedoch erst 1989 erkannt (Levine und Oren, 2009). Zuvor wurde angenommen, dass *TP53* ein Onkogen sei (Soussi, 2010). Seit 1992 ist p53 auch bekannt als Wächter des Genoms (Lane, 1992). Die genetische Information von *TP53* ist auf Chromosom 17p13.1 codiert, das Transkript umfasst 2629 Basenpaare. Das daraus entstehende Protein ist aus 393 Aminosäuren aufgebaut (Bojesen und Nordestgaard, 2008), die Molekülmasse beträgt 53 000 Dalton (Levine und Oren, 2009).

Maligne Tumore des Menschen zeigen in bis zu 50% der Fälle Mutationen des *TP53*-Gens (Pei et al., 2012). In den meisten Fällen handelt es sich um Missense-Mutationen. Diese sind sehr oft in Exon 5 bis Exon 8 lokalisiert, diese Region codiert für die DNA-Bindungsdomäne (Petitjean et al., 2007; Siwal-Pandit et al., 2014). Keimbahnmutationen von *TP53* sind Ursache des autosomal-dominant erblichen Li-Fraumeni Syndroms. Die Betroffenen entwickeln gehäuft Weichteiltumoren, prämenopausale Mammakarzinome, maligne Lungen- und Hauttumoren, Pankreas- oder Nierenkarzinome, Leukämien oder eine Reihe unterschiedlicher Hirntumoren (Malkin, 2011). Unter physiologischen Bedingungen ist die Konzentration von p53 in humanen Zellen gering, seine Halbwertszeit beträgt circa 20 Minuten. Stresssignale, die auf eine Zelle einwirken, unter anderem im Rahmen von DNA-Schädigungen, Hypoxie oder Defekte des Mitosespindelapparats, führen zur Aktivierung von *TP53*. Mediert wird dies über eine Reihe von Proteinkinasen, Acetyltransferasen und Kofaktoren von Transkriptionsfaktoren (Jin und Levine, 2001; Römer et al., 2006). P53 kann daraufhin in zelluläre Prozesse eingreifen welche zum Zellzyklusarrest, einem verändertem Zellstoffwechsel oder schließlich zur Apoptose führen. Der Tumorsuppressor gibt der Zelle auf diesem Weg Zeit zur DNA-Reparatur, fehlerhafte DNA wird nicht repliziert und somit nicht an die Tochterzellen weitergegeben (Pei et al., 2012).

1.2.1 Wirkungsweise von p53

P53 ist ein transkriptioneller Regulator, es bindet unter anderem an den Promotor von p21, einem CDK-Inhibitor. P21 wird dadurch vermehrt transkribiert, in höheren Konzentrationen kann p21 den Cyclin-E-CDK2-Komplex hemmen, der Übergang des Zellzyklus aus der G1-Phase in die S-Phase wird so verhindert. Bei genügend hoher Konzentration von p21 in der Zelle, wird zusätzlich über den CyclinD-CDK4-Komplex das Voranschreiten in der späten G1-Phase gehemmt. Es konnte gezeigt werden, dass p21 die Syntheseleistung der DNA-Polymerase- δ über eine Bindungsstelle hemmen kann. Die DNA-Replikation in der S-Phase wird dadurch gebremst. Ist der zelluläre Schaden weitreichender, verfügt p53 über einen weiteren Ansatzpunkt zu verhindern, dass fehlerhafte DNA an die Tochterzellen weitergegeben wird. P53 kann die Zelle so in den programmierten Zelltod führen (Müller-Esterl et al., 2010a).

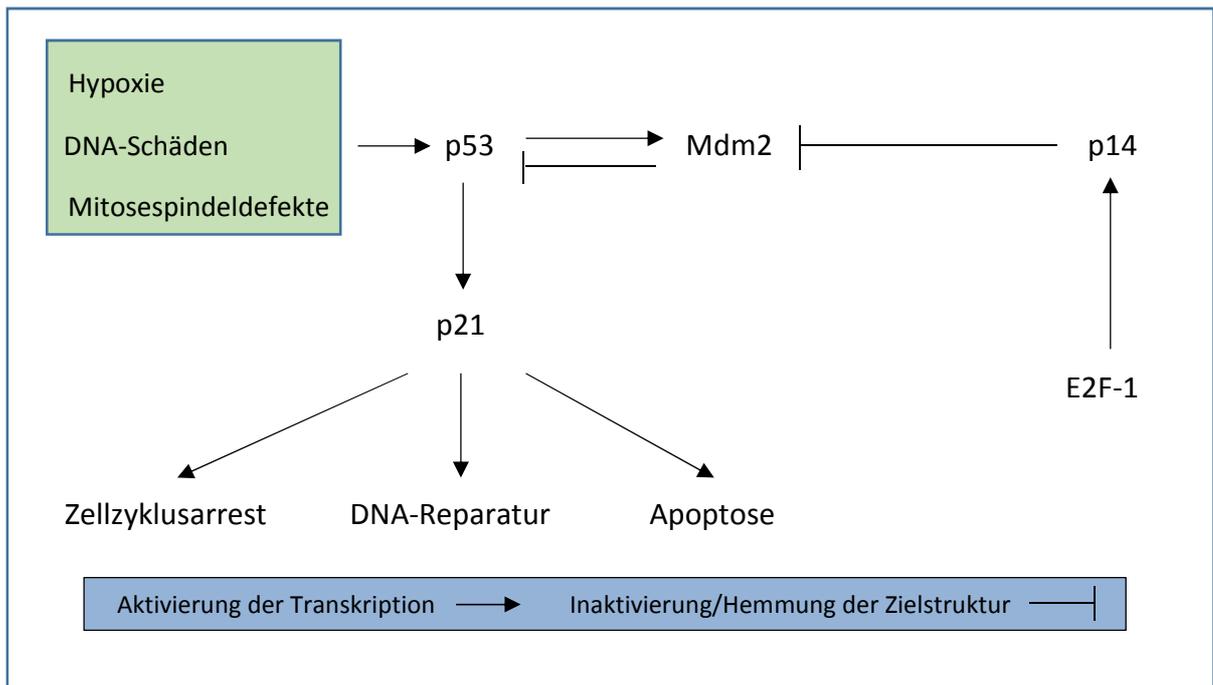


Abb. 2 Der funktionelle p53-Kreislauf (modifiziert, Jin und Levine 2011; Levine und Oren, 2009; Müller-Esterl et al., 2010a)

Bei irreparablen DNA-Schädigungen induziert p53 die Transkription des proapoptotischen *BAX*-Gens. Dieses Protein reguliert über einen homodimeren *BAX*-Kanal die Freisetzung von Cytochrom-C aus dem Intermembranraum des Mitochondriums in das Zytosol der Zelle. Daraufhin wird eine Kaskade von Cysteinyl-Aspartyl-Proteasen (Caspasen) aktiviert. Folge ist die gezielte Spaltung von Strukturproteinen der Zelle. Dazu zählen Lamin- und Aktinfilamenten

Einleitung

der Kernlamina oder des Zytoskeletts sowie die Fragmentation der DNA durch Caspase-aktivierte DNase (CAD). Die Zelle geht in Apoptose (Müller-Esterl et al., 2010a).

1.2.2 Regulation und Kontrolle von p53

Durch die zentrale Stellung im Zellzyklus wird p53 in Form funktioneller Kreisläufe reguliert. Die Hauptakteure in diesen Kreisläufen sind *MDM2*, *MDMX*, *p14* und *E2F-1* (Jin und Levine, 2001; Wu et al., 1993). P53 unterliegt seinerseits der negativen Kontrolle von Mdm2 (murine double minute 2) und Mdmx. *MDM2* ist auf Chromosom 12q13-14 codiert (Oliner et al., 1992), die genetische Information von *MDMX* befindet sich auf Chromosom 1q32 (Shvarts et al., 1997). Letzteres ist in der Literatur auch unter dem Namen *MDM4* oder *HDMX* bekannt (Pei et al., 2012, Wade et al., 2013). Die beiden Proteine gehören zur Gruppe der Protoonkogene. Sie inhibieren p53 über ihre RING-Finger-Domäne (Gareth et al., 2006; Wade et al., 2013). p53 reguliert *MDM2* und *MDMX* positiv, indem es ihre Transkription aktiviert (Jin und Levine, 2001). Mdm2 inaktiviert p53 durch Bindung an der N-terminalen Domäne, welche durch Binden an Promotoren die Transkription p53-abhängiger Gene aktiviert. Mdm2 hemmt jedoch nicht nur die Effektorfunktion von p53 als Transkriptionsfaktor, sondern kann dieses in seiner Funktion als Ubiquitinligase für den Abbau im Proteasom markieren (Pei et al., 2012). Dazu überträgt das Enzym, unter Verbrauch von ATP, Ubiquitinreste auf eine Lysinkette von p53. Im Proteasom erfolgt nun unter Energieverbrauch die Fragmentation von p53 (Müller-Esterl et al., 2010c). Erst über diesen Weg ist eine suffiziente Hemmung von p53 möglich. Mdmx deaktiviert p53 über Bindung im N-terminalen Bereich (Pei et al., 2012). Das Protein kann weder Homodimere bilden, noch p53 ubiquitinieren (Wade et al., 2012). Durch Bildung von Heterodimeren können sich Mdm2 und Mdmx gegenseitig stabilisieren, Mdm2 kann als Heterodimer mit Mdmx p53 effektiver ubiquitinieren (Pei et al., 2012). Der Einfluss von Mdm2 auf p53 konnte sehr anschaulich am Beispiel von Mäusen mit einem Knockout für *MDM2* gezeigt werden, die Mäuse verstarben noch während der Embryonalphase (Jones et al., 1995; Knappskog und Lonning, 2011; Kubbutat et al., 1997;).



Abb. 3 Schematische Darstellung von p53 (modifiziert, Boldrup et al., 2006): p53 besitzt eine transaktivierende Domäne, eine Prolin-reicher Domäne, eine DNA-bindenden Domäne und das nuclear-localization-signal (NLS)

1.2.3 Regulation und Kontrolle von Mdm2 und Mdmx

Mdm2 und Mdmx unterliegen ebenfalls einer Regulation. Akkumulieren in einer Zelle DNA-Schäden, kann Mdm2 Mdmx ubiquitinieren, die Folge ist auch hier die Fragmentation des Proteins im Proteasom. Daneben kann Mdm2 über Autoubiquitinierungsprozesse selbst für den Abbau im Proteasom markiert werden (Pei et al., 2012). Die Ubiquitinligaseaktivität von Mdm2 wird durch P14 inhibiert. Die Transkription dieses Proteins wird von p53 unterdrückt und von E2F-1, einem RB-abhängigen Transkriptionsfaktor, aktiviert. P14 hemmt seinerseits E2F-1 durch Proteolyse, folglich wird weniger p14 transkribiert (Jin und Levine, 2001). Die Aktivität von Mdm2 und Mdmx ist abhängig vom Phosphorylationsstatus. Es wird vermutet, dass eine Reihe von Proteinkinasen durch Phosphorylierung die Ubiquitinligaseaktivität von Mdm2 hemmen können. DNA-Schäden können die Aktivität von Proteinkinasen steigern. Hierzu zählen die Seronin-Proteinkinase Ataxia Telangiektasia Mutated (ATM), c-Abl-Kinase und die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK) (Pei et al., 2012). Alle Mechanismen zur Kontrolle und Regulation von p53 stellen potentielle Angriffspunkte auf dem Weg zur Entartung der Zelle dar. Somit kann eine Störung dieses Systems potentiell die Entwicklung eines malignen Tumors fördern oder verzögern. Häufig finden sich in Tumorzellen Mutationen, insbesondere Missense-Mutationen von *TP53* oder Amplifikationen von *MDM2* und *MDMX* (Jin und Levine, 2001). Erhöhte Level von Mdm2 und Mdmx konnten in malignen Melanomen, Ewing-Sarkomen, Kolonkarzinomen und Retinoblastomen nachgewiesen werden (Gembarska et al., 2012; Gilkes et al., 2008; Laurie et al., 2006; McEvoy et al., 2012; Pishas et al., 2010; Wade et al., 2013), Mdm2-Amplifikationen sind mit einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert (Onel und Cordon-Cardo 2004). Die Funktion von Mdm2 kann auch pharmakologisch genutzt werden. Eine Gruppe dieser Medikamente sind Nutline. Sie führen die Dissoziation von Mdm2 und p53 herbei, p53 kann dadurch den Zellzyklus effektiver beeinflussen. Es konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Nutlin-3 eine 90%ige Verminderung des Tumorwachstums herbeiführt (Vassilev et al., 2004).

Einleitung

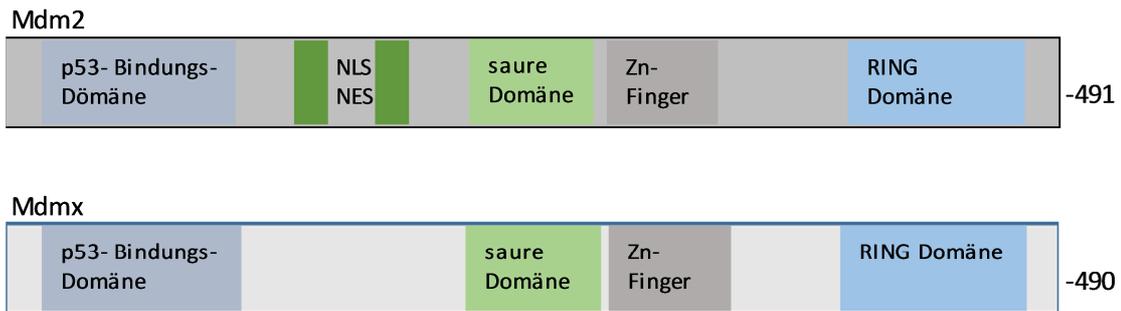


Abb. 4 Das Genprodukt von *MDM2* und *MDMX* (modifiziert, Wade et al., 2010). Mdm2 besitzt im Gegensatz zu Mdmx ein nuclear-export-signal (NES) und ein nuclear-localization-signal (NLS)

1.3 Einzelnukleotid-Polymorphismen

Unter Einzelnukleotid-Polymorphismen, auch als SNP bezeichnet, versteht man eine interindividuelle Varianz, die durch den Austausch einer einzelnen Base charakterisiert ist und eine Häufigkeit von über einem Prozent in der Bevölkerung aufweist. Im menschlichen Genom sind über 10 Millionen dieser singulären Basensubstitutionen bekannt (Bojesen und Nordestgaard, 2008; Müller-Esterl et al., 2010b). Durchschnittlich befindet sich in einem Bereich von 1000-5000 Basen mindestens ein derartiger singulärer Basenaustausch im menschlichen Erbgut. SNPs sind eine Ursache für die individuell unterschiedliche Suszeptibilität für das Auftreten bestimmter Erkrankungen (Mühlhardt, 2009a). Unterschiede in Wirkung, Metabolisierung und unerwünschten Arzneimittelwirkungen von Medikamenten sind durch geringfügige Abweichungen in der Primärstruktur von Enzymen, in Form von Einzelnukleotid-Polymorphismen, bedingt (Müller-Esterl et al., 2010b). Die Bedeutungen dieser SNPs für die Gesundheit oder der Entstehung von Erkrankungen ist jedoch größtenteils noch ungeklärt (Bojesen und Nordestgaard, 2008). Auch in *TP53*, *MDM2* und *MDMX* konnten Einzelnukleotid-Polymorphismen nachgewiesen werden. Je nach Position der Basenveränderung ergeben sich dabei bei einigen SNPs Veränderungen in der Aminosäuresequenz und konsekutiv zum Teil auch in der Funktion der Proteine. Infolge dessen wird auch das Risiko der Entwicklung von malignen Tumoren beeinflusst (Bond und Levine 2007; Grochola et al., 2010).

1.3.1 *TP53* Codon 72 SNP (rs1042522)

Der Codon 72 SNP, auch als Arg72Pro-SNP bekannt, liegt im Exon 4 von *TP53*. Nach seiner Entdeckung 1986 wurden er mit malignen Tumoren, Hepatitis C und Schizophrenie in Verbindung gebracht (Bojesen und Nordestgaard, 2008). An dieser Position (Codon 72) wird anstelle der Base Guanin die Base Cytosin in die DNA eingebaut (Al-Quasem et al., 2011). Folge ist die Bildung eines chemisch veränderten Proteins. Anstelle der Aminosäure Arginin (Arg72-Variante) wird die Aminosäure Prolin (Pro72-Variante) in das Protein eingebaut. Dieser Polymorphismus, im Bereich der Prolin-reichen Domäne, hat einen entscheidenden Einfluss auf die Apoptosefunktion von p53. Liegt die Pro72-Variante vor, so ist die Effektivität, mit der p53 die Apoptose induziert, vermindert (Grochola et al., 2010). Im Gegensatz dazu scheint der Basenaustausch einen positiven Einfluss auf den Zellzyklusarrest und die DNA-Reparatur zu haben (Bojesen und Nordestgaard, 2008). Die Häufigkeit der Pro72-Variante unterliegt regionalen Unterschieden. In einer schwedischen Population hatten 17% der untersuchten Personen diese Veränderung, in Nigeria konnte man es in 63% der Fälle nachweisen (Beckmann et al., 1994).

Die Auswirkungen auf die Entwicklung eines malignen Tumors in Abhängigkeit dieses Polymorphismus sind intensiv untersucht worden und werden kontrovers diskutiert. Die Daten sind insgesamt inkonsistent. Es konnte gezeigt werden, dass die Pro72-Variante mit einem signifikant erhöhtem Risiko für Brustkrebs (Johnson et al., 2007) und einem früheren Erkrankungsalter, im Vergleich zu Patientinnen mit der Arg72-Variante, unter Saudi arabischen Frauen, einhergeht (Al-Quasem et al., 2011). Tumorerkrankungen bei Patienten mit der Pro72-Variante sind mit einem schlechteren klinischen Verlauf assoziiert (Xu et al., 2008). Im Gegensatz dazu zeigten andere Arbeitsgruppen, dass die Pro72-Variante nicht mit einem erhöhten Risiko für Mammakarzinome, unter Trägerinnen von Mutationen in *BRCA1* und *BRCA2*, einhergeht (Sinilnikova et al., 2009), oder aber die Arg72-Variante mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko vergesellschaftet ist (Kalemi et al., 2005). Eine Assoziation zwischen dem Auftreten von Zervixkarzinomen und dem SNP in Codon 72 konnte nicht nachgewiesen werden (Klug et al., 2009). Gleiches gilt für Endometriumkarzinome (Nunobiki et al., 2009). In einer dänischen Publikation konnte gezeigt werden, dass Personen mit der homozygoten Arg72-Variante durchschnittlich einen Überlebensvorteil drei 3 Jahren im Vergleich zur Pro72-Variante aufweisen. Die vergleichsweise höhere Effektivität der Apoptoseinduktion dient als Erklärung für dieses Phänomen. In die Studie gingen unterschiedliche Krebsentitäten ein (Bojesen und Nordestgaard, 2008).

1.3.2 *MDM2* SNP 309 (rs2279744)

Der SNP 309 befindet sich im Intron 1 auf Chromosom 12q13-14, dieser Bereich fungiert als Promotorregion von *MDM2* (Promotor P2). An der Position 309 kommt es zu einem Austausch der Basen Thymin zu Guanin (Knappskog und Lonning, 2011, Oliner et al., 1992). Das T-Allel hat im Vergleich zum G-Allel eine höhere Bindungsaffinität zu Sp1, einem Transkriptionsaktivator. Infolge dessen wird *MDM2* vermehrt transkribiert. Bei Vorliegen des G-Allels lassen sich höhere Mengen an *MDM2*-spezifischer mRNA nachweisen. Eine Erhöhung von Mdm2 innerhalb der Zelle führt zu einer verstärkten Inhibition von p53. Die Akkumulation von genetischen Aberrationen kann von p53 daher nur unzureichend überwacht werden, der Zellzyklus schreitet voran, es kommt nicht zur Apoptose der Zelle. DNA-Schäden werden an die Tochterzellen weitervererbt, weitere Mutationen etablieren sich. Im Verlauf kann die Zelle zu einer malignen Tumorzelle entarten. *MDM2* SNP309 ist mit einem erhöhten Tumorrisiko assoziiert (Bond et al., 2006). Darüber hinaus zeigen die Patienten ein jüngeres Erkrankungsalter (Stoehr et al., 2016). Diese Assoziation zeigt sich sowohl bei Patienten mit Li-Fraumeni Syndrom als auch bei Patienten ohne Keimbahnmutationen in *TP53*. Gehäuft werden maligne Weichteiltumoren, diffus großzellige B-Zell-Lymphome, chronische lymphatische Leukämien, kolorektale Karzinome, Nierenkarzinome oder östrogenrezeptorpositive Mammakarzinome, bei vergleichsweise jungen Patienten, diagnostiziert, wenn das homozygote G-Allel im *MDM2*-Gen vorliegt (Benner et al., 2014; Knappskog und Lonning, 2011; Stoehr et al., 2016). Frauen mit Ovarialkarzinomen, die eine Überexpression des Östrogenrezeptors aufweisen, erkranken ebenfalls früher (Bartel et al., 2008). Das G-Allel ist signifikant mit der Wandinfiltration bei Blasenkrebs assoziiert (Hatzenbichler et al., 2014). Allerdings kann die onkogene Wirkung von *MDM2* SNP 309 nach jetzigem Kenntnisstand nicht auf alle Bevölkerungsgruppen übertragen werden. Im Gegensatz zu Asiaten und Ashkenazi-Juden findet sich bei Kaukasiern kein Zusammenhang zwischen *MDM2* SNP 309 und einer frühzeitigeren Tumorgenese (Economopoulos und Sergentanis, 2010; Knappskog und Lonning, 2011). Andere Autoren konnten auch keine Assoziation zwischen *MDM2* SNP 309 und einem erhöhten Karzinomrisiko nachweisen (Schmidt et al., 2007; Sinilnikova et al., 2009).

1.3.3 *MDM2* SNP 285 (rs117039649)

Im Zusammenhang mit Untersuchungen des SNP 309 im *MDM2*-Gen fand die Arbeitsgruppe um Knappskog und Lonning einen weiteren, 24 Basen entfernt gelegenen, Einzelnukleotid-Polymorphismus, den SNP 285. Dabei kommt es zu einem Austausch der Basen Guanin zu Cytosin. Dieser Polymorphismus wird als Haplotyp mit dem G-Allel des SNP 309 vererbt (Knappskog und Lonning, 2011). Dieser SNP ist nach Auffassung der Autoren relativ neu und insbesondere in der kaukasischen Bevölkerung nachweisbar (Knappskog et al., 2010, Knappskog et al., 2014). Die Frequenz seines Auftretens wird mit 2-6% angegeben, unter Finnen ist der SNP seltener (Knappskog et al., 2014). Die Affinität des Transkriptionsfaktors Sp1 zur Promotorregion ist im Vergleich vermindert. Der affinitätssteigernde Effekt von *MDM2* SNP 309 wird dadurch nicht nur abgeschwächt sondern überkompensiert (Knappskog und Lonning, 2011). Patientinnen mit einem C-Allel im SNP 285 zeigen ein vermindertes Risiko für die Entwicklung von malignen Mamma-, Ovar- oder Endometriumtumoren unter Trägern des *MDM2* SNP 309 (Knappskog und Lonning, 2011; Knappskog et al., 2010). Auch das Risiko für Zervixkarzinome ist bei Vorliegen des SNPs kleiner (Roszak et al., 2015). Dieser Einzelnukleotid-Polymorphismus, der besonders in der kaukasischen Bevölkerung verbreitet ist, kann den unterschiedlichen Einfluss von *MDM2* SNP 309 auf das Krebsrisiko in europäischen und asiatischen Populationen gut erklären (Knappskog et al., 2010).

1.3.4 *MDMX* SNP 31826 (rs1563828)

Der SNP 31826 ist in Intron zehn des *MDMX*-Gens auf Chromosom 1q32 lokalisiert (Shvarts et al., 1997). An der Position 31826 kommt es zu einem Austausch der Basen Guanin und Adenosin. Es konnte gezeigt werden, dass unter Patienten mit Nasopharynxkarzinomen, Träger des singulären Nukleotid-Polymorphismus mit der homozygoten Adenosin-Variante, in einem jüngeren Lebensalter erkrankten. Das Risiko, ein Nasopharynxkarzinom in Abhängigkeit des SNP zu entwickeln, unterschied sich nicht signifikant (Zhang et al., 2012). Dies gilt auch für Brustkrebs. Die Manifestation der Erkrankung ist bei Frauen mit östrogenrezeptornegativen Mammakarzinomen und dem AA-Allel 3,8 Jahre früher, unter einer rein kaukasischen Population sogar 7,5 Jahre (Kulkarni et al., 2009). Die Varianten des SNP 31826 unterscheiden sich nicht signifikant im Risiko ein Mammakarzinom zu entwickeln, jedoch erkrankten Patienten mit der homozygoten Adenosin-Variante früher (Song et al., 2012).

1.3.5 *MDMX* SNP 34091 (rs4245739)

Der SNP 34091 befindet sich im 3`UTR des *MDMX*-Gens. Anstelle der Base Adenosin ist an dieser Position die Base Cytosin eingebaut. Dieser SNP ist die Zielstruktur von miR-191, einer miRNA, welche sowohl in Tumorzellen als auch Normalgewebe exprimiert wird. MiRNAs sind kurze, 21-23 Basenpaare umfassende RNA-Fragmente, die regulierend in die Expression menschlicher Gene eingreifen. Sie binden dazu im 3`-nicht-translatierten Bereich (3`UTR) ihrer Ziel-mRNA (Mühlhardt, 2009b; Müller-Esterl et al., 2010d). MiR-191 kann die Expression des *MDMX*-C-Allels, nicht aber des A-Allels, beeinflussen (Wynendaele et al., 2010). Bei vorhandenem C-Allel wird die mRNA von Mdmx vermehrt abgebaut, die Konzentration ist insgesamt geringer und die potentielle onkogene Wirkung abgeschwächt. Das homozygote A-Allel ist mit einer signifikant erhöhten Expression der Mdmx mRNA in Ovarialkarzinomen verknüpft. Patienten mit besonders aggressiven Ovarialkarzinomen zeigten häufiger die Wildtypvariante. Diese Patienten haben ein 5,5-fach höheres Risiko am Tumor zu versterben, als Patienten mit der CC-Variante (McEvoy et al., 2012; Wynendaele et al., 2010). In einer genomweiten Assoziationsstudie wurde gezeigt, dass *MDMX* SNP 34091 mit der Entwicklung von östrogenrezeptornegativen Mammakarzinomen, auch bei Patientinnen mit einer *BRCA1*-Mutation, assoziiert ist (Garcia-Closas et al., 2013).

1.3.6 *LGR6* rs6678914

Garcia-Closas et al. analysierten in der 2013 publizierte Genom-weite Assoziationsstudie sechs neue Polymorphismen, welche signifikant mit östrogenrezeptornegativen, invasiv lobulären Mammakarzinomen assoziiert sind. Neben *MDMX* SNP 34091 wurde der Polymorphismus *LGR6* rs6678914 beschrieben, beide Gene sind auf Chromosom 1q32 lokalisiert. Der SNP rs6678914 in *LGR6* befindet sich in Intron 1 (Garcia-Closas et al., 2013). Darüber hinaus konnte eine signifikante Assoziation dieses SNPs mit invasiv lobulären Mammakarzinomen gezeigt werden (Sawyer et al. 2014). Im SNP rs6678914 erfolgt ein Austausch der Basen Guanin und Adenin, die Häufigkeit des selteneren A-Allels wird in der NCBI-Datenbank mit 32% angegeben (NCBI-Datenbank, 2016). *LGR6* (leucine rich-repeat containing, G protein-coupled receptor 6) ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, welcher eine große Homologie zu den Rezeptoren *LGR4* und *LGR5* zeigt (Gong et al., 2012). Es ist bekannt, dass diese Rezeptoren in bestimmten Stammzellen exprimiert werden (Baker und Clevers,

Einleitung

2010). Darüber hinaus zeigt sich eine Häufung somatischer Mutationen von *LGR6* bei Patienten mit Kolonkarzinomen (Gong et al., 2012).

Tab. 2 Übersicht der untersuchten SNPs (*)

SNP	Chromosom	Position	Basenaustausch	Vermuteter Mechanismus
<i>TP53</i> Codon 72 SNP	17p13.1	Exon 4	Guanin > Cytosin	Effektivität der Apoptoseinduktion durch missense Mutation vermindert
<i>MDM2</i> SNP 309	12q13-14	Promotor P2	Thymin > Guanin	Bindungsaffinität zu Transkriptionsfaktor Sp1 erhöht
<i>MDM2</i> SNP 285	12q13-14		Guanin > Cytosin	Bindungsaffinität zu Transkriptionsfaktor Sp1 erniedrigt
<i>MDMX</i> SNP 31826	1q32	Intron 10	Guanin > Adenin	
<i>MDMX</i> SNP 34091	1q32	3`UTR	Adenin > Cytosin	Zielstruktur für miR-191
<i>LGR6</i> rs6678914	1q32		Guanin > Adenin	

(*) modifiziert, Bojesen und Nordestgaard, 2008; Bond et al., 2006; Garcia-Closas et al., 2013; Grochola et al., 2010; Knappskog und Lonning, 2011; Knappskog et al., 2010 und 2014; Oliner et al., 1992; Shvarts et al., 1997; Wynendaele et al., 2010

2. Zielstellung

Eine Reihe von Publikationen hat gezeigt, dass es Assoziationen zwischen dem Risiko, an einem Mammakarzinom zu erkranken und Einzelnukleotid-Polymorphismen in den Genen *TP53*, *MDM2*, *MDMX* und *LGR6* gibt (Al-Quasem et al., 2012; Garcia-Closas et al., 2013; Song et al., 2012; Xu et al., 2008). Im Gegensatz dazu zeigten andere Autoren, dass es keine oder nur geringe Zusammenhänge gibt (Knappskog und Lonning, 2011; Millikan et al., 2006), zum Teil können Effekte nur für einzelne Krebsentitäten gezeigt werden (Dahabreh et al., 2012)

Ausgehend davon war es Ziel dieser Arbeit, zu untersuchen, ob sich die bereits beschriebenen Zusammenhänge zwischen dem Brustkrebsrisiko und Einzelnukleotid-Polymorphismen in den Genen *TP53* und *MDM2* in einer großen deutschen Population reproduzieren lassen oder ob sich bei der ohnehin teils widersprüchlichen Datenlage Hinweise für andere Zusammenhänge ergeben. Darüber hinaus sind im Rahmen dieser Arbeit auch erstmals Polymorphismen in den Genen *LGR6* und *MDMX*, welche beide auf Chromosom 1q32 kodiert sind und laut einer genomweiten Assoziationsstudie aus dem Jahr 2013 signifikant mit östrogenrezeptornegativen Mammakarzinomen assoziiert sind (Garcia-Closas et al., 2013), auf Ihre Einflüsse auf das Erkrankungsalter und den klinischen Verlauf untersucht worden.

Die zur Verfügung stehenden Mammakarzinomproben wurden auf sechs Einzelnukleotid-Polymorphismen untersucht. Hierbei handelt sich um *TP53* Codon 72 SNP, *MDM2* SNP 309 und 285, *MDMX* SNP 31826 und 34091 sowie *LGR6* rs6678914. Zunächst wurde der Allel-Status analysiert. Im Anschluss erfolgten Berechnungen unter Einbeziehung der klinischen und pathologischen Daten. Hierzu sind das Alter zum Zeitpunkt der Diagnose, das TNM-Stadium, Lymphgefäß- und Veneninvasion, das Grading des Karzinoms, der Hormonrezeptorstatus und der HER2-Status in die Auswertung einbezogen worden. Ziel war es Korrelationen zwischen molekularen Daten und klinisch-prognostischen Parametern in der untersuchten Patientengruppe zu identifizieren.

3. Material und Methodik

3.1 Gewebematerial

Wir untersuchten natives kryokonserviertes Gewebe von 815 Mammakarzinomen, die ursprünglich für die PiA-Studie (**Prognose im Alltag**) durch Mitarbeiter des Universitätsklinikums für Gynäkologie und Geburtshilfe der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg gesammelt und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden.

Tab. 3 Übersicht der klinischen und pathologischen Daten (Auswahl)

Charakteristika		Verteilung (n)	(%)
Alter bei Erstdiagnose	Mittelwert		62,2 Jahre
	< 55	270	(33,1%)
	>/= 55	545	(66,9%)
	jüngste Patientin		22 Jahre
	älteste Patientin		90 Jahre
T (Primärtumor)	pT1	420	(51,5%)
	pT2	349	(42,8%)
	pT3	39	(4,8%)
	pT4	7	(0,9%)
N (Lymphknotenstatus)	N0	501	(61,5%)
	N1	231	(28,3%)
	N2	51	(6,3)
	N3	3	(3,9%)
M (Fernmetastasen)	M0	815	(100,0%)
	M1	0	(0,0%)
Lymphgefäßinfiltration	L0	592	(72,6%)
	L1	223	(27,4%)
Veneninfiltration	V0	806	(98,9%)
	V1	9	(1,1%)
Grading	G1	94	(11,5%)
	G2	508	(62,3%)
	G3	211	(26,2%)
Histologie	duktal invasives Mammakarzinom	647	(79,4%)
	lobulär invasives Mammakarzinom	123	(15,1%)
	andere	45	(5,5%)
HR-Status	negativ	118	(14,5%)
	positiv	697	(85,5%)
HER2-Status	negativ	702	(86,1%)
	positiv	113	(13,9%)

Material

Die Proben wurden im Zeitraum von 2009 bis 2011 in fünf deutschen Zentren gesammelt. Das Alter der Patientinnen lag zum Diagnosezeitpunkt zwischen 22 und 90 Jahren, das durchschnittliche Alter lag zum Diagnosezeitpunkt bei 62,2 Jahren. Bei Patientinnen die multizentrische oder bilaterale Mammakarzinome hatten wurden alle Tumorproben genotypisiert, da bei allen Proben, wie erwartet, der Genotyp übereinstimmte, wurden die Patientinnen nur einmal in die Berechnungen einbezogen. Die Patientinnen hatten Ihr Einverständnis für die wissenschaftliche Nutzung Ihrer DNA gegeben. Ein positives Ethikvotum für diese Arbeit liegt vor.

3.2 Primer und Oligonukleotide

Die verwendeten Primer wurden unter Anwendung des Programms CloneManager erstellt und durch TIB MOLBIOL (Berlin, Deutschland) oder Biologio (Nijmegen, Niederlande) synthetisiert (Tabelle 6).

Tab. 4 Übersicht der verwendeten Primer

SNP	Primer	Sequenz des Primers	Orientierung
<i>TP53</i> Codon 72	p53 Exon 4 fw	5'- CGTTCTGGTAAGGACAAGGGT – 3'	sense
	p53 Exon 4 rev	5'- AAGAAATGCAGGGGGATACGG – 3'	antisense
<i>MDM2</i> SNP 309	SNP 309 fw	5'- CGGGAGTTCAGGGTAAAGGT – 3'	sense
	SNP 309 rev	5'- AGCAAGTCGGTGCTTACCTG – 3'	antisense
<i>MDM2</i> SNP 285	SNP 309 fw	5'- CGGGAGTTCAGGGTAAAGGT – 3'	sense
	SNP 309 rev	5'- AGCAAGTCGGTGCTTACCTG – 3'	antisense
<i>MDMX</i> SNP 31826	mdmx 31778 fw	5'-TGACAACCTCAAGTCTAGACCCAAA-3'	sense
	mdmx 32012 rev	5'-TTGGCAATGAACTACCATAATG-3'	antisense
<i>MDMX</i> SNP 34091	mdmx 34091 fw	5'-CCTgATTgTCgAAgAACCATT-3'	sense
	XEX11_2 rev	5'-ACATTCTCTGACAGGTTGGAAA-3'	antisense
<i>LGR6</i> rs6678914	lgr6 fw	5'-CTGTGCAAAGCCAGAGAGAAC-3'	sense
	lgr6 rev	5'-GCTCTTCCACCCACCAGATT-3'	antisense

3.3 Taqman Assays

In dieser Arbeit wurden die in Tabelle 7 aufgeführten Taqman SNP Genotyping Assays verwendet.

Tab. 5 Übersicht der in der Arbeit verwendeten Taqman SNP Genotyping Assays

Name des SNP	Name des Genotyping Assays	Firma
<i>TP53</i> Codon 72	rs1042522	Applied Biosystems, USA
<i>MDMX</i> 31826	XSNP31826 rs1563828	Applied Biosystems, USA
<i>MDMX</i> SNP 34091	XSNP34091 rs4245739	Applied Biosystems, USA
<i>LGR6</i> rs6678914	rs6678914	Applied Biosystems, USA

3.4 Enzyme

Hot FIREPol® (5 U/μl)	Solis Biodyne, Estland
Go Green Mastermix®	Promega, Heidelberg

3.5 Kits

BigDye Terminator v1.1 Sequencing Kit	Applied Biosystems, USA
QIAquick DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden Deutschland
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden Deutschland
PCR-Reinigungs-Kit	Seqlab, Göttingen Deutschland

3.6 Chemikalien

Agarose	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg

Material

Borsäure	Roth, Karlsruhe
Desoxyribonukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Promega, Heidelberg
DNA-Standard (100 Basenpaarleiter)	Invitrogen, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Ethanol 96%	Merck, Darmstadt
Ethanol 70 %	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Formamid	Rot, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Proteinase K	Serva, Heidelberg
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe

3.7 Geräte und Verbrauchsmaterialien

BioDocAnalyze (Gelauswertung)	Biometra, Göttingen
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Cubis (Analysewaage)	Sartorius AG, Göttingen
Elektrophorese-Kammer	BioPlex, Freiburg
Magnetrührer	IKA-Labortechnik, Staufen
Mettler AM 100 (Analysewaage)	Mettler, Gießen
Mikropipetten	Eppendorf, Hamburg
Peltier Thermal-Cycler	Bio Rad, München

Material

Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Rotor-Gene RG-3000	Qiagen, Hilden
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Trio-Thermoblock TB1	Biometra, Göttingen
Ultra Violet Transluminator Fluo- Link TFL35M	Milpitas, USA
Vakuumzentrifuge (Concentrator 5301)	Eppendorf, Hamburg
Vortex-Gene 2	Scientific industries, USA
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg

3.8 Puffer und Lösungen

Auftragspuffer (Gelelektrophorese)	10 ml Formamid
	10 mg Xylencyanol
	10 mg Bromphenolblau
	0,2 ml EDTA (0,5M, pH 8)
5xTBE-Puffer	54,0 g Tris
	27,5 g Borsäure
	20 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
	1 l Aqua bidest

3.9 DNA-Isolation mit Qiagen DNA Mini Kit

Die DNA wurde aus nativen kryokonservierten Karzinomproben isoliert. Die DNA-Isolation erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers unter Nutzung des Qiagen DNA Mini Kit.

1. Abtrennen eines ca. 4 mm durchmessenden Gewebestücks von der Probe mittels eines Skalpells und überführen in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß, anschließend kurze Zentrifugation
2. Zugabe von 180 µl ATL-Puffer, den Ansatz kurz vortexen
3. Zugabe von 20 µl Proteinase K und anschließender Verdau der Gewebeprobe im Thermoblock bei 55 °C und 1000 rpm für drei Stunden. Nach Ablauf der drei Stunden ist eine Inkubation bei 37 °C problemlos möglich
4. Erneut kurze Zentrifugation um eine Kontamination zu vermeiden
5. Zugabe von 200 µl AL-Puffer und Probe 15 Sekunden vortexen
6. Probe bei 70 °C und 1000 rpm für 10 Minuten in den Thermoblock setzen um Proteinase K vollständig zu Inaktivieren
7. Erneut kurze Zentrifugation um Kontamination zu vermeiden
8. AE-Puffer auf 70 °C erwärmen
9. Zugabe von 220 µl 96% Ethanol in das Eppendorf-Reaktionsgefäß, danach mittels Pipette auf eine Reaktionssäule geben und anschließende Zentrifugation bei Raumtemperatur und 8000 rpm für eine Minute
10. Verwerfen des Auffanggefäßes inklusive Inhalt, die Säule auf ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß setzen
11. Zugabe von 500 µl AW1-Waschpuffer und Zentrifugation bei Raumtemperatur und 8000 rpm für eine Minute
12. Verwerfen des Auffanggefäßes inklusive Inhalt und Säule auf ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß setzen
13. Zugabe von 500 µl AW1 und Zentrifugation bei Raumtemperatur und 13000 rpm für zwei Minuten

Methoden

14. Verwerfen des Auffanggefäßes inklusive Inhalt, die Säule auf ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß setzen und Zentrifugation bei Raumtemperatur und 13000 rpm für zwei Minuten

15. Verwerfen des Auffanggefäßes inklusive Inhalt, die Säule auf ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß. Anschließend Handschuhwechsel und Zugabe von 80 µl auf 70 °C erwärmten AE-Puffer

16. Inkubation des Eppendorf-Reaktionsgefäß bei 70 °C für drei Minuten

17. Zentrifugation bei Raumtemperatur und 8000 rpm für eine Minute. Im Eppendorf-Reaktionsgefäß befindet sich nun die gelöste DNA unbekannter Konzentration. Die Säule wird verworfen

3.10 DNA-Konzentrationsmessung

Zur Herstellung von DNA-Proben gleicher Konzentration (20 ng/µl) wurden die Proben mit Hilfe eines Bio Photometers (Eppendorf) untersucht. Als Leerprobe verwendeten wir TBE-Puffer. Anschließend berechneten wir unter Nutzung einer Excel-Tabelle die die Menge an notwendigem Aqua bidest zur Anpassung der Proben auf die standardisierte Konzentration von 20 ng/µl.

Vorgehen bei *MDM2* SNP 309 und SNP 285:

3.11 Genotypisierung mittels Sequenzierungsreaktion

3.11.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Alle PCR- Reaktionen wurden mit der Hotfire-Pol der Firma Solis Biodyne (Estland) durchgeführt. Der 25 µl PCR-Ansatz umfasst folgende Komponenten:

12,5 µl Go Green Master Mix® (Firma Promega)

9,5 µl Aqua bidest.

1,0 µl je forward und reverse Primer

1,0 µl 20 ng/µl DNA

Methoden

Die Polymerasekettenreaktion erfolgte in einem Thermocycler nach folgendem Programm:

1. Initiale Aktivierung	95°C	15 min
2. Cycling (45x) - Denaturierung	95°C	15 s
- Annealing	55- 58°C	20 s
- Extension	72°C	30 s
3. Finale Extension	72°C	10 min

Die Temperatur der Annealing-Phase variierte im Bereich zwischen 55- 58 °C, je nachdem welches Gen amplifiziert wurde.

3.11.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zum Nachweis der erfolgreichen Amplifikation der DNA-Fragmente mittels Polymerase-Kettenreaktion wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Es wurde ein 1%iges Agarosegel, bestehend aus 50 ml 0,5xTBE, 500 mg Agarose und 1,25 µl Ethidiumbromid, benutzt. Die Gelelektrophorese erfolgte mit 0,5xTBE-Laufpuffer bei 90 Volt und 45 mA für 20 Minuten in Gelkammern der Firma Bioplex. Jeweils 8 µl Probe wurden auf das Agarosegel aufgetragen. Zur Charakterisierung der Fragmentlänge dienten 100 Basenpaarlängenstandards. Nach abgeschlossener Gelelektrophorese wurden die Banden nach Visualisierung mit UV-Strahlung dokumentiert und anschließend die Bande mit dem gewünschten DNA-Fragmenten mittels Skalpell entnommen und in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt.

3.11.3 DNA-Isolation mit QIAquick Gel Extraction Kit aus Agarosegel

Die Isolation erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen entsprechend dem Herstellerprotokoll, folgende Schritte wurden durchgeführt.

1. Zugabe von 300 µl QG-Puffer in das Eppendorf-Reaktionsgefäß und Inkubation bei 50°C für 10 Minuten, die Probe zwischenzeitlich mehrfach vortexen, abschließend die Probe nochmals gründlich vortexen, kontrollieren, dass sich das Agarosegel komplett gelöst hat
2. Die Lösung wird auf eine Zentrifugationssäule gegeben und bei Raumtemperatur und 10000 rpm für eine Minute zentrifugiert, der Durchfluss wird verworfen

Methoden

3. Zugabe von 500 µl QG-Puffer auf die Säule, Zentrifugation bei Raumtemperatur und 10000 rpm für eine Minute, der Durchfluss wird erneut verworfen
4. Zugabe von 350 µl PE-Puffer auf die Säule, Zentrifugation bei Raumtemperatur und 10000 rpm für eine Minute. Der Durchfluss wird erneut verworfen, der Vorgang wird einmal wiederholt
5. Nochmaliges zentrifugieren, anschließend wird die Säule auf ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß gesetzt und für drei Minuten bei Raumtemperatur getrocknet
6. Zugabe von 50 µl EB-Puffer. Um die DNA vollständig zu lösen wird diese für fünf Minuten inkubiert und anschließend bei Raumtemperatur und 10000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Die gelöste DNA befindet sich nun in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß.

3.11.4 Sequenzierungsreaktion

Die Durchführung der Sequenzierungsreaktion erfolgte mit dem BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit der Firma Applied Biosystems, USA.

Der Ansatz je Sequenzierungsreaktion setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

- 11,0 µl Sequenzierpuffer (5x)
- 2,0 µl Terminator Mix
- 4,0 µl 0,8 pmol/l Primer (Verwendung des jeweiligen forward bzw. reverse Primers)
- 3,0 µl aufgereinigte DNA (siehe 3.3.3)

Die Sequenzierungsreaktion erfolgte in 0,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäßen im Trioblock™ Thermocycler nach folgendem Programm:

1. 96 °C 1 min
2. 96 °C 10 s
3. 50 °C 5 s
4. 60 °C 4 min
5. Schritt 2. - 4. 24 Mal wiederholen.

3.11.5 Fällung der Sequenzierungsprodukte aus dem BigDye Terminator Kit

Zur Analyse der Proben ist eine vorherige Aufreinigung der Sequenzierungsprodukte erforderlich. Das Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde vor direkter Lichteinstrahlung geschützt.

Zu den 20 µl Sequenzierungsprodukt wurden folgende Komponenten gegeben:

2 µl 125 mM/l EDTA

2 µl 3M/l Natriumacetat

50 µl 96%iger Ethanol

Nach gründlichem Vortexen erfolgte für 15 Minuten bei Raumtemperatur die Inkubation. Die Tubes sollten hierbei möglichst vor direkter Lichteinstrahlung geschützt sein. Im Anschluss wurden die Proben bei 4 °C und 6000 rpm für 20 Minuten zentrifugiert. Nach vorsichtiger Entnahme der Eppendorf-Reaktionsgefäße aus der Tischzentrifuge wurde die überstehende Flüssigkeit vorsichtig abpipettiert ohne das DNA-Pellet zu entfernen. Nach Zugabe von 70 µl 70% Ethanol wurden die Proben bei 4 °C und 6000 rpm für zehn Minuten zentrifugiert. Erneut vorsichtiges abpipettieren der überstehenden Flüssigkeit. Das Pelett wurde danach in einem Thermocycler bei 80 °C für zehn Minuten getrocknet.

3.11.6 Vorbereitung der Analyse

Die Analyse der Proben im Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Zur Beschleunigung der Bearbeitung der Proben wurde die terminale Aufbereitung der Proben vor der Analyse nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. Zentrifugation der Eppendorf-Reaktionsgefäße mit DNA-Pelett mittels einer Zentrifuge bei 7000 U/min
2. 12 µl Formamid in die Tubes pipettieren und für zehn Sekunden vortexen, anschließend Inkubation der Lösung für zehn Minuten
3. Zentrifugation der Proben für zehn Sekunden bei 7000 U/min
4. Überführen der gelösten DNA aus den Eppendorf-Reaktionsgefäßen auf eine 96-Well-Platte, anschließend Verschluss der Platte mittels Septum

Vorgehen bei P53 Codon 72, MDMX SNP 31826, MDMX SNP 34091, LGR6:

3.12 Genotypisierung mittels Real-Time PCR

Eine alternative Untersuchungsmethode von genetischen Polymorphismen ist die Real-Time-PCR. Hierzu wurden Taqman-Assays der Firma Applied Biosystems verwendet. Diese Sonden verfügen über einen fluoreszierenden Reporterfarbstoff am 5'-Ende, sowie einen Quencher am 3'-Ende einer spezifischen Oligonukleotidsonde. Ein TaqMan-Assay besteht aus einer FAM-markierten Sonde (Wildtyp-Allel) und einer VIC-markierten Sonde (mutiertes Allel). Die vom Reporterfarbstoff abgestrahlte Fluoreszenz wird in der intakten Sonde durch die räumliche Nähe zum Quencher-Farbstoff über den Mechanismus der Fluoreszenzresonanzenergietransfers unterdrückt (Förster, 1948). Während des PCR-Zyklus wird die Sonde mit Hilfe der 5'→3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase abgebaut, folglich kommt es zu einer räumlichen Dissoziation von Reporterfarbstoff und Quencher, wodurch das Fluoreszenzsignal detektiert werden kann. Für diesen Mechanismus muss sich die Oligonukleotidsonde während der Annealingphase in 3'-Richtung der Primerbindungsstelle befinden, um während der Extensionsphase schließlich abgebaut zu werden. Mit jedem neuen Durchgang der PCR steigt das Signal proportional zur Menge neu synthetisierter DNA-Produkte an (Mühlhardt 2009c).

Zur Testung der Reliabilität dieser Methode wurde die Reaktion zunächst an DNA-Proben mit bekanntem Genotyp durchgeführt. Nachdem die Ergebnisse mit der konventionellen Sequenzierungsreaktion nach Sanger übereinstimmten, wurden Proben aus dem Patientenkollektiv Hilfe der Real-Time-PCR untersucht.

Die 20 µl Reaktionsansatz enthielten folgende Komponenten:

- 11,6 µl Aqua bidest.
- 2,0 µl Puffer B
- 2,0 µl MgCl₂
- 1,6 µl dNTPs
- 0,3 µl Hotfire Pol® (Solis Biodyne, Estland)
- 0,5 µl Taqman-Assay
- 2,0 µl 20ng/µl DNA

Methoden

Folgendes Programm wurde zur Messung im Rotorgene 3000 von Qiagen verwendet:

1. 95 °C 15 min
2. 95 °C 15 s
3. 60 °C 20 s
4. 72 °C 20 s
2. -4. 39 Mal wiederholen

Die Messergebnisse wurden mit der Allelic Discrimination Software des Rotorgenes 3000 ausgewertet.

3.13 Statistische Auswertung

Die statistischen Berechnungen der erhobenen Daten erfolgte mit der Software IBM SPSS Statistics, Version 21. (Armonk, USA). Als signifikant wurden dabei alle Ergebnisse eingestuft, die einen p-Wert kleiner 0,05 aufwiesen. Die Nullhypothese wurde für diese Fälle abgelehnt. Daneben erfolgte die Berechnung der 95%-Konfidenzintervalle um die statistische Genauigkeit der beobachteten Effekte zu demonstrieren. In die Berechnungen wurden die Genotypen von 815 Patientinnen einbezogen. Die klinischen und pathologischen Daten der Patientinnen wurden im Rahmen der **PiA**-Studie durch Mitarbeiter der Universitätsklinik für Gynäkologie und Geburtshilfe der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg gesammelt und geordnet und uns im Anschluss freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die Verteilung der klinischen und pathologischen Variablen wurde in Abhängigkeit des Genotyps tabellarisch veranschaulicht, die Berechnung der p-Werte erfolgte mittels Chi-Quadrat-Test nach Pearson.

Darüber hinaus erfolgte der Vergleich der Mittelwerte des Erkrankungsalters in Abhängigkeit der drei Allelvarianten eines SNPs und des Östrogenrezeptorstatus mit Hilfe des Varianztests. Unterschiede im Alter zum Diagnosezeitpunkt wurden des Weiteren mit dem Log Rank-Test dargestellt.

Mit Hilfe von Regressionsanalysen sollte gezeigt werden, welche Zusammenhänge zwischen den Variablen existieren. Der Genotyp wurde dabei als unabhängige Variable definiert. Ziel war es, zu zeigen, welchen Einfluss der Genotyp auf das Alter zum Zeitpunkt der Diagnose, das Stadium innerhalb der TNM-Klassifikation oder den Hormonrezeptorstatus haben.

4. Ergebnisse

4.1. TP53 Codon 72 SNP (rs1042522)

4.1.1 Häufigkeiten der Allele

Von den 815 untersuchten Patientinnen zeigten 406 Patientinnen (49,2%) die Variante G/G, bei 351 Frauen (43,8%) zeigte sich die Variante G/C. In 58 Fällen (7,0%) fand sich die Variante C/C. Die Frequenz der C/C-Variante wird in der Literatur in Abhängigkeit der untersuchten Population mit einer Häufigkeit von 2,6-12,9% angegeben (Cotignola et al., 2012, Groß et al., 2014). Die bekannte Allelhäufigkeit kann anhand der von uns untersuchten Proben bestätigt werden.

4.1.2 Assoziation mit dem Alter

Das Erkrankungsalter der Patienten lag im Durchschnitt bei 62,2 Jahren, die Patientinnen waren zwischen 22 und 90 Jahre alt. Vergleicht man die Verteilung des Alters zum Zeitpunkt der Erstdiagnose in Abhängigkeit des SNP, so fällt auf, dass Patientinnen mit der homozygoten G/G-Variante durchschnittlich mit 61,7 Jahren erkranken, Patientinnen mit der heterozygoten G/C-Variante sind zum Zeitpunkt der Diagnosestellung im Mittel 62,8 Jahre alt. Bei Frauen, die den Genotyp C/C tragen, wird das Mammakarzinom durchschnittlich mit 63,8 Jahren diagnostiziert. Die jüngste Patientin mit der C/C-Variante war 31 Jahre zum Zeitpunkt ihrer Diagnosestellung und damit neun Jahre älter, als die jüngste Patientin mit der G/C-Variante (siehe Tab. 6). Der SNP ist nicht signifikant mit dem Erkrankungsalter der untersuchten Patientinnen assoziiert ($p=0,984$; siehe Tab. 7). Zudem unterscheiden sich die Mittelwerte des Erkrankungsalter in Abhängigkeit des Genotyps unterscheiden sich nicht signifikant ($p=0,198$; Varianztest).

Ergebnisse

Tab. 6 Altersverteilung der Patientinnen zum Diagnosezeitpunkt bei *TP53* Codon 72

	Gesamt (n=815)	G/G (n=406)	G/C (n=351)	C/C (n=58)
Mittelwert (in Jahren)	62,2	62,7	62,8	63,8
jüngste Patientin (in Jahren)	22	29	22	31
älteste Patientin (in Jahren)	90	89	90	89
Spannbreite (in Jahren)	68	60	68	58

4.1.3 Assoziation mit dem Tumorstadium

Die Berechnungen ergaben keine Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen dem Genotyp und dem Tumorstadium gemäß TNM zum Zeitpunkt der Diagnose (siehe Tab. 8).

4.1.4 Assoziation mit der histologischen Differenzierung und dem Grading

In der Literatur werden Assoziationen zwischen *TP53* Codon 72 und dem Grading von Mammakarzinomen beschrieben. Patienten mit der G/G-Variante haben gehäuft ein mäßig differenziertes Karzinom (Zajac et al., 2014). Bei den untersuchten Frauen zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Genotyp und dem Grading des Karzinoms. Patientinnen mit der Variante G/G zeigten in 9,1% ein gut differenziertes (G1), in 64,8 % ein mäßig differenziertes (G2) und in 26,1% ein schlecht differenziertes Karzinom (G3). Patientinnen mit der Variante C/C haben hingegen in 20,7% ein schlecht differenziertes Karzinom (G3). Dieser Zusammenhang ist signifikant (OR=1,615; p=0,032; 95% KI 1,041-2,505). Der Genotyp G/G ist mit schlecht differenzierten Tumoren assoziiert, die Wahrscheinlichkeit ist um das 1,6-fache erhöht. Es zeigte sich, dass die invasiv duktales Mammakarzinome häufiger schlecht differenziert waren (50,8%). Bei den invasiv lobulären Karzinomen waren es 16,7%. Die invasiv lobulären Mammakarzinome sind signifikant mit einer guten Differenzierung assoziiert (OR=3,937; p=0,034; 95% KI 1,111-13,952), dieser Zusammenhang ist bekannt (Klöppel et al., 2013c). Daneben zeigten die Tumoren bei Trägern der G/G-Variante häufiger eine lobuläre Differenzierung, 18% der Patientinnen mit dem G/G-Allel haben ein invasiv lobuläres Mammakarzinom, bei den Patientinnen mit dem C/C-Allel sind es lediglich 10,3%. Der Arg72Pro-SNP ist signifikant mit dem lobulär invasives Mammakarzinom assoziiert, die Wahrscheinlichkeit ist um das 1,6-fache erhöht (OR=1,558; p=0,026; 95% KI 1,053-2,304).

Ergebnisse

4.1.5 Assoziation mit den Hormonrezeptoren

Patienten mit der homozygoten C-Variante hatten häufiger ein Hormonrezeptor-positives Mammakarzinom als Patientinnen der anderen Genotypen. In 93,1% ist hier der Östrogenrezeptorstatus positiv. Dagegen zeigten nur 84,2% der Patientinnen mit dem Allelstatus G/G einen positiven Östrogenrezeptorstatus. Der Zusammenhang ist jedoch nicht signifikant ($p=0,811$; siehe Tab. 7)

Tab. 7 Übersicht der Ergebnisse der binär-logistischen Regression von *TP53* Codon 72

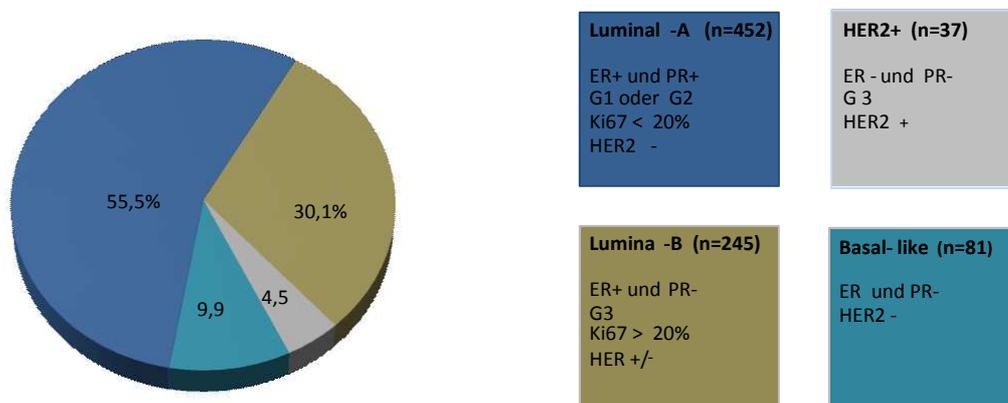
Variablen	Genotyp	OR	95% Konfidenzintervall	p-Wert
Alter bei Diagnose (Cut-off 40 Jahre)	G/G	1,000		
	G/C+C/C	0,992	0,467-2,109	0,984
Alter bei Diagnose (Cut-off 55 Jahre)	G/G	1,000		
	G/C+C/C	1,034	0,772-1,384	0,823
Primärtumor (T)	G/G	1,000		
	G/C+C/C	1,087	0,826-1,43	0,554
Nodalstatus (N)	G/G	1,000		
	G/C+C/C	1,232	0,929-1,634	0,147
Grading	G/G	1,000		
	G/C+C/C	1,615	1,041-2,505	0,032
histologische Differenzierung	G/G	1,000		
	G/C+C/C	1,558	1,053-2,304	0,026
Östrogenrezeptorstatus	G/G+G/C	1,000		
	C/C	0,955	0,653-1,369	0,811
Progesteronrezeptorstatus	G/G	1,000		
	G/C+C/C	1,049	0,778-1,414	0,755
HER2-Status	G/G	1,000		
	G/C+C/C	1,265	0,849-1,885	0,248

4.1.6 Assoziation mit den intrinsischen Subtypen des Mammakarzinoms

Mammakarzinome können in intrinsische Subtypen eingeteilt werden. Die Subtypen geben Rückschlüsse auf den Krankheitsverlauf und sind therapierelevant (Untch et al., 2011). Die Einteilung erfolgte über Markerprofile in Anlehnung an die Empfehlung der St.-Gallen-Konferenz 2011 (siehe Abb. 5).

Die intrinsischen Subtypen unterscheiden sich im Auftreten von Mutationen im *TP53*. Gehäuft finden sich Mutationen in Mammakarzinomen mit einer HER2-Überexpression und bei Basal-like-Tumoren (Sørli et al., 2011). In der untersuchten Patientengruppe fand sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Genotyp von *TP53* Codon 72 mit den intrinsischen Subtypen.

Abb. 5 Verteilung und Kriterien intrinsischen Subtypen (modifiziert, Untch et al., 2011 und Goldhirsch et al., 2013)



Ergebnisse

Tab. 8 Verteilung klinisch-pathologischer Variablen bei *TP53* Codon 72(Auswahl)

<i>TP53</i> Codon 72 (n=815)				
Variablen	G/G (n=406)	G/C (n=351)	C/C (n=58)	p-Wert *
Alter				
< 55 J.	133 (32,8%)	120 (34,2%)	17 (29,3%)	0,747
≥ 55 J.	273 (67,2%)	231 (65,8%)	41 (70,7%)	
Histologie				
duktal	313 (77,1%)	287 (81,8%)	47 (81,0%)	0,167
lobulär	73 (18,0%)	44 (12,5%)	6 (10,3%)	
andere	20 (4,9%)	20 (5,7%)	5 (8,6%)	
Tumorgröße				
T1	205 (50,5%)	183 (52,1%)	32 (55,2%)	0,175
T2	174 (42,9%)	153 (43,6%)	22 (37,9%)	
T3	25 (6,2%)	12 (3,4%)	2 (3,4%)	
T4	2 (0,5%)	3 (0,9%)	2 (3,4%)	
Nodalstatus				
N0	240 (59,1%)	226 (64,4%)	35 (60,3%)	0,171
N1	126 (31,0%)	84 (23,9%)	21 (36,2%)	
N2	25 (6,2%)	25 (7,1%)	1 (1,7%)	
N3	15 (3,7%)	16 (4,6%)	1 (1,7%)	
Grading				
G1	37 (9,1%)	47 (13,4%)	10 (17,2%)	0,185
G2	263 (64,8%)	210 (59,8%)	36 (62,1%)	
G3	106 (26,1%)	94 (26,8%)	12 (20,7%)	
Lymphgefäßinfiltration				
L0	298 (72,7%)	262 (73,4%)	41 (70,7%)	0,914
L1	112 (27,3%)	95 (26,6%)	17 (29,3%)	
Veneninfiltration				
V0	404 (99,5%)	345 (98,3%)	57 (98,3%)	0,25
V1	2 (0,5%)	6 (1,7%)	1 (1,7%)	
ER-Status				
positiv	342 (84,2%)	293 (83,5%)	54 (93,1%)	0,166
negativ	64 (15,8%)	58 (16,5%)	4 (6,9%)	
PR-Status				
positiv	285 (70,2%)	242 (68,9%)	41 (70,7%)	0,919
negativ	121 (29,8%)	109 (31,1%)	17 (29,3%)	
Intrinsischer Subtyp				
Luminal-A	227 (55,9%)	189 (53,8%)	36 (62,1%)	0,489
Luminal-B	117 (28,8%)	109 (31,1%)	19 (32,8%)	0,229
HER2+	20 (6,0%)	16 (3,8%)	1 (1,6%)	0,164
Basal-like	42 (10,3%)	37 (10,5%)	2 (3,4%)	0,363

* Die Berechnung des p-Wertes erfolgte mit dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson

4.2 MDM2 SNP 309 (rs2279744)

4.2.1 Häufigkeit der Allele

MDM2 SNP 309 ist mit einem erhöhten Tumorrisiko assoziiert (Bond et al., 2006). Die Variante T/T wird mit einer Häufigkeit von 36,5-47,5% angegeben, die Variante G/G mit 12,2-19,2% (Cotignola et al., 2012). Bei der Analyse der Mammakarzinome fand sich in 45,3% die Variante T/T, in 42,9% die Variante T/G und in 11,8% der Genotyp G/G.

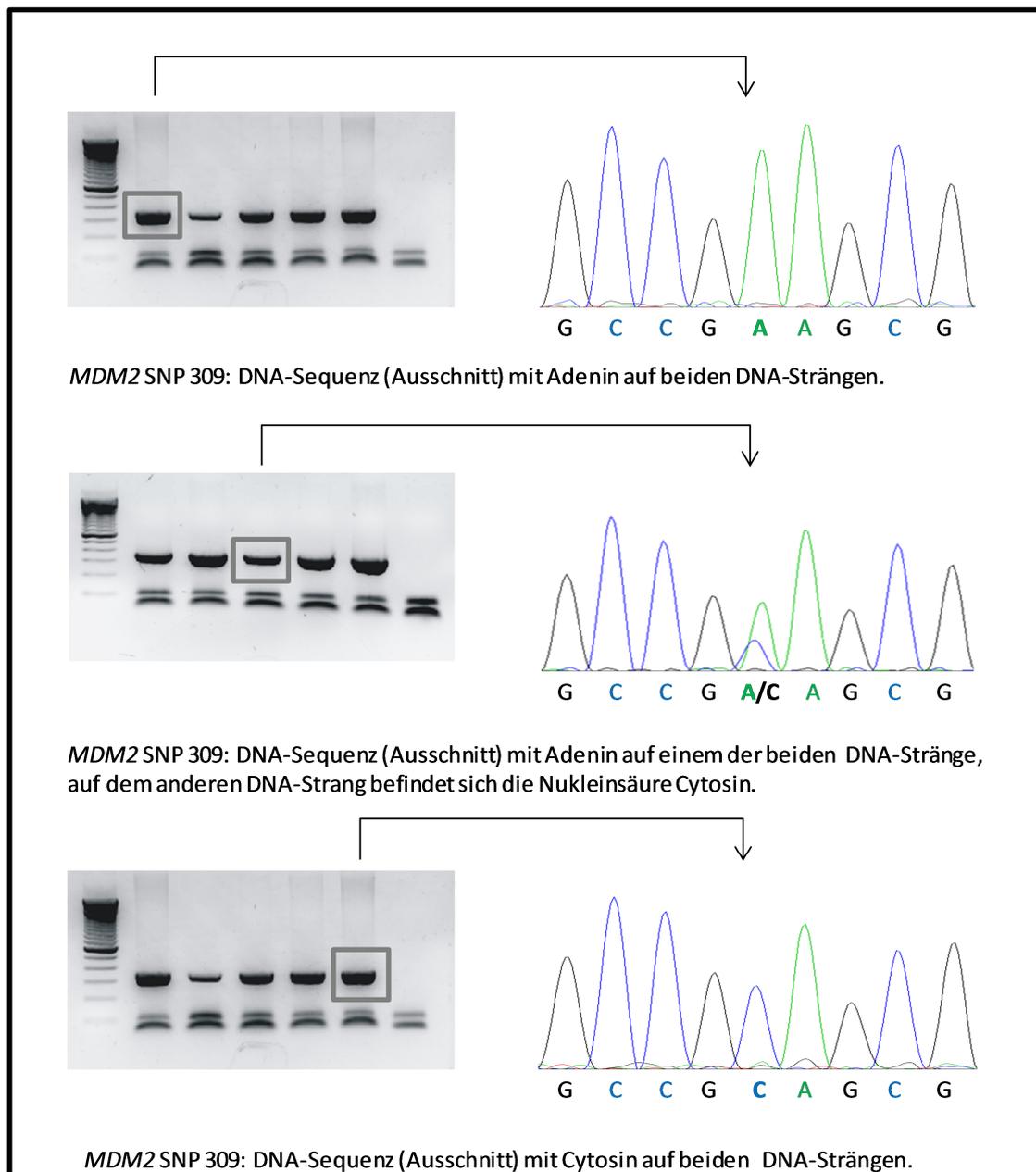


Abb. 6 Gelelektrophorese und Ausschnitte aus der DNA-Sequenz, zu beachten ist, dass hier die Sequenz des Reverse-Strangs abgebildet ist

4.2.2 Assoziationen mit dem Alter

Das mittlere Erkrankungsalter der Frauen lag bei 62,2 Jahren. Frauen mit der Variante G/G erkrankten durchschnittlich 0,9 Jahre früher als Frauen mit dem Genotyp T/T. (siehe Tab. 9).

Tab. 9 Altersverteilung der Patienten zum Diagnosezeitpunkt bei *MDM2* SNP 309

	Gesamt (n=815)	T/T (n=369)	T/G (n=350)	G/G (n=96)
Mittelwert (in Jahren)	62,2	62,5	62,0	61,6
jüngste Patientin (in Jahren)	22	22	25	22
älteste Patientin (in Jahren)	90	89	90	88
Spannbreite (in Jahren)	68	67	65	66

Diskriminiert man die Patientinnen entsprechend des Östrogenrezeptorstatus, zeigte sich, dass Patientinnen mit einem negativen Östrogenrezeptorstatus und dem Allel-Status G/G im Mittel zum Diagnosezeitpunkt 57,8 Jahre alt waren. Patientinnen mit dem gleichen Genotyp und einem positiven Östrogenrezeptorstatus waren durchschnittlich 63,0 Jahre alt. Es konnte gezeigt werden, dass die Transkription des G-Allels durch den Einfluss von Östrogen gesteigert wird (Hu et al., 2007). Das mittlere Erkrankungsalter unterscheidet sich um 5,2 Jahre (siehe Tab. 12), der Zusammenhang ist nicht signifikant ($p=0,057$, Varianztest). Ebenfalls im Log-Rank-Test zeigt kein signifikanter Zusammenhang ($p=0,098$; siehe Abb. 7).

4.2.3 Assoziationen mit dem Tumorstadium

Die Größe des Primärtumors (T) und der Nodalstatus (N) unterscheiden sich nur geringgradig in Abhängigkeit des SNP. Patienten mit dem Allelstatus G/G hatten häufiger einen Primärtumor im Stadium T4 (2,2%), als Patienten mit dem Allelstatus T/T (0,3%, siehe Tab. 12, Anhang). Der Zusammenhang ist nicht signifikant ($p=0,87$; siehe Tab. 11).

4.2.4 Assoziationen mit der histologischen Differenzierung und dem Grading

Die histologische Differenzierung und das Grading der Mammakarzinome zeigten keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit von *MDM2* SNP 309 (siehe Tab. 11).

Ergebnisse

Tab. 10 Diagnosealter in Abhängigkeit des Östrogenrezeptorstatus bei *MDM2* SNP 309

Genotyp	Gesamt	T/T	T/G	G/G
Östrogenrezeptorstatus	positiv	positiv	positiv	positiv
	(n=699)	(n=311)	(n=305)	(n=83)
Mittelwert (in Jahren)	62,4	61,8	62,8	63,0
jüngste Patientin (in Jahren)	22	28	29	22
älteste Patientin (in Jahren)	90	90	89	88
Östrogenrezeptorstatus	negativ	negativ	negativ	negativ
	(n=126)	(n=64)	(n=49)	(n=13)
Mittelwert (in Jahren)	61,4	63,1	60,9	57,8
jüngste Patientin (in Jahren)	25	25	30	31
älteste Patientin (in Jahren)	86	86	80	79

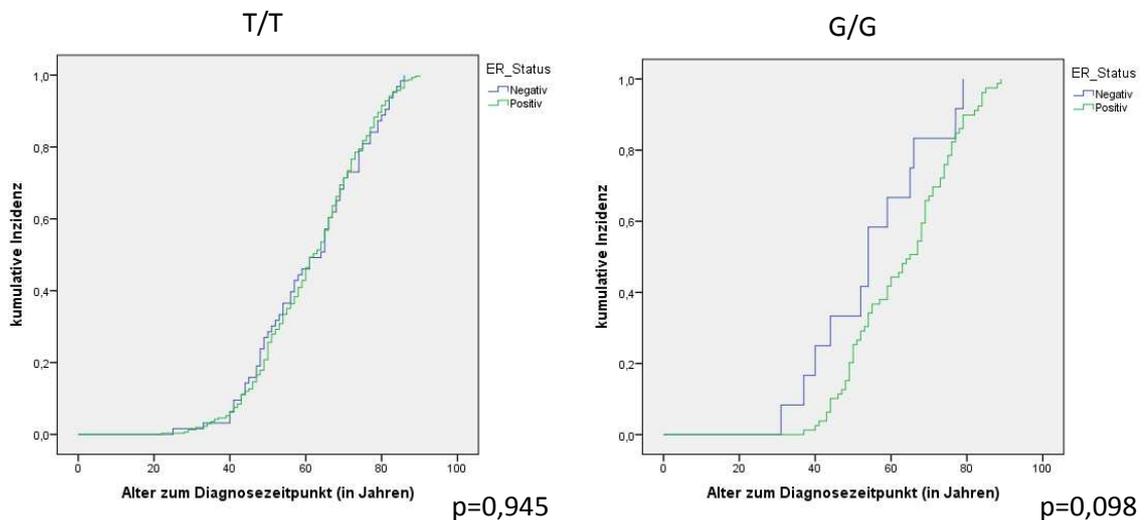


Abb. 7 Log-Rank-Test: Erkrankungsalter in Abhängigkeit von *MDM2* SNP 309 getrennt nach dem Östrogenrezeptorstatus

4.2.5 Assoziationen mit dem Hormonrezeptorstatus

Es konnte keine signifikante Assoziation zwischen dem Genotyp und dem Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus in der untersuchten Patientengruppe nachgewiesen werden. Patientinnen mit dem Genotyp G/G haben nicht signifikant öfter ein östrogenrezeptorpositives Mammakarzinom ($p=0,177$; siehe Tab. 11).

Ergebnisse

Tab. 11 Übersicht der Ergebnisse der binär-logistischen Regression bei *MDM2* SNP 309

Grading	Genotyp	OR	95% Konfidenzintervall	p
Alter bei Diagnose (Cut-off 40 Jahre)	T/T	1,000		
	T/G+G/G	0,953	0,448-2,029	0,901
Alter bei Diagnose (Cut-off 55 Jahre)	T/T	1,000		
	T/G+G/G	0,962	0,717-1,289	0,793
Primärtumor (T)	T/T	1,000		
	T/G+G/G	1,023	0,776-1,348	0,870
Nodalstatus (N)	T/T	1,000		
	T/G+G/G	0,889	0,669-1,181	0,417
Grading	T/T	1,000		
	T/G+G/G	1,079	0,7-1,664	0,731
histologische Differenzierung	T/T	1,000		
	T/G+G/G	0,861	0,583-1,273	0,453
Östrogenrezeptorstatus	T/T	1,000		
	T/G+G/G	0,769	0,526-1,125	0,177
Progesteronrezeptorstatus	T/T	1,000		
	T/G+G/G	0,950	0,704-1,283	0,740
HER2-Status	T/T	1,000		
	T/G+G/G	0,806	0,538-1,206	0,294

4.2.6 Assoziation mit den intrinsischen Subtypen

Die Häufigkeitsverteilung der intrinsischen Subtypen zeigt keinen signifikanten Unterschied in Abhängigkeit des Genotyps von *MDM2* SNP 309 (siehe Tab. 12).

Ergebnisse

Tab. 12 Verteilung der intrinsischen Subtypen bei *MDM2* SNP 309

<i>MDM2</i> SNP 309 (n=815)				
Variablen	T/T (n=369)	T/G (n=350)	G/G (n=96)	p-Wert *
Alter				
< 55 J.	124 (33,6%)	114 (32,6%)	32 (33,3%)	
≥ 55 J.	245 (66,4%)	236 (67,4%)	64 (66,7%)	0,957
Histologie				
duktal	292 (79,1%)	277 (79,1%)	78 (81,2%)	
lobulär	51 (13,8%)	59 (16,9%)	13 (13,5%)	
andere	26 (7,0%)	14 (4,0%)	5 (5,2%)	0,360
Tumorgröße				
T1	189 (51,2%)	184 (52,6%)	47 (49,0%)	
T2	161 (43,6%)	145 (41,4%)	43 (44,8%)	
T3	18 (4,9%)	17 (4,9%)	4 (4,2%)	
T4	1 (0,3%)	4 (1,1%)	2 (2,1%)	0,666
Nodalstatus				
N0	233 (63,1%)	203 (58,0%)	65 (67,7%)	
N1	100 (27,1%)	109 (31,1%)	22 (22,9%)	
N2	23 (6,2%)	22 (6,3%)	6 (6,2%)	
N3	13 (3,5%)	16 (4,6%)	3 (3,1%)	0,635
Grading				
G1	41 (11,1%)	44 (12,6%)	9 (9,4%)	
G2	225 (61,0%)	221 (63,1%)	63 (65,6%)	
G3	103 (27,9%)	85 (24,3%)	24 (25,0%)	0,730
Lymphgefäßinfiltration				
L0	272 (72,5%)	259 (73,2%)	70 (72,9%)	
L1	103 (27,5%)	95 (26,8%)	26 (27,1%)	0,949
Veneninfiltration				
V0	364 (98,6%)	347 (99,1%)	95 (99,0%)	
V1	5 (1,4%)	3 (0,9%)	1 (1,0%)	0,814
ER-positiv				
positiv	305 (82,7%)	301 (86,0%)	83 (86,5%)	
negativ	64 (17,3%)	49 (14,0%)	13 (13,5%)	0,398
PR-Status				
positiv	255 (69,1%)	245 (70,0%)	68 (70,8%)	
negativ	114 (30,9%)	105 (30,0%)	28 (29,2%)	0,935
Intrinsischer Subtyp				
Luminal-A	201 (54,6%)	200 (56,3%)	51 (55,4%)	0,298
Luminal-B	117 (31,8%)	100 (28,2%)	28 (30,4%)	0,587
HER2+	20 (4,9%)	16 (4,6%)	1 (1,7%)	0,549
Basal-like	38 (10,3%)	36 (10,1%)	7 (7,6%)	0,728

* Die Berechnung des p-Wertes erfolgte mit dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson

4.3 *MDM2* SNP 285 (rs117039649)

4.3.1 Häufigkeit der Allele

Das C-Allel von *MDM2* SNP 285 wird als Haplotyp mit dem G-Allel von *MDM2* SNP 309 vererbt (Knappskog et al., 2010, Knappskog und Lonning, 2011). Seine Häufigkeit wird in der Literatur mit unter zwei Prozent angegeben (Knappskog und Lonning, 2011). Die Genotypisierung ergab in 755 Fällen (92,6%) die Variante G/G. In 6,9 % wurde die Variante G/C nachgewiesen. Bei vier Frauen fand sich die Variante C/C (0,5%).

4.3.2 Assoziation mit dem Alter

Patienten mit den Allelen G/C und G/G waren zum Diagnosezeitpunkt im Mittel 61,9 bzw. 62,3 Jahre alt. Patienten mit dem C/C-Allel erkrankten durchschnittlich mit 44,33 Jahren (siehe Tab. 13). Der Zusammenhang ist signifikant ($p=0,031$, Varianztest).

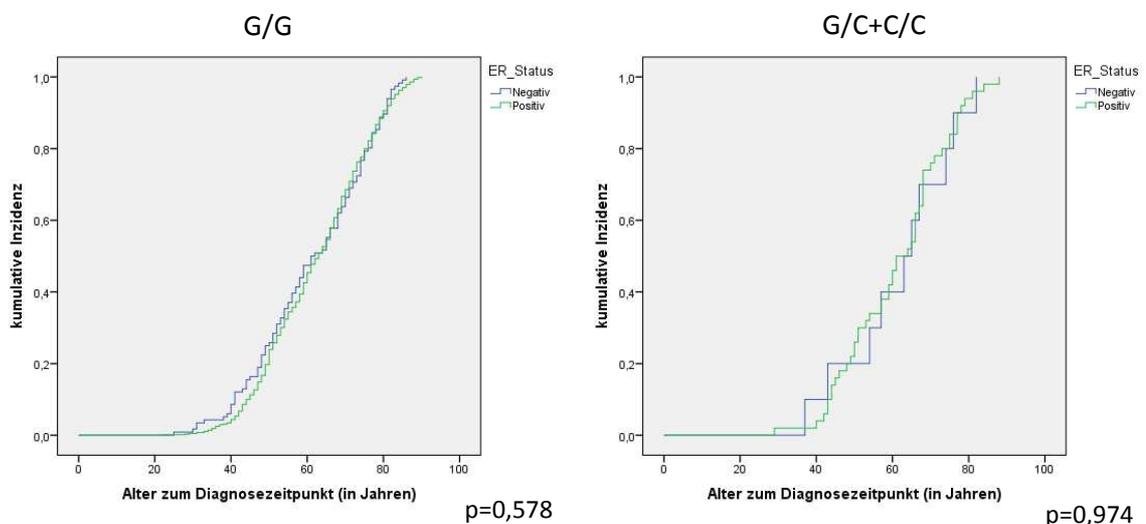


Abb. 8 Log-Rank-Test: Erkrankungsalter in Abhängigkeit von *MDM2* SNP 285 und dem Östrogenrezeptorstatus

4.3.3 Wechselwirkungen zwischen *MDM2* SNP 285 und 309 und dem Erkrankungsalter

Das C-Allel von *MDM2* SNP 285 wird als Haplotyp mit dem G-Allel des SNP 309 vererbt (Knappskog und Lonning, 2011). Die G/G-Variante in *MDM2* SNP 309 fand sich bei 96 Frauen (11,8%), unter ihnen zeigten lediglich vier Patientinnen die Variante C/C in *MDM2* SNP 285.

Ergebnisse

Das Alter zum Diagnosezeitpunkt der Frauen mit der Allelvariante C/C lag durchschnittlich bei 44,3 Jahren. Im Gegensatz dazu erkrankten Frauen mit der G/G-Variante in *MDM2* SNP 309 und den Allelvarianten G/G und G/C in *MDM2* SNP 285, im Mittel mit 62,9 bzw. 62,2 Jahren, später (siehe Tabelle 13). Das durchschnittliche Erkrankungsalter unterscheidet sich in Abhängigkeit des Polymorphismus signifikant ($p=0,031$, Varianztest). Vergleich man die Patientinnen, welche vor dem 55. Lebensjahr erkrankten, mit jenen, die ab dem 55. Lebensjahr erkrankten, unterscheiden sich die beiden Gruppen signifikant ($p=0,014$, Chi-Quadrat-Test), die Patientinnen mit der Variante C/C erkrankten alle vor dem 55. Lebensjahr (siehe Tab. 15). Der Zusammenhang zeigte sich auch im Log-Rank-Test ($p=0,000378$, siehe Abb. 9).

Tab. 13 Altersverteilung zum Diagnosezeitpunkt in Abhängigkeit von *MDM2* SNP 309 und 285: aufgeteilt nach Patientinnen mit den Variante T/T und T/G (oben) oder G/G (unten) in *MDM2* SNP 309.

MDM2 SNP 309 T/T+T/G

Allelvarianten <i>MDM2</i> SNP 285	Gesamt (n=719)	G/G (n=677)	G/C (n=42)	C/C (n=0)
Mittelwert (in Jahren)	62,4	62,3	62,6	-
jüngste Patientin (in Jahren)	25	25	29	-
älteste Patientin (in Jahren)	90	90	82	-

MDM2 SNP 309 G/G

Allelvarianten <i>MDM2</i> SNP 285	Gesamt (n=96)	G/G (n=78)	G/C (n=14)	C/C (n=4)
Mittelwert (in Jahren)	61,4	62,9	62,2	44,3
jüngste Patientin (in Jahren)	22	22	44	37
älteste Patientin (in Jahren)	88	85	88	54

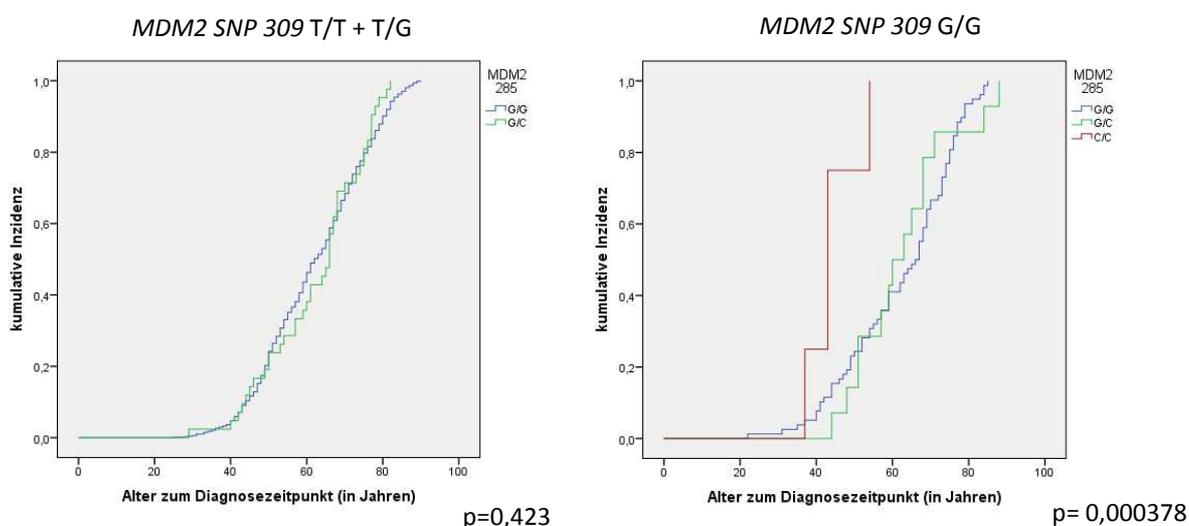


Abb. 9 Log-Rank-Test: Erkrankungsalter in Abhängigkeit von *MDM2* SNP 285 bei Patientinnen mit *MDM2* SNP 309 G/G

4.3.4 Assoziation mit dem Tumorstadium

Die Patientinnen mit dem Genotyp G/G hatten in 50,7% der Fälle einen Tumor T1, in 43,6% T2, in 4,8% T3 und in 0,6% T4. Patientinnen mit dem Genotyp C/C hatten in 75% ein Tumor T2. Der Nodalstatus unterscheidet sich ebenfalls in Abhängigkeit des Genotyps. Patientinnen mit der Variante C/C hatten in 75% keine Lymphknotenmetastasen (N0), bei Patientinnen mit dem Genotyp G/G lag in 60,8% keine lymphonodale Metastasierung vor. Der Zusammenhang ist nicht signifikant ($p=0,155$; siehe Tab. 14).

4.3.5 Assoziation mit der histologischen Differenzierung und dem Grading

Alle Patientinnen mit dem homozygoten C-Allel hatten ein invasiv duktales Mammakarzinom. Die Patientinnen mit den Genotypen G/G bzw. G/C hatten sowohl invasiv lobuläre, als auch invasiv duktales Mammakarzinome. Invasiv lobuläre Mammakarzinome haben im Vergleich mit invasiv duktales Mammakarzinomen eine schlechtere Prognose (Colleoni et al., 2012). Ebenfalls im Grading unterschieden sich die Tumoren in Abhängigkeit des Genotyps. 75% der Patientinnen mit dem Allel-Status C/C hatten ein schlecht differenziertes (G3) Karzinom, 25% ein gut differenziertes (G1) Karzinom. Kein Karzinom wurde als mäßig differenziert (G2) eingestuft. Patientinnen mit dem Genotyp G/G hatten im Gegensatz dazu nur in 25,3% der Fälle ein schlecht differenziertes (G3) Karzinom, 63,8% der Karzinome waren mäßig (G2) und 11,5% gut (G1) differenziert. In der binär logistischen Regression kann gezeigt werden, dass der Allelstatus C/C mit einer 1,7-fach erhöhten Wahrscheinlichkeit verknüpft ist (OR=1,67; $p=0,044$; 95% KI 1,014-4,813) ein schlecht differenziertes (G3) Karzinom zu entwickeln (siehe Tab. 14).

4.3.6 Zusammenhang mit den intrinsischen Subtypen

Anhand der erhobenen Daten kann keine signifikante Assoziation zwischen dem Genotyp von *MDM2* SNP 285 und den intrinsischen Subtypen des Mammakarzinoms nachgewiesen werden (siehe Tab. 15).

Ergebnisse

Tab. 14 Ergebnisse der binär-logistischen Regression bei *MDM2* SNP 285

Variablen		OR	95% Konfidenzintervall	p
Alter bei Diagnose (Cut-off 55 Jahre)	G/G	1,000		
	G/C+C/C	0,996	0,586-1,692	0,987
Primärtumor (T)	G/G	1,000		
	G/C+C/C	1,562	0,911-2,68	0,105
Nodalstatus (N)	G/G	1,000		
	G/C+C/C	1,513	0,855-2,679	0,155
Grading	G/G oder G/C	1,000		
	C/C	1,670	1,014-4,813	0,044
histologische Differenzierung	G/G	1,000		
	G/C+C/C	0,779	0,392-1,551	0,478
Lymphgefäßinvasion	G/G	1,000		
	G/C+C/C	1,551	0,808-2,979	0,187
Östrogenrezeptorstatus	G/G	1,000		
	G/C+C/C	1,102	0,543-2,235	0,788
Progesteronrezeptorstatus	G/G	1,000		
	G/C+C/C	1,260	0,725-2,191	0,412
HER2-Status	G/G	1,000		
	G/C+C/C	0,905	0,433-1,894	0,792

Tab. 15 Verteilung klinischer und pathologischer Variablen bei *MDM2* SNP 285

<i>MDM2</i> SNP 285 (n=815)				
Variablen	G/G (n=755)	G/C (n=56)	C/C (n=4)	p-Wert *
Alter				
< 55 J.	250 (33,1%)	16 (28,6%)	4 (100,0%)	
≥ 55 J.	505 (66,9%)	40 (71,4%)	0 (0,0%)	0,014
Grading				
G1	87 (11,5%)	6 (10,7%)	1 (25,0%)	
G2	477 (63,2%)	32 (57,1%)	0 (0,0%)	
G3	191 (25,3%)	18 (32,1%)	3 (75,0%)	0,087
Intrinsischer Subtyp				
Luminal-A	421 (55,8%)	30 (53,6%)	1 (25,0%)	0,447
Luminal-B	226 (29,9%)	18 (31,1%)	1 (25,0%)	0,919
HER2+	35 (4,6%)	1 (1,8%)	1 (25,0%)	0,088
Basal-like	73 (9,7%)	7 (12,5%)	1 (25,0%)	0,476

* Die Berechnung des p-Wertes erfolgte mit dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson

4.4 MDMX SNP 31826 (rs1563828)

4.4.1 Häufigkeiten der Allele

In 331 Fällen (40,6%) fand sich die Variante G/G, bei 422 Patientinnen (51,8%) war der Genotyp heterozygot. In 62 Fällen (7,6%) fand sich die Variante C/C. Die Heterozygotenhäufigkeit wird in der Literatur mit 44,0% angegeben (Zhang et al., 2012)

4.4.2 Assoziation mit dem Alter

Die Datenlage in der Literatur bezüglich dieses Polymorphismus ist widersprüchlich (Kulkarni et al., 2009; Song et al., 2012). Betrachtet man die Altersverteilung der Patientinnen zum Diagnosezeitpunkt, liegt das mittlere Erkrankungsalter der Frauen mit der Variante G/G bei 62,7 Jahre. Trägerinnen der A/A-Variante erkrankten im Mittel mit 63,3 Jahren (siehe Tab. 18). Vergleicht man die Patientinnen, die vor dem 40. Lebensjahr erkrankten, mit jenen die ab dem 40. Lebensjahr erkrankten, unterscheiden diese sich signifikant ($p=0,050$, Varianztest), die Frauen mit der Variante A/A erkrankten ab dem 40. Lebensjahr (siehe Tab. 21).

Tab. 16 Altersverteilung der Patienten zum Diagnosezeitpunkt bei MDMX SNP 31826

	Gesamt (n=815)	G/G (n=331)	G/A (n=422)	A/A (n=62)
Mittelwert (in Jahren)	62,2	62,7	61,5	63,3
jüngste Patientin (in Jahren)	22	25	22	40
älteste Patientin (in Jahren)	90	89	90	89
Spannbreite (in Jahren)	68	64	68	49

Außerdem zeigten die Patientinnen mit der Variante A/A haben gegenüber den Allelvarianten G/G und G/A eine um das 2,3-fach erhöhte Wahrscheinlichkeit ($OR=2,317$; $p=0,017$; 95% KI 1,168-4,813), dass das Erkrankungsalter nach dem 40. Lebensjahr liegt. Die Erkrankung tritt damit signifikant häufiger bei älteren (>40 Jahre) Frauen mit dem Genotyp A/A auf (siehe Tab. 20). In der Literatur wird darauf hingewiesen, dass dieser genetische Polymorphismus eine Assoziation zum Östrogenrezeptorstatus aufweist. Patientinnen mit dem A/A-Status und einem negativen Östrogenrezeptorstatus erkrankten 3,8 Jahre früher an einem Mammakarzinom, bei rein kaukasischen Frauen waren es sogar 7,5 Jahre (Kulkarni et al.,

Ergebnisse

2009). Dieser Zusammenhang fand sich ebenso. Patientinnen mit einem östrogenrezeptornegativen Mammakarzinom und dem homozygoten A-Allel erkrankten im Mittel mit 53,2 Jahren und somit 11,2 Jahre früher als Patientinnen mit dem gleichen Genotyp und einem positiven Östrogenrezeptorstatus (siehe Tab. 19). Der Unterschied ist signifikant ($p=0,025$, Varianztest).

Tab. 17 Diagnosealter in Abhängigkeit des Östrogenrezeptorstatus bei *MDMX* SNP 31826

Genotyp	Gesamt	G/G	G/A	A/A
Östrogenrezeptorstatus	positiv	positiv	positiv	positiv
	(n=699)	(n=286)	(n=357)	(n=56)
Mittelwert (in Jahren)	62,4	61,7	62,6	64,4
jüngste Patientin (in Jahren)	22	22	29	40
älteste Patientin (in Jahren)	90	90	89	89
Östrogenrezeptorstatus	negativ	negativ	negativ	negativ
	(n=126)	(n=53)	(n=67)	(n=6)
Mittelwert (in Jahren)	61,4	63,8	62,6	53,2
jüngste Patientin (in Jahren)	25	30	25	40
älteste Patientin (in Jahren)	86	83	86	72

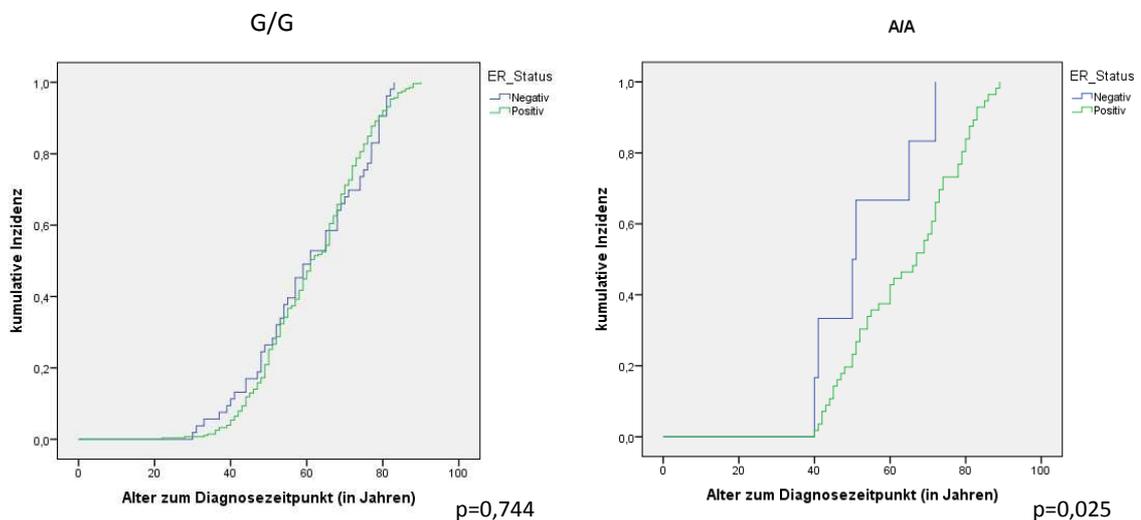


Abb. 10 Log-Rank-Test: Erkrankungsalter in Abhängigkeit von *MDMX* SNP 31826 getrennt nach dem Östrogenrezeptorstatus

4.4.3 Assoziation mit dem Tumorstadium

Zwischen den Varianten zeigten sich nur geringe Unterschiede in Bezug auf das TNM-Stadium. Patienten mit der A/A-Variante haben zum Zeitpunkt der Diagnose bereits in 40,3% (n=25) eine histologisch belegte Lymphgefäßinfiltration, in 3,2% (n=2) liegt zudem eine Veneninfiltration vor. Patienten mit der homozygoten Wildtypvariante zeigen Lymphgefäßinfiltration in 24,5% (n=87), bei 0,9% (n=3) sind die Venen durch das Karzinom infiltriert. Patientinnen mit der Variante A/A haben eine um das 1,3-fach erhöhte Wahrscheinlichkeit (OR=1,292; p=0,045; 95% KI 1,005-1,66), dass zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bereits eine Lymphgefäßinfiltration des Mammakarzinoms vorliegt (siehe Tab. 21). Die Patientinnen mit der A/A-Variante haben mit 11,3% (n=7) vergleichsweise häufig ein Nodalstadium N3, dagegen zeigen die Patientinnen mit der Variante G/G nur in 3,0% (n=10) dieses Stadium, der Zusammenhang ist nicht signifikant (p=0,618, siehe Tab. 19).

4.4.4 Assoziation mit der histologischen Differenzierung und dem Grading

Es wurden keine Assoziationen zwischen dem Genotyp und der histologischen Differenzierung oder dem Grading der Karzinome nachgewiesen (siehe Tab. 18).

Tab. 18 Ergebnisse der binär-logistischen Regression (Auswahl) bei *MDMX* SNP 31826

Variablen	Genotyp	OR	95% Konfidenzintervall	p
Alter bei Diagnose (Cut-off 40 Jahre)	G/G oder G/A	1,000		
	A/A	2,317	1,168-4,813	0,017
Primärtumor (T)	G/G oder G/A	1,000		
	A/A	1,073	0,857-1,1344	0,538
Nodalstatus (N)	G/G oder G/A	1,000		
	A/A	1,042	0,827-1,312	0,727
Lymphgefäßinfiltration	G/G oder G/A	1,000		
	A/A	1,292	1,005-1,66	0,045
Östrogenrezeptorstatus	G/G oder G/A	1,000		
	A/A	1,148	0,838-1,571	0,391

Ergebnisse

4.4.5 Zusammenhang mit den intrinsischen Subtypen

Bei der Analyse der untersuchten Proben fanden sich keine signifikanten Zusammenhänge zwischen *MDMX* SNP 31826 und den intrinsischen Subtypen des Mammakarzinoms.

Tab. 19 Verteilung klinischer und pathologischer Variablen bei *MDMX* SNP 31826

<i>MDMX</i> SNP 31826 (n=815)				
Variablen	G/G (n=331)	G/A (n=422)	A/A (n=62)	p-Wert *
Alter				
< 40 J.	17 (5,1%)	11 (2,6%)	0 (0,0%)	
≥ 40 J.	314 (94,9%)	411 (97,4%)	62 (100,0%)	0,050
Histologie				
duktal	269 (81,3%)	328 (77,7%)	50 (80,6%)	
lobulär	45 (13,6%)	69 (16,4%)	9 (14,5%)	
andere	17 (5,1%)	25 (5,9%)	3 (4,8%)	0,823
Tumorgröße				
T1	170 (51,4%)	224 (53,1%)	26 (41,9%)	
T2	145 (43,8%)	173 (41,0%)	31 (50,0%)	
T3	13 (3,9%)	22 (5,2%)	4 (6,5%)	
T4	3 (0,9%)	3 (0,7%)	1 (1,6%)	0,675
Nodalstatus				
N0	205 (61,9%)	260 (61,6%)	36 (58,1%)	
N1	97 (29,3%)	118 (28,0%)	16 (25,8%)	
N2	19 (5,7%)	29 (6,9%)	3 (4,8%)	
N3	10 (3,0%)	15 (3,6%)	7 (11,3%)	0,109
Grading				
G1	39 (11,8%)	45 (10,7%)	10 (16,1%)	
G2	205 (61,9%)	264 (62,6%)	40 (64,5%)	
G3	87 (26,3%)	113 (26,8%)	12 (19,4%)	0,618
Lymphgefäßinfiltration				
L0	256 (75,5%)	308 (72,6%)	37 (59,7%)	
L1	83 (24,5%)	116 (27,4%)	25 (40,3%)	0,047
ER-Status				
positiv	278 (84,0%)	355 (84,1%)	56 (90,3%)	
negativ	53 (16,0%)	67 (15,9%)	6 (9,7%)	0,423
Intrinsischer Subtyp				
Luminal-A	172 (52,0%)	239 (56,6%)	41 (66,1%)	0,094
Luminal-B	111 (33,5%)	119 (28,2%)	15 (24,2%)	0,164
HER2+	20 (6,0%)	16 (12,3%)	9 (3,8%)	0,405
Basal-like	28 (8,5%)	48 (11,4%)	5 (8,1%)	0,363

* Die Berechnung des p-Wertes erfolgte mit dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson

4.5 MDMX SNP 34091 (rs4245739)

4.5.1 Häufigkeit der Allele

Von den 815 untersuchten Frauen fand sich bei 426 (52,3 %) die Variante A/A, in 332 Fällen (40,7 %) die Variante A/C. Bei 57 Patientinnen (7,0 %) ergab die Sequenzierung die Variante C/C. Die zuletzt genannte Variante ist mit einem reduzierten Erkrankungsrisiko für Non-Hodgkin-Lymphome, Lungen- und Prostatakarzinome sowie Brustkrebs assoziiert (Gansmo et al., 2015). Die Allelverteilung entspricht den Angaben der Literatur (Gansmo et al., 2015).

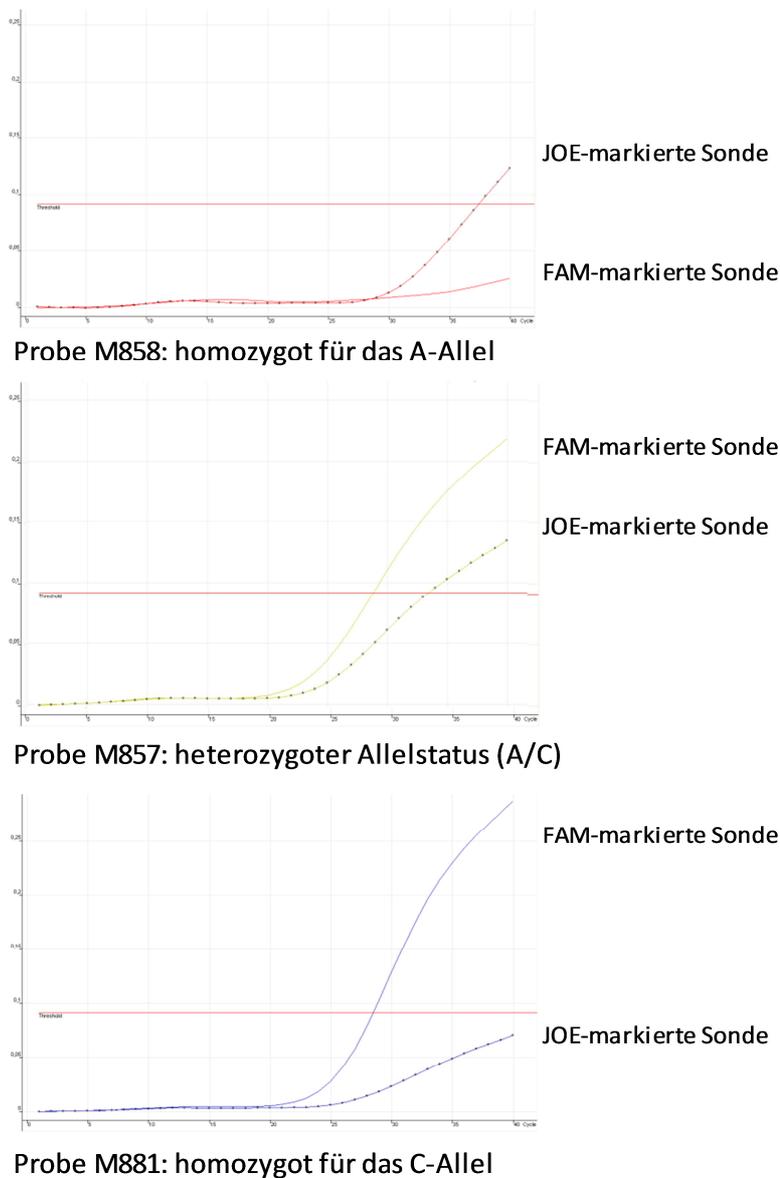


Abb. 11 Genotypisierung von *MDMX* SNP 34091 mittels Realtime-PCR unter Verwendung von Taqman SNP Genotyping Assays (rs4245739) der Firma Applied Biosystems, USA (siehe Tab. 7)

4.5.2 Assoziation mit dem Alter

Die Patientinnen mit der Variante A/A waren zum Diagnosezeitpunkt durchschnittlich 62,4 Jahre alt. Patienten mit dem Genotyp C/C erkrankten im Mittel 2,2 Jahre später. Patientinnen mit der Variante A/C waren zum Diagnosezeitpunkt im Mittel 62,0 Jahre alt (siehe Tab. 20).

Tab. 20 Altersverteilung der Patienten zum Diagnosezeitpunkt bei *MDMX* SNP 34091

	Gesamt (n=815)	A/A (n=426)	A/C (n=332)	C/C (n=57)
Mittelwert (in Jahren)	62,2	62,4	62,0	64,6
jüngste Patientin (in Jahren)	22	29	22	29
älteste Patientin (in Jahren)	90	89	90	89
Spannbreite (in Jahren)	68	60	68	60

Das Erkrankungsalter unterscheidet sich in Abhängigkeit des Genotyps bei östrogenrezeptorpositiven Mammakarzinomen um 2,5 Jahre. Patientinnen mit dem Wildtypallel A/A erkrankten bereits mit 62,6 Jahren. Patientinnen mit einem östrogenrezeptornegativen Mammakarzinom und der Allelvariante A/A erkrankten im Mittel mit 59,3 Jahren, Patientinnen mit der Variante C/C sind zum Zeitpunkt der Diagnose im Mittel 61,8 Jahre. Patientinnen mit einem Alter zum Diagnosezeitpunkt unter 60 Jahren und den Allelvarianten A/C und C/C haben gegenüber der Allelvariante A/A eine um den Faktor 0,5 verminderte Wahrscheinlichkeit (OR=0,546; p=0,042; 95% KI 0,304-0,978) ein östrogenrezeptorpositives Mammakarzinom zu entwickeln (siehe Tab. 23). Das C-Allel ist bei Patientinnen unter 60 Jahren zum Diagnosezeitpunkt mit dem östrogenrezeptornegativen Mammakarzinom assoziiert. Untersucht man den Zusammenhang mittels Log-Rank-Test, ist der beobachtete Unterschied nicht signifikant, wenn sowohl prä- als auch postmenopausale Patientinnen gemeinsam betrachtet werden. (siehe Abb. 12). Auffällig ist allerdings, dass Patientinnen mit dem Genotyp C/C um das 40. Lebensjahr und jenseits des 60. Lebensjahres erkrankten. Keine Patientin erkrankte mit einem Alter zwischen 45 und 65 Jahren. Die prämenopausalen Frauen mit dem Genotyp C/C und einem negativen Östrogenrezeptorstatus (n=3) erkrankten signifikant (p=0,001, Log-Rank-Test) früher (siehe Abb. 12).

Ergebnisse

Tab. 21 Diagnosealter in Abhängigkeit des Östrogenrezeptorstatus bei *MDMX* SNP 34091

Genotyp	Gesamt	A/A	A/C	C/C
Östrogenrezeptorstatus	positiv	Positiv	positiv	positiv
	(n=699)	(n=359)	(n=291)	(n=49)
Mittelwert (in Jahren)	62,4	62,6	61,6	65,1
jüngste Patientin (in Jahren)	22	22	29	29
älteste Patientin (in Jahren)	90	90	89	89
Östrogenrezeptorstatus	negativ	negativ	negativ	negativ
	(n=126)	(n=71)	(n=47)	(n=8)
Mittelwert (in Jahren)	61,4	59,3	64,5	61,8
jüngste Patientin (in Jahren)	25	25	40	39
älteste Patientin (in Jahren)	86	86	85	82

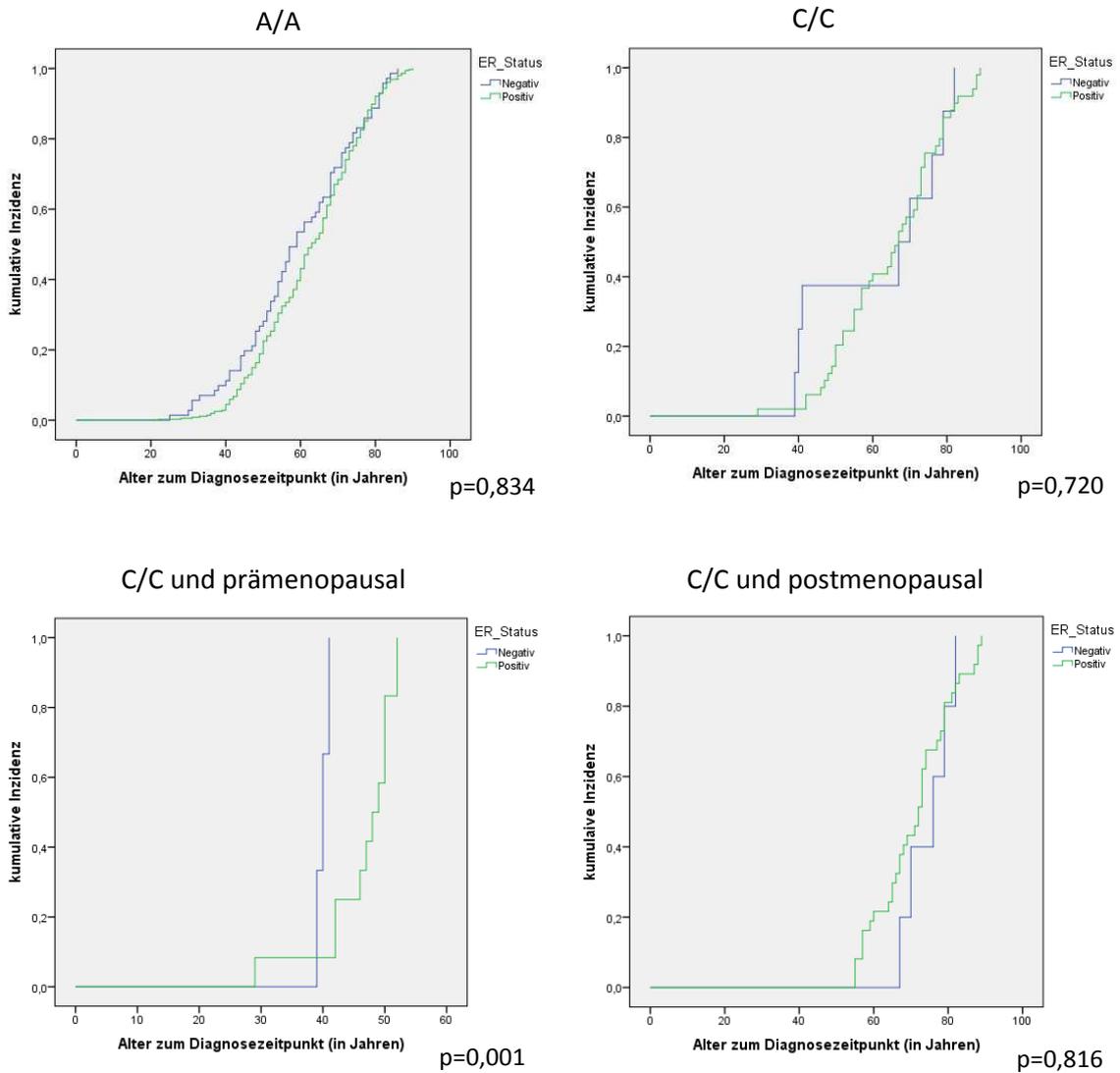


Abb. 12 Log-Rank-Test: Erkrankungsalter bei Patientinnen mit der Variante C/C in Abhängigkeit des Östrogenrezeptorstatus (oben) und des Menopausestatus (unten)

Ergebnisse

Darüber hinaus untersuchten wir den Zusammenhang zwischen dem HER2-Status der Mammakarzinome und dem Genotyp von *MDMX* SNP 34091 in Bezug auf das Erkrankungsalter. Zum einen zeigte sich, dass Patientinnen mit dem Genotyp C/C und einem positiven HER2-Status in einem auffällig hohen Lebensalter erkrankten, die jüngste Patientin war 67 Jahr, die älteste 76 Jahre. Die Frauen mit dem Genotyp C/C sind im Mittel 13,5 Jahre älter als Patientinnen mit der Allelvariante A/A (siehe Tab. 22). Ferner betrachteten wir Patientinnen mit dem Genotyp A/A getrennt nach dem HER2-Status in Bezug auf das mittlere Erkrankungsalter. Zu beachten ist, dass hierzu alle Patientinnen mit einem positiven HER2-Status einberechnet wurden, im Gegensatz dazu gingen bei der Betrachtung der intrinsischen Subtypen lediglich Patientinnen mit der Kombination aus einem positiven HER2-Status und einem negativen ER- und PR-Status sowie einer schlechten Differenzierung (G3) ein. Patientinnen mit einem positiven HER2-Status erkrankten im Mittel mit 59,7 Jahren, sie sind damit durchschnittlich 2,9 Jahre jünger als Patientinnen mit einem negativen HER2-Status (siehe Tab. 22). Unter Patientinnen mit der homozygoten C-Variante beträgt der Unterschied 7,5 Jahre. Patientinnen mit positivem HER2-Status und der Allelvariante A/A erkranken signifikant früher ($p=0,007$, Varianztest).

Tab. 22 Übersicht zum Erkrankungsalter in Abhängigkeit des HER2-Status bei *MDMX* SNP 34091

Genotyp	Gesamt	A/A	A/C	C/C
HER2-Status	positiv	Positiv	positiv	positiv
	(n=699)	(n=359)	(n=291)	(n=49)
Mittelwert (in Jahren)	59,7	58,2	60,9	71,7
jüngste Patientin (in Jahren)	28	22	29	29
älteste Patientin (in Jahren)	85	90	89	89
HER2-Status	negativ	Negativ	negativ	negativ
	(n=126)	(n=71)	(n=47)	(n=8)
Mittelwert (in Jahren)	62,6	62,8	62,2	64,2
jüngste Patientin (in Jahren)	22	28	39	67
älteste Patientin (in Jahren)	90	83	85	76

4.5.3 Assoziation mit dem Tumorstadium

Hinsichtlich der Größe des Primärtumors (T) zeigten sich Unterschiede zwischen den Genotypen. So haben Patienten der Wildtypvariante A/A häufiger ein Stadium T1 (55,6%), die Stadien T2 (39,2%) und T3 (4,0%) sind seltener im Vergleich zu Patientinnen mit der Variante

Ergebnisse

C/C. Bei diesen Patientinnen findet man in 42,1% der Fälle ein Stadium T1, in 49,1% ein Stadium T2. Das Stadium T3 hatten 8,8% der Frauen. Patientinnen mit der Variante C/C hatten zum Diagnosezeitpunkt signifikant öfter ein lokal fortgeschrittenes Mammakarzinom (OR=1,412; $p=0,014$, 95% KI 1,071-1,86). Im Gegensatz dazu ist die Variante A/A nicht mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit eines lokal fortgeschrittenen Karzinoms assoziiert (OR=0,708, $p=0,014$, 95% KI 0,538- 0,934).

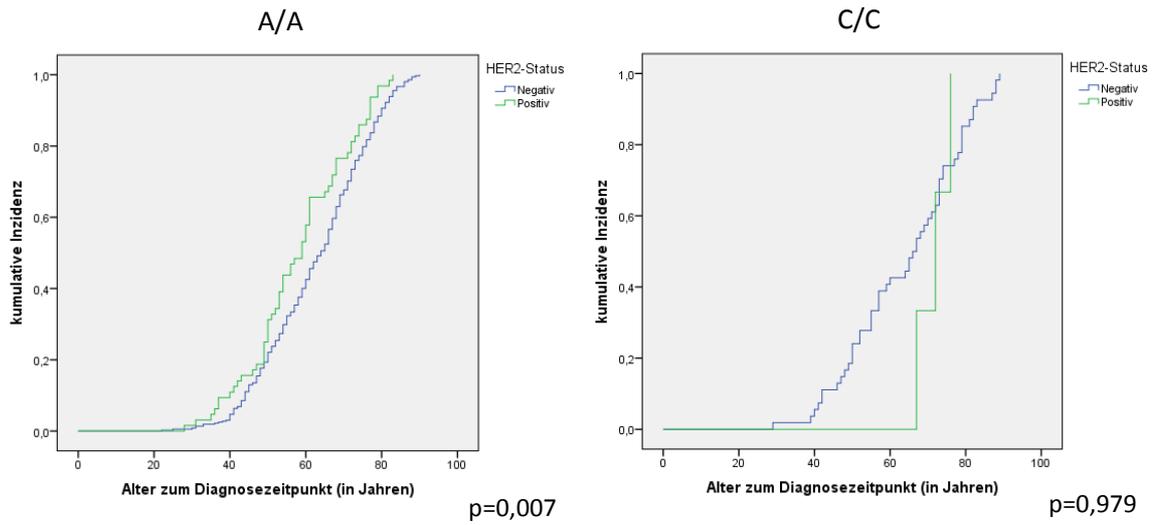


Abb. 13 Log-Rank-Test: Erkrankungsalter in Abhängigkeit von *MDMX* SNP 34091 getrennt nach dem HER2-Status

4.5.4 Assoziation mit der histologischen Differenzierung und dem Grading

In Abhängigkeit des genetischen Polymorphismus zeigten sich nur geringe Unterschiede hinsichtlich der histologischen Differenzierung. Es fand sich zudem keine signifikante Assoziation zwischen dem SNP und dem Grading (OR=0,752; $p=0,093$; 95% KI 0,540-1,049; siehe Tab. 25).

4.5.5 Assoziation mit dem Hormonrezeptorstatus

Das C-Allel ist mit dem östrogenrezeptornegativen Mammakarzinomen assoziiert (Garcia-Closas et al., 2013), das Brustkrebsrisiko ist erhöht (Gansmo et al., 2015). Wie bereits in 4.5.2 beschrieben, unterscheidet sich das Erkrankungsalter zum Diagnosezeitpunkt in Abhängigkeit des Östrogenrezeptorstatus in der untersuchten Gruppe. Patientinnen mit einem

Ergebnisse

östrogenrezeptornegativen Mammakarzinom und dem Allelstatus A/A erkrankten im Mittel 2,5 Jahre früher als Patientinnen mit dem Allelstatus C/C. Patientinnen mit der homozygoten C-Variante und einem Erkrankungsalter unter 60 Jahren haben eine um den Faktor 0,5 verminderte Wahrscheinlichkeit (OR=0,546; p=0,042; 95% KI 0,304-0,978) ein östrogenrezeptorpositives Mammakarzinom zu entwickeln, Patientinnen mit der Variante C/C haben signifikant öfter ein Progesteronrezeptor-positives Mammakarzinom (Chi-Quadrat-Test, siehe Tab. 26). Außerdem zeigten diese Patientinnen eine um das 1,5-fach erhöhte Wahrscheinlichkeit ein Progesteronrezeptor-positives Mammakarzinom zu entwickeln (OR=1,452, p=0,016; 95% KI 1,073-1,964). Die bereits beschriebenen Assoziationen zwischen der Größe des Primärtumors und der Allelkonfigurationen zeigt sich auch in Abhängigkeit des Östrogenrezeptorstatus. Patientinnen mit einem östrogenrezeptorpositiven Mammakarzinom, welche zum Diagnosezeitpunkt jünger als 60 Jahre waren, haben signifikant häufiger einen fortgeschrittenen Primärtumor (OR=1,774, p= 0,001, 95% KI 1,269-2,478).

Tab. 23 Ergebnisse der binär-logistischen Regression bei MDMX SNP 34091

Variablen		OR	95% Konfidenzintervall	p
Alter bei Diagnose (Cut-off 40 Jahre)	A/A;A/C	1,000		
	C/C	1,672	0,762-3,668	0,2
Alter bei Diagnose (Cut-off 55 Jahre)	A/A;A/C	1,000		
	C/C	0,954	0,712-1,277	0,751
Primärtumor (T)	A/A;A/C	1,000		
	C/C	1,412	1,071-1,860	0,014
Nodalstatus (N)	A/A;A/C	1,000		
	C/C	1,101	0,830-1,460	0,503
Grading	A/A;A/C	1,000		
	C/C	0,752	0,540-1,049	0,093
histologische Differenzierung	A/A;A/C	1,000		
	C/C	1,168	0,794-1,718	0,429
Östrogenrezeptorstatus bei unter 60-jährigen	A/A	1,000		
	A/C+C/C	0,546	0,304-0,978	0,042
Progesteronrezeptorstatus	A/A;A/C	1,000		
	C/C	1,452	1,073-1,964	0,016
HER2-Status	A/A;A/C	1,000		
	C/C	0,815	0,5461,217	0,317

Ergebnisse

Tab. 24 Ergebnisse der binär-logistischen Regression bei östrogenrezeptorpositivem Mammakarzinom

Variablen		OR	95% Konfidenzintervall	p
Alter bei Diagnose (Cut-off 55 Jahre)	A/A;A/C	1,000		
	C/C	1,166	0,846-1,606	0,349
Primärtumor (T)	A/A;A/C	1,000		
	C/C	1,547	1,147-2,087	0,004
Nodalstatus (N)	A/A;A/C	1,000		
	C/C	1,160	0,853-1,576	0,344
Grading	A/A;A/C	1,000		
	C/C	0,683	0,441-1,056	0,087
Histologische Differenzierung	A/A;A/C	1,000		
	C/C	1,057	0,714-1,566	0,782
HER2-Status	A/A;A/C	1,000		
	C/C	0,862	0,533-1,394	0,544

4.5.6 Zusammenhang mit den intrinsischen Subtypen

Mammakarzinome mit dem intrinsischen Subtyp Luminal-A treten signifikant ($p=0,05$, Chi-Quadrat-Test) öfter bei Patientinnen auf, die Trägerin des C-Allels sind (siehe Tab. 26). Die Wahrscheinlichkeit eines Luminal-A-Mammakarzinom ist um das 1,4-fache erhöht, wenn die Patientin Trägerin des C-Allels ist (OR=1,412; $p=0,015$; 95% KI 1,069-1,864). Luminal-B-Mammakarzinome treten vergleichsweise oft bei Patientinnen mit dem Genotyp A/A auf (siehe Tab. 26). Die Wahrscheinlichkeit einen Tumor des Subtyps Luminal-B zu entwickeln ist bei Frauen mit der Variante A/A um das 1,4-fache erhöht (OR=0,703; $p=0,023$; 95% KI 0,52; 0,952). Bei Mammakarzinomen der Subtypen HER2-positiv und Basal-like können keine signifikanten Zusammenhänge nachgewiesen werden.

Tab. 25 Zusammenhänge des intrinsischen Subtyps und *MDMX* SNP 34091

Variablen		OR	95% Konfidenzintervall	p
Luminal-A	A/A	1,000		
	A/C+C/C	1,412	1,069-1,864	0,015
Luminal-B	A/C+C/C	1,000		
	A/A	1,422	1,051-1,924	0,023
HER2-positiv	A/A	1,000		
	A/C+C/C	0,737	0,376-1,441	0,372
Basal-like	A/A	1,000		
	A/C+C/C	1,019	0,644-1,613	0,937

Ergebnisse

Des Weiteren untersuchten wir, ob in Abhängigkeit von *MDMX* SNP 34091 und den intrinsischen Subtypen einen Einfluss auf das Erkrankungsalter besteht. Patientinnen mit der Variante C/C und einem Mammakarzinom vom Subtyp Luminal-B erkrankten im Vergleich später. Das durchschnittliche Alter zum Diagnosezeitpunkt bei Patientinnen mit dem Genotyp A/A und Luminal-B-Mammakarzinomen war 66,9 Jahren, Frauen mit der homozygoten C-Variante erkrankten im Mittel 3,0 Jahre früher. Der Zusammenhang ist jedoch nicht signifikant ($p=0,063$, Log-Rank-Test, siehe Abb. 14).

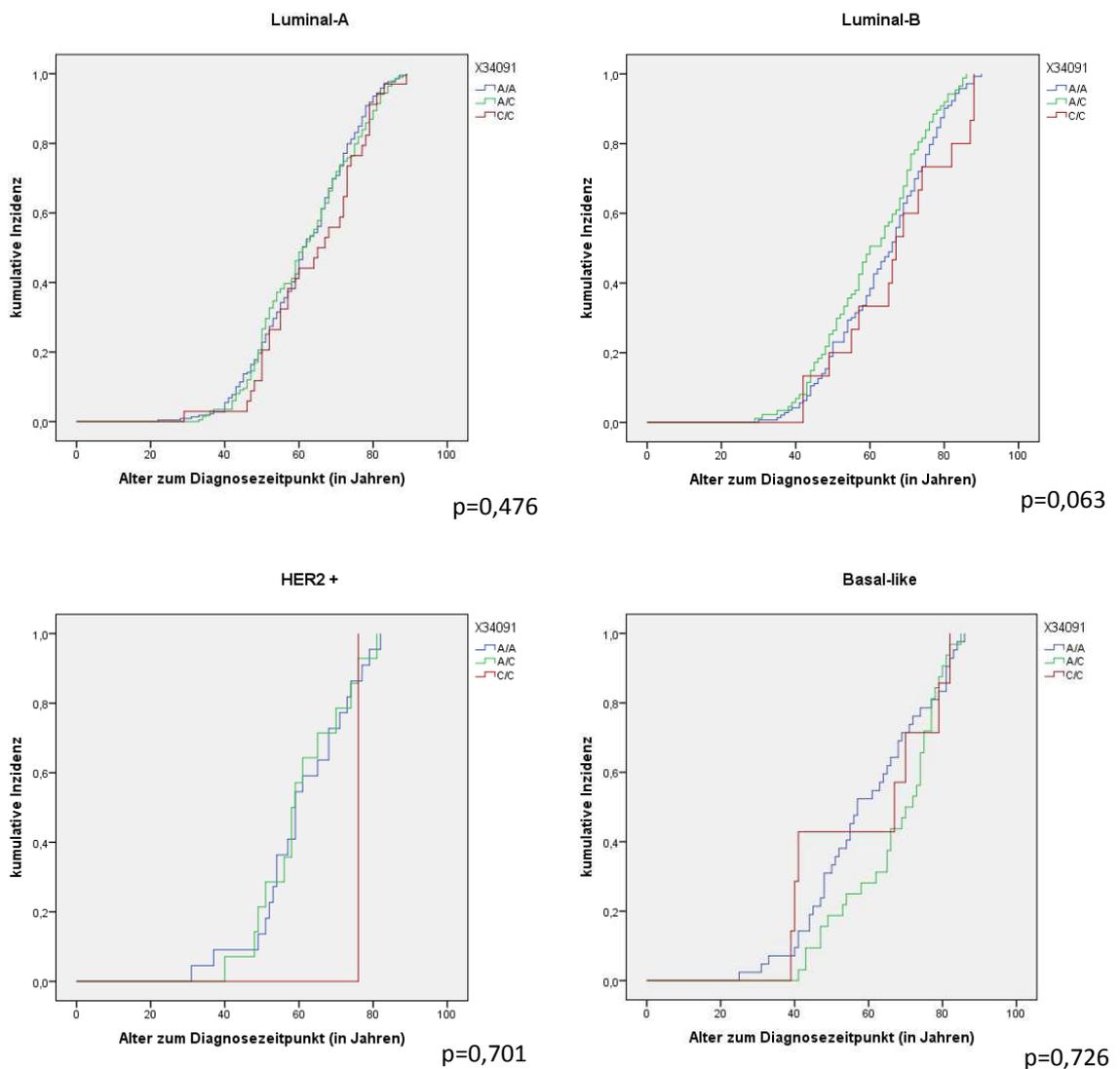


Abb. 14 Log-Rank-Test: Erkrankungsalter in Abhängigkeit der intrinsischen Subtypen des Mammakarzinoms

Ergebnisse

Tab. 26 Verteilung klinischer und pathologischer Variablen bei *MDMX* SNP 34091

<i>MDMX</i> SNP 34091 (n=815)				
Variablen	A/A (n=426)	A/C (n=332)	C/C (n=57)	p-Werte *
Alter				
< 55 J.	139 (32,6%)	116 (34,9%)	15 (26,3%)	
≥ 55 J.	287 (67,4%)	216 (65,1%)	42 (73,7%)	0,420
Histologie				
duktal	346 (81,2%)	256 (77,1%)	45 (78,9%)	
lobulär	61 (14,3%)	53 (16,0%)	9 (15,8%)	
andere	19 (4,5%)	23 (6,9%)	3 (5,3%)	0,589
Tumorgröße				
T1	237 (55,6%)	159 (47,9%)	24 (42,1%)	
T2	167 (39,2%)	154 (46,4%)	28 (49,1%)	
T3	17 (4,0%)	17 (5,1%)	5 (8,8%)	
T4	5 (1,2%)	2 (0,6%)	0 (0,0%)	0,133
Nodalstatus				
N0	267 (62,7%)	201 (60,5%)	33 (57,9%)	
N1	116 (27,2%)	99 (29,8%)	16 (28,1%)	
N2	31 (7,3%)	17 (5,1%)	3 (5,3%)	
N3	12 (2,8%)	15 (4,5%)	5 (8,8%)	0,300
Grading				
G1	42 (9,9%)	43 (13,0%)	9 (15,8%)	
G2	271 (63,6%)	205 (61,7%)	33 (57,9%)	
G3	113 (26,5%)	84 (25,3%)	15 (26,3%)	0,570
ER-Status				
positiv	355 (83,3%)	285 (85,8%)	49 (86,0%)	
negativ	71 (16,7%)	47 (14,2%)	8 (14,0%)	0,608
PR-Status				
positiv	281 (66,0%)	247 (74,4%)	40 (70,2%)	
negativ	145 (34,0%)	85 (25,6%)	17 (29,8%)	0,042
Intrinsischer Subtyp				
Luminal-A	219 (51,4%)	199 (59,9%)	34 (59,6%)	0,050
Luminal-B	143 (33,6%)	82 (26,2%)	15 (26,3%)	0,074
HER2+	22 (5,2%)	14 (4,2%)	1 (1,8%)	0,476
Basal-like	42 (9,9%)	32 (9,6%)	7 (12,3%)	0,825

* Die Berechnung des p-Wertes erfolgte mit dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson

4.6 LGR6 rs6678914

4.6.1 Häufigkeit der Allele

Für *LGR6* rs6678914 existieren die Genotypen A/A, A/G und G/G. In den untersuchten Mammakarzinomen wurde bei 16,8% (n=137) der Genotyp A/A ermittelt, bei 51,4% (n=419) der Genotyp A/G und in 31,8% der Fälle (n=259) der Genotyp G/G. In der Literatur wird das seltenere A-Allel mit einer Häufigkeit bis 31,99% angegeben (NCBI-Datenbank, 2016).

4.6.2 Assoziation mit dem Alter

Das durchschnittliche Erkrankungsalter bei Patientinnen mit dem Genotyp G/G lag bei 61,8 Jahren, Patientinnen mit der Variante A/A erkrankten im Mittel mit 63,2 Jahren (siehe Tab. 27). In Abhängigkeit des Östrogenrezeptorstatus unterscheidet sich das durchschnittliche Alter zum Zeitpunkt der Diagnose bei Patientinnen mit dem Genotyp A/A nicht signifikant. Patientinnen mit der Variante G/G und einem negativen Östrogenrezeptorstatus erkrankten im Mittel mit 58,5 Jahren. Ist der Östrogenrezeptorstatus positiv, erkrankten sie durchschnittlich 4,1 Jahre später (siehe Tab. 28).

Tab. 27 Altersverteilung der Patienten zum Diagnosezeitpunkt bei *LGR6* rs6678914

	Gesamt (n=815)	G/G (n=426)	A/C (n=332)	A/A (n=57)
Mittelwert (in Jahren)	62,2	61,8	62,1	63,2
jüngste Patientin (in Jahren)	22	29	22	25
älteste Patientin (in Jahren)	90	89	90	88
Spannbreite (in Jahren)	68	60	68	63

Die Unterschiede in Bezug auf das mittlere Erkrankungsalter, bei Patienten mit dem Genotyp G/G, in Abhängigkeit des Östrogenrezeptorstatus waren nicht signifikanter ($p=0,076$, Log-Rank-Test). Bei Patienten mit dem Genotyp A/A kann ebenfalls kein Effekt nachgewiesen werden (siehe Abb. 15). Betrachtet man das Patientenkollektiv getrennt nach Patientinnen, die jünger als 60 Jahre waren und Patientinnen, welche mindestens 60 alt waren, kann gezeigt werden, dass die Patientinnen mit dem Genotyp A/A im Vergleich mit den Varianten G/G und G/A

Ergebnisse

signifikant öfter ab dem 60. Lebensjahr erkrankten (siehe Tab. 29). Die Wahrscheinlichkeit ist um das 1,8-fache erhöht (OR=1,761; $p=0,036$; 95% KI 1,038-2,988).

Tab. 28 Übersicht zum Erkrankungsalter in Abhängigkeit des ER-Status und *LGR6* rs6678914

Genotyp	Gesamt	G/G	G/A	A/A
Östrogenrezeptorstatus	positiv	positiv	positiv	positiv
	(n=699)	(n=286)	(n=357)	(n=56)
Mittelwert (in Jahren)	62,4	62,6	61,9	63,6
jüngste Patientin (in Jahren)	22	29	22	31
älteste Patientin (in Jahren)	90	89	90	88
Östrogenrezeptorstatus	negativ	negativ	negativ	negativ
	(n=126)	(n=53)	(n=67)	(n=6)
Mittelwert (in Jahren)	61,4	58,5	63,5	62,6
jüngste Patientin (in Jahren)	25	30	31	25
älteste Patientin (in Jahren)	86	85	86	82

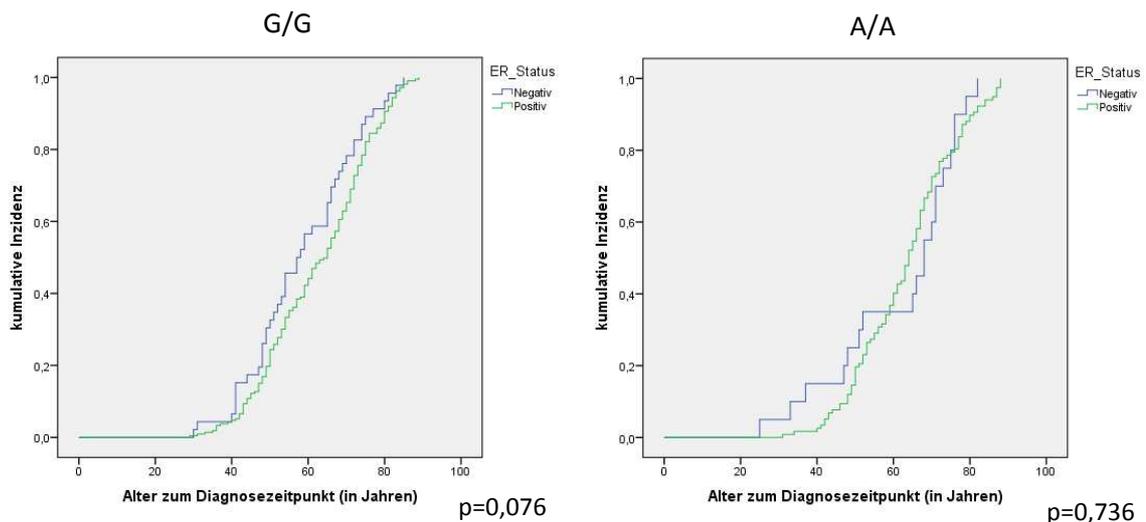


Abb. 15 Log-Rank-Test: Erkrankungsalter in Abhängigkeit von *LGR6* rs6678914 getrennt nach dem Östrogenrezeptorstatus

4.6.3 Assoziation mit dem Tumorstadium

Hinsichtlich der Größe des Primärtumors (T) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Jedoch fanden sich Zusammenhänge zwischen dem Genotyp und der lymphnodalen Metastasierung, Patientinnen mit dem Genotyp A/A zeigen in 56,9% der Fälle zum Diagnosezeitpunkt keine Lymphknotenmetastasierung. Patientinnen mit der Variante G/G hatten in 67,2% noch keine Lymphknotenmetastasen (siehe Tab. 30). Patientinnen mit dem Genotyp G/A und A/A haben um das 1,4-fache erhöhte Wahrscheinlichkeit, dass zum

Ergebnisse

Diagnosezeitpunkt bereits eine lymphonodale Metastasierung erfolgt ist (OR=1,444; $p=0,020$; 95% KI 1,060-1,968).

4.6.4 Assoziation mit der histologischen Differenzierung und dem Grading

Es zeigten sich keine Assoziationen mit der histologischen Differenzierung und dem Grading.

4.6.5 Assoziation mit dem Hormonrezeptorstatus

Für LGR6 rs667814 wurde eine Assoziation mit östrogenrezeptornegativen Mammakarzinomen beschrieben (Garcia-Closas et al., 2013). Bei den untersuchten Patientinnen ist der Polymorphismus nicht signifikant öfter bei östrogenrezeptornegativen Mammakarzinomen nachweisbar (siehe Tab. 29).

Tab. 29 Ergebnisse der binär-logistischen Regression bei LGR6 rs6678914

Variablen	Genotyp	OR	95% Konfidenzintervall	p
Alter bei Diagnose (Cut-off 60 Jahre)	G/G	1,000		
	G/A+A/A	1,761	1,038-2,988	0,036
Primärtumor (T)	G/G	1,000		
	G/A+A/A	1,035	0,771-1,391	0,818
Nodalstatus (N)	G/G	1,000		
	G/A+A/A	1,444	1,060-1,968	0,020
Grading	G/G	1,000		
	G/A+A/A	0,780	0,561-1,085	0,139
histologische Differenzierung	G/G	1,000		
	G/A+A/A	1,240	0,080-1,903	0,324
Lymphgefäßinfiltration	G/G	1,000		
	G/A+A/A	1,055	0,757-1,471	0,753
Östrogenrezeptorstatus	G/G	1,000		
	G/A+A/A	1,285	0,864-1,911	0,216
Progesteronrezeptorstatus	G/G	1,000		
	G/A+A/A	1,157	0,842-1,590	0,368
HER2-Status	G/G	1,000		
	G/A+A/A	1,096	0,711-1,688	0,678

Ergebnisse

4.6.6 Zusammenhang mit den intrinsischen Subtypen

Anhand der erhobenen Daten konnten keine signifikanten Assoziationen zwischen dem Genotyp von *LGR6* rs6678914 und den intrinsischen Subtypen des Mammakarzinoms nachgewiesen werden.

Tab. 30 Verteilung klinischer und pathologischer Variablen bei *LGR6* rs6678914

<i>LGR6</i> rs6678914 (n=815)				
Variablen	G/G (n=259)	G/A (n=419)	A/A (n=137)	p-Wert *
Alter				
< 55 J.	93 (35,9%)	137 (32,7%)	40 (29,2%)	0,388
≥ 55J.	166 (64,1%)	282 (67,3%)	97 (70,8%)	
Histologie				
duktal	208 (80,3%)	332 (79,2%)	107 (78,1%)	0,700
lobulär	34 (13,1%)	65 (15,5%)	24 (17,5%)	
andere	17 (6,6%)	22 (5,3%)	6 (4,4%)	
Tumorgröße				
T1	135 (52,1%)	222 (53,0%)	63 (46,0%)	0,601
T2	111 (42,9%)	171 (40,8%)	67 (48,9%)	
T3	11 (4,2%)	21 (5,0%)	7 (5,1%)	
T4	2 (0,8%)	5 (1,2%)	0	
Nodalstatus				
N0	174 (67,2%)	249 (59,4%)	78 (56,9%)	0,305
N1	63 (24,3%)	124 (29,6%)	44 (32,1%)	
N2	16 (6,2%)	27 (6,4%)	8 (5,8%)	
N3	6 (2,3%)	19 (4,5%)	7 (5,1%)	
Grading				
G1	32 (12,4%)	44 (10,5%)	18 (13,1%)	0,280
G2	151 (58,3%)	277 (66,1%)	81 (59,1%)	
G3	76 (29,3%)	98 (23,4%)	38 (27,7%)	
ER-Status				
positiv	213 (82,2%)	359 (85,7%)	117 (85,4%)	0,462
negativ	46 (17,8%)	60 (14,3%)	20 (14,6%)	
Intrinsischer Subtyp				
Luminal-A	138 (53,3%)	239 (57,0%)	75 (54,7%)	0,622
Luminal-B	77 (29,7%)	125 (29,8%)	43 (31,4%)	0,933
HER2+	15 (5,8%)	16 (3,8%)	6 (4,4%)	0,485
Basal-like	29 (11,2%)	39 (9,3%)	13 (9,5%)	0,713

* Die Berechnung des p-Wertes erfolgte mit dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson

5. Diskussion

5.1 Die genetischen Ursachen des Mammakarzinoms

Hereditäre Faktoren sind von zentraler Bedeutung für die Entstehung eines Mammakarzinoms (Vasema et al., 2015, Scalia-Wilbur et al., 2016). Besonders die Tumorsuppressorgene *BRCA1* und *BRCA2* sind intensiv untersucht wurden, die beiden Gene werden mit der Reparatur von DNA-Schäden und der Stabilität der Chromosomen in Verbindung gebracht (Hall et al., 1990; Scalia-Wilbur et al., 2016, Venkitaraman 2001). Trägerinnen einer Mutation des *BRCA1*-Gens entwickeln in bis zu 80% ein invasives Mammakarzinom, gehäuft erkranken die Patientinnen an einem Ovarialkarzinom (Holinski-Feder et al, 1998). Daneben treten Mammakarzinome im Rahmen des Li-Fraumeni-, Cowden- und Peutz-Jeghers-Syndroms auf (Böcker et al., 2012; Scalia-Wilbur et al., 2016).

Heute sind viele weitere genetische Veränderungen bekannt, die bei insgesamt geringerer Penetranz an der Entwicklung eines Mammakarzinoms beteiligt sind. Ihre Entdeckung war erst in Folge verbesserter Sequenziermethoden möglich (Scalia-Wilbur et al., 2016). Zu diesen Varianten werden die Einzelnukleotid-Polymorphismen gezählt (Mavaddat et al., 2015), schätzungsweise befinden sich über sieben Millionen SNPs im menschlichen Genom (Easton et al., 2007). Sie machen mehr als 90% der Variationen des humanen Genoms aus und sind sowohl in kodierenden als auch nicht kodierenden Bereichen der DNA lokalisiert (Schaaf und Zschocke, 2008). Die Bedeutung dieser genetischen Varianten wird von einigen Autoren eher gering eingestuft und als Ursache der teils widersprüchlichen Ergebnisse in Bezug auf die Entwicklung und die Prognose von malignen Erkrankungen diskutiert (Bojesen und Nordestgaard, 2008). Dennoch sind SNPs eine Ursache für die individuell unterschiedliche Suszeptibilität für das Auftreten bestimmter Erkrankungen (Mühlhardt, 2009a).

Der Einfluss von Einzelnukleotid-Polymorphismen auf die Entwicklung von Malignomen wurde insbesondere für die genetischen Varianten des p53-Pathway beschrieben (Grochola et al., 2010). Viele der bisher publizierten Studien, welche sich mit den Einzelnukleotid-Polymorphismen in *TP53*, *MDM2* und *MDMX* befassten, basierten auf einem Vergleich des Erkrankungsalters und der Überlebensdauer der Patientinnen in Abhängigkeit des genetischen Polymorphismus (Al-Quasem et al., 2011, Silwal-Pandit et al., 2014, Xu et al., 2008, Zhang et al., 2012). Weitere Arbeiten untersuchten die Häufigkeiten der genetischen Varianten unter Krebspatienten im Vergleich mit einer gesunden Kontrollgruppe (Bond et al., 2006; Johnson et al., 2007; Nunobiki et al., 2009). Ziel dieser Arbeit war es, Assoziationen zwischen dem Erkrankungsalter und den Varianten der SNPs zu untersuchen. Hierzu wurden neben den

bereits mehrfach untersuchten Polymorphismen in *TP53* und *MDM2* die SNPs in *MDMX* und *LGR6* analysiert. Insbesondere die Einzelnukleotid-Polymorphismen *MDMX* SNP 34091 und *LGR6* rs6678914, die beide 2013 erstmals mit dem östrogenrezeptornegativen Mammakarzinom in Verbindung gebracht worden sind (Garcia-Closas et al., 2013), wurden intensiver analysiert. Gleichzeitig sollten mögliche Auswirkungen der genetischen Polymorphismen auf das TNM-Stadium, das Grading der Tumorzellen, die histologische Differenzierung oder den molekularen Subtyp von Mammakarzinomen untersucht werden.

5.2 *TP53* Codon 72

Der Codon 72 ist in Exon 4 von *TP53* lokalisiert. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Polymorphismus, in Abhängigkeit der Allelvariante, die Effektivität von p53 modifiziert (Bojesen und Nordestgaard, 2008). Liegt die selteneren Cytosinvariante vor, wird in diesem Bereich anstelle der Aminosäure Arginin (Arg72-Variante) die Aminosäure Prolin (Pro72-Variante) eingebaut. Die Prolin-Variante (C) senkt die Effektivität der Apoptoseinduktion durch p53 (Grochola et al., 2010). Im Gegensatz dazu soll diese Variante jedoch den Zellzyklusarrest und die DNA-Reparatur fördern (Bojesen und Nordestgaard, 2008). Die beiden genetischen Varianten unterscheiden sich somit funktionell und haben einen Einfluss auf die Entwicklung von malignen Tumoren (Thomas et al. 1999). Passend dazu konnten signifikante Assoziation zwischen diesem Einzelnukleotid-Polymorphismus und dem Risiko, an Brustkrebs zu erkranken, nachgewiesen werden (Johnson et al., 2007). Dennoch wird der Effekt kontrovers diskutiert. Eine Metaanalyse aus dem Jahr 2012 beschäftigte sich aus diesem Grund mit der Frage, in wie weit der Polymorphismus *TP53* Codon 72 tatsächlich das Risiko an Brustkrebs zu erkranken beeinflusst. Es wurde gezeigt, dass die Prolin-Variante von *TP53* Codon 72 signifikant mit dem Risiko an Lungenkrebs zu erkranken assoziiert ist, für Mamma-, Kolorektal- und Endometriumkarzinome konnte dies jedoch nicht nachgewiesen werden (Dahabreh et al., 2012).

Die Arbeitsgruppe um AlQuasem konnte 2011 zeigen, dass Patientinnen mit der Arginin-Variante (G) früher erkranken, als Frauen, die Trägerin der Prolin-Variante (C) sind. Auch wir konnten nachweisen, dass die Frauen mit der Variante G/G im Mittel ein Jahr früher erkranken, die Unterschiede im Erkrankungsalter sind jedoch nicht signifikant.

Des Weiteren wird in der Literatur von Assoziationen des Gratings mit Mutationen in *TP53* berichtet. Maligne Tumoren bei denen sich eine Mutation in *TP53* fand, zeigten eine

Diskussion

schlechtere Differenzierung im Vergleich zu Karzinomen, bei welchen eine solche Mutation nicht nachgewiesen werden konnte (Done et al., 2001; Tsuda et al., 1993). In einer Studie aus dem Jahr 2014, welche 152 Patientinnen mit einem Endometriumkarzinom einschloss, konnte gezeigt werden, dass Trägerinnen der C/C-Variante in *TP53* Codon 72 signifikant häufiger ein mäßig differenziertes Karzinom (G2) entwickeln (Zajac et al., 2014). Auch wir konnten einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Genotyp von *TP53* Codon 72 und dem histologischen Grading zeigen. Trägerinnen der genetischen Variante G/G haben signifikant häufiger ein mäßig (G2) oder schlecht (G3) differenziertes Mammakarzinom (OR 1,615, $p=0,032$; 95% KI 1,041-2,505). Zu einem ähnlichen Ergebnis kam eine Studie, die die Mammakarzinome von 939 finnischen Frauen untersuchte. Frauen mit dem G-Allel erkrankten häufiger an einem Tumor mit einem schlechten Grading (G3). Außerdem fand diese Arbeitsgruppe einen Zusammenhang zwischen dem Genotyp von *TP53* Codon 72 und der histologischen Differenzierung. Patientinnen mit der Wildtypvariante G/G oder der heterozygoten Variante G/C entwickeln im Vergleich signifikant häufiger ein duktal invasives Mammakarzinom (Tommiska et al., 2005). Basieren auf unseren Daten können wir diesen Zusammenhang bestätigen. Patientinnen mit der Wildtypvariante G/G haben eine um das 1,6-fach erhöhte Wahrscheinlichkeit an einem invasiven lobulären Mammakarzinom zu erkranken (OR=1,558; $p=0,026$; 95% KI 1,053-2,304). Da lobulär differenzierte Mammakarzinome typischerweise jedoch mit einer guten Differenzierung assoziiert sind (Klöppel et al., 2013c), untersuchten wir diesen Zusammenhang genauer. Dabei konnten wir nachweisen, dass auch in der untersuchten Patientinnengruppe die Frauen mit einem lobulären invasiven Mammakarzinom und der Variante G/G signifikant öfter gut differenzierte Karzinome hatten (OR=3,937; $p=0,034$; 95% KI 1,111-13,952). Darüber hinaus sind die invasiv duktales Mammakarzinome unter Trägerinnen der Arginin-Variante (G/G) in über 50% schlecht differenziert (G3).

Interessant ist auch, dass Patienten mit einem östrogenrezeptorpositiven Mammakarzinom vergleichsweise häufiger die genetische Variante C/C tragen. Dieser Zusammenhang wurde bereits 2008 im Rahmen einer Studie mit 453 Mammakarzinompatientinnen beschrieben (Hamaguchi et al., 2008). Ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Patientinnen mit der Prolin-Variante (C/C) eine um das 3,3-fache höhere Wahrscheinlichkeit haben ein östrogenrezeptorpositives Mammakarzinom zu entwickeln (OR=3,284; $p=0,048$; 95% KI 1,01-10,675). Einen signifikanten Einfluss auf das Erkrankungsalter zeigt der Östrogenrezeptorstatus unter den untersuchten Frauen nicht, jedoch ist ein positiver Östrogenrezeptorstatus ein wichtiger prädikativer Faktor. Frauen mit einem

östrogenrezeptorpositiven Mammakarzinom können von einer antihormonellen Therapie profitieren (Untch et al., 2011).

Unter Berücksichtigung der im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Effekte kann gesagt werden, dass die Prolin-Variante (C) mit einem früheren mittleren Erkrankungsalter, mit einer Differenz von vier Jahren gegenüber der Arginin-Variante und östrogenrezeptorpositiven Mammakarzinomen assoziiert ist. Hingegen haben die Frauen mit der Arginin-Variante (G) signifikant häufiger ein gut differenziertes lobuläres invasives Mammakarzinom. Die Analyse dieses SNPs wurde auch zur Vergleichbarkeit mit vorangegangenen Studien durchgeführt, die Ergebnisse geben bereits nachgewiesene Effekte wieder.

5.3 Einzelnukleotid-Polymorphismen in *MDM2*

Das G-Allel von *MDM2* SNP 309 ist mit einem erhöhten Tumorrisiko assoziiert (Bond et al., 2006). Die Tumorerkrankung manifestiert sich bereits in einem jüngeren Lebensalter (Bartel et al., 2008; Benner et al., 2014; Knappskog und Lonning, 2001). Andere Autoren konnten keine Assoziation zwischen *MDM2* SNP 309 und einem erhöhten Karzinomrisiko nachweisen (Sinilnikova et al., 2009). Auch für den 24 Basen entfernten Polymorphismus *MDM2* SNP 285 konnten relevante Einflüsse auf die Entstehung eines malignen Tumors gezeigt werden. Patientinnen mit einem C-Allel im SNP 285 zeigen ein vermindertes Risiko für die Entwicklung von Mamma-, Ovar-, Cervix- und Endometriumkarzinomen (Knappskog und Lonning, 2011; Knappskog et al., 2010; Roszak et al., 2015).

In unserer Studie konnten wir zeigen, dass Patientinnen mit der Variante G/G in *MDM2* SNP 309 und einem östrogenrezeptornegativen Mammakarzinom im Mittel 5,2 Jahre früher erkranken als Patientinnen mit dem gleichen Genotyp und einem östrogenrezeptorpositiven Mammakarzinom. Der Zusammenhang ist jedoch nicht signifikant ($p=0,057$).

Der SNP 285 in *MDM2* wird als Haplotyp mit der G-Variante in *MDM2* SNP 309 vererbt (Knappskog und Lonning, 2011; Knappskog et al., 2010). Anhand unserer Daten kann der Zusammenhang bestätigt werden. Unter den 96 Patientinnen mit der Variante G/G in *MDM2* SNP 309 zeigten vier Frauen auch das homozygote C-Allel in *MDM2* SNP 285. Das homozygote C-Allel in *MDM2* SNP 285 fand sich jedoch nie bei Frauen welchen nicht auch das homozygote G-Allel in *MDM2* SNP 309 nachweisbar war.

Diskussion

In der Literatur wird darüber hinaus von mehreren Autoren gezeigt, dass das C-Allel in *MDM2* SNP 285 einen protektiven Effekt hat und das Risiko, ein Karzinom zu entwickeln, senkt (Knappskog und Lonning, 2011; Knappskog et al., 2010; Roszak et al., 2015). In dem von uns untersuchten Patientenkollektiv fand sich das homozygote C-Allel in 0,5% der Fälle, in 6,8% der Fälle lag ein heterozygoter Allelstatus vor. Dies entspricht in etwa der für Mitteleuropa angenommenen Allelhäufigkeit (Knappskog et al., 2014). Eine Aussage bezüglich des protektiven Einfluss von *MDM2* SNP 285 ist aufgrund des Studiendesigns dieser Arbeit nicht möglich. Allerdings fanden sich Zusammenhänge, die im Widerspruch zu dem beschriebenen protektiven Effekt dieses Polymorphismus stehen. Patientinnen mit der Variante C/C erkrankten in einem auffällig jungen Alter. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 44,3 Jahren, das durchschnittliche Alter zum Diagnosezeitpunkt aller Patientinnen ungeachtet der genetischen Variante liegt bei 62,2 Jahren. Das durchschnittliche Erkrankungsalter unterscheidet sich signifikant ($p=0,031$). Mit dem Log-Rank-Test konnte gezeigt werden, dass die Patientinnen mit der Variante C/C in *MDM2* SNP 285 signifikant ($p=0,000378$) früher erkranken. Zu bedenken ist hierbei jedoch, dass in der untersuchten Patientinnengruppe nur vier Frauen diesen Genotyp haben. Dennoch ist der Effekt nicht gänzlich von der Hand zu weisen. Darüber hinaus haben diese vier Patientinnen signifikant ($p=0,044$) öfter ein schlecht differenziertes Mammakarzinom (G3). Drei der Frauen hatten ein schlecht differenziertes Mammakarzinom (G3), eine Patientin hatte ein gut differenziertes Mammakarzinom (G1).

Frauen mit dem SNP 285 erkrankten signifikant früher und hatten signifikant öfter ein schlecht differenziertes (G3) Mammakarzinom (OR=1,67; $p=0,044$; 95% KI 1,014-4,813). Schlecht differenzierte Karzinome gehen mit einem signifikant kürzerem Gesamtüberleben einher (Elston und Ellis, 1991). Deshalb sollte insbesondere bei diesen Patientinnen das 5- und 10-Jahresüberleben im Kontext des genetischen Polymorphismus betrachtet werden.

5.4 Einzelnukleotid-Polymorphismen in *MDMX*

Der SNP 31826 (rs1563828) liegt im Intron 10 von *MDMX*. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit Nasopharynxkarzinomen und der Variante A/A 8,9 Jahre früher erkrankten ($p=0,002$). Das Risiko, ein Nasopharynxkarzinom in Abhängigkeit des SNP zu entwickeln, unterschied sich hingegen nicht signifikant (Zhang et al., 2012). Frauen mit einem Mammakarzinom und dem homozygotem A-Allel erkrankten ebenso signifikant früher als Patientinnen mit dem G-Allel, das Risiko an einem Mammakarzinom zu erkranken ist jedoch nicht erhöht (Song et al., 2012). Anhand unserer Daten kann dieser Zusammenhang nicht

Diskussion

bestätigt werden. Patientinnen mit dem homozygoten A-Allel erkrankten im Mittel 0,6 Jahre später. Patientinnen mit dem Genotyp A/A erkrankten gegenüber den Frauen mit den Varianten G/G und G/A mit einer um das 2,3-fach erhöhten Wahrscheinlichkeit nach dem 40. Lebensjahr (OR=2,328; p=0,032; 95% KI 1,076-5,037).

In einer anderen Publikation wird darauf hingewiesen, dass der genetische Polymorphismus eine starke Assoziation zum Östrogenrezeptorstatus bei Mammakarzinomen aufweist. Trägerinnen der Variante A/A mit einem östrogenrezeptornegativen Mammakarzinom erkrankten 3,8 Jahre früher, in rein kaukasischen Populationen sind es sogar 7,5 Jahre, als Patientinnen mit der Variante G/G (Kulkarni et al., 2009). Die untersuchten Patientinnen mit einem östrogenrezeptornegativen Mammakarzinom und der Variante G/G erkrankten im Mittel mit 61,4 Jahren. Patientinnen mit der selteneren Variante A/A und einem östrogenrezeptornegativen Mammakarzinom erkrankten hingegen durchschnittlich schon mit 53,2 Jahren, die Differenz im Erkrankungsalter beträgt 8,2 Jahre. Trägerinnen des homozygoten A-Allels und einem östrogenrezeptorpositiven Mammakarzinom hatten ein mittleres Erkrankungsalter von 64,4 Jahren, der Unterschied im Alter zum Diagnosezeitpunkt ist mit 11,2 Jahren nochmals größer. Mit Hilfe des Log-Rank-Test konnte der Zusammenhang veranschaulicht werden, der Unterschied im Erkrankungsalter ist signifikant (p=0,025).

Außerdem zeigen Trägerinnen der Variante A/A signifikant (p=0,045) häufiger eine Lymphgefäßinfiltration als Frauen mit den Variante G/G und G/A. Die Wahrscheinlichkeit ist um das 1,3-fache erhöht (OR=1,292; p=0,045; 95% KI 1,005; 1,66), dass zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bereits eine Lymphgefäßinfiltration nachweisbar ist.

Zusammenfassend zeigte sich in dieser Arbeit, dass die Variante A/A in *MDMX* SNP 31826 signifikant mit dem Erkrankungsalter und der Tumorausbreitung (Lymphgefäßinfiltration) assoziiert ist. In Abhängigkeit des Östrogenrezeptorstatus erkrankten die Patientinnen mit dem homozygoten A-Allel signifikant früher.

In einer genomweiten Assoziationsstudie aus dem Jahr 2013 wurde gezeigt, dass *MDMX* SNP 34091 mit dem östrogenrezeptornegativen Mammakarzinomen assoziiert ist. Dieser Zusammenhang kann auch bei Patientinnen auch bei Patientinnen mit einer *BRCA1*-Mutation beobachtet werden (Garcia-Closas et al., 2013). Wenige Jahre zuvor wurde bereits ein signifikanter Effekt des SNPs bei Ovarialkarzinomen beschrieben. Patientinnen mit Ovarialkarzinomen tragen signifikant häufiger das homozygote A-Allel in *MDMX* SNP 34091. Diese Frauen hatten ein 5,5-fach erhöhtes Risiko durch den Tumor zu versterben verglichen mit Patienten mit dem homozygoten C-Allel (McEvoy et al., 2012; Wynendaele et al., 2010).

Diskussion

Das C-Allel im DNA-Strang dient als Zielstruktur für eine mRNA, die zum verstärkten Abbau von *MDMX* führt. Dadurch wird die potentielle onkogene Wirkung abgeschwächt, die Aktivität des Tumorsuppressors p53 wird weniger supprimiert. (McEvoy et al., 2012; Wynendaele et al., 2010).

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit konnte die seit 2013 bekannte Assoziation des C-Allels in *MDMX SNP 34091* mit dem östrogenrezeptornegativen Mammakarzinom nur zum Teil nachvollzogen werden. Unsere Daten zeigten nicht, dass Patientinnen mit dem C-Allel öfter Mammakarzinome mit einem positiven oder negativen Östrogenrezeptorstatus haben. Betrachtet man nur die Patientinnen, welche das C-Allel tragen und zum Diagnosezeitpunkt jünger als 60 Jahren waren, zeigte sich eine signifikante Assoziation. Diese Frauen haben signifikant seltener einen positiven Östrogenrezeptorstatus (OR=0,546; p=0,042, 95% KI 0,304-0,978). Insgesamt haben die Frauen mit der Variante C/C, mit 86%, häufiger ein östrogenrezeptorpositives Mammakarzinom als Frauen mit der Variante A/A, hier sind es 83,3%. Außerdem haben die Patientinnen mit dem homozygoten C-Allel signifikant (p=0,016) öfter einen positiven Progesteronrezeptorstatus, die Wahrscheinlichkeit ist um das 1,5-fache erhöht (OR=1,452; p=0,016; 95% KI 1,073-1,964).

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Frauen mit der Variante C/C im Mittel mit 64,2 Jahren an einem Mammakarzinom erkrankten und damit 2,4 Jahre später als Frauen mit der Variante A/A. Dieser Zusammenhang findet sich sowohl bei Patientinnen mit einem positiven als auch einem negativen Östrogenrezeptorstatus. Jedoch ist der Altersunterschied zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bei Patientinnen mit einem östrogenrezeptornegativen Mammakarzinom mit 1,5 Jahren zwischen den Genotypen C/C (durchschnittliches Erkrankungsalter von 61,8 Jahre) und A/A (durchschnittliches Erkrankungsalter von 59,3 Jahre) geringer als bei Patientinnen mit einem positiven Östrogenrezeptorstatus. Hier beträgt die Differenz des durchschnittlichen Erkrankungsalters zwischen den Genotypen 2,7 Jahre. Patientinnen mit einem östrogenrezeptorpositiven Mammakarzinom und der Variante A/A erkranken mit einem durchschnittlichen Erkrankungsalter von 65,1 Jahren, 3,3 Jahre später, als Frauen mit einem östrogenrezeptornegativen Mammakarzinom. Der Unterschied ist signifikant (p=0.025).

Mit Hilfe eines Log-Rank-Tests wurde der Zusammenhang zwischen dem Erkrankungsalter bei Patientinnen mit der Variante C/C in Abhängigkeit des Östrogenrezeptorstatus veranschaulicht. Die Frauen mit einem östrogenrezeptornegativen Mammakarzinom erkranken zwischen 39 und 82 Jahren, wobei keine Frau zwischen dem 45. und 65. Lebensjahr erkrankt. Betrachtet man nun die prä- und postmenopausalen Frauen getrennt, erkranken die

Diskussion

prämenopausalen Patientinnen mit dem Genotyp C/C und einem östrogenrezeptornegatives Mammakarzinom signifikant ($p=0,001$) früher als die Frauen mit einem östrogenrezeptorpositiven Mammakarzinom. Das Erkrankungsalter der Frauen wird jedoch nicht nur durch den Genotyp in Abhängigkeit des Östrogenrezeptorstatus beeinflusst. Auch Patientinnen mit dem homozygoten A-Allel und einem positiven HER2-Status erkranken signifikant ($p=0,007$) früher.

Außerdem konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem C-Allel und der Größe des Primärtumors nachgewiesen werden. Patientinnen mit dem Genotyp C/C haben eine um das 1,4-fach erhöhte Wahrscheinlichkeit eines lokal fortgeschrittenen Tumors ($OR=1,412$, $p=0,014$, 95% KI 1,071-1,860). Dieser Zusammenhang wird noch stärker, wenn man Patientinnen mit einem östrogenrezeptorpositiven Mammakarzinom betrachtet, die Wahrscheinlichkeit ist hier um das 1,5-fache höher ($OR=1,147$; $p=0,004$; 95% KI 1,147-2,087).

Zusätzlich untersuchten wir, ob Verknüpfungen zwischen den Einzelnukleotid-Polymorphismen und den molekularen Subtypen existieren. Es wird berichtet, dass in Tumorzellen von Luminal-A- und Luminal-B-Mammakarzinomen eine signifikant erhöhte Expression von MDMX und MDM2-spezifischer mRNA nachweisbar ist (Swetzig et al., 2016). In dem von uns untersuchten Patientenkollektiv fanden sich signifikante Assoziationen zwischen MDMX SNP 34091 und den intrinsischen Subtypen. Das C-Allel in *MDMX SNP 34091* ist signifikant ($p=0,015$) mit Luminal-A-Mammakarzinomen assoziiert, die Wahrscheinlichkeit ist um das 1,4-fache höher ($OR=1,412$; $p=0,015$; 95% KI 1,069-1,864). Dieser Subtyp ist mit einer guten Prognose und einem deutlich günstigeren Gesamtüberleben verknüpft (Naume und Sørliea, 2005). Im Gegensatz dazu ist das A-Allel signifikant mit Luminal-B-Mammakarzinomen assoziiert, die Wahrscheinlichkeit ist um das 1,4-fache höher ($OR=1,422$, $p=0,023$; 95% KI 1,051-1,924). Patienten mit einem Luminal-B-Mammakarzinom und dem Genotyp A/A erkranken im Mittel drei Jahre später.

Basierend auf den dargestellten Ergebnissen kann man zusammenfassen, dass bei jüngeren Patientinnen das C-Allel signifikant mit dem östrogenrezeptornegativen Mammakarzinom assoziiert ist. Betrachtet man alle Altersgruppen zeigt sich jedoch eine signifikante Assoziation zu Luminal-A-Mammakarzinomen mit einem positiven Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus. Dieses, im Widerspruch zu den Daten der genomweiten Assoziationsstudie aus dem Jahr 2013 stehende, Ergebnis kann Folge unterschiedlicher Studiendesigns sein. Das C-Allel ist zudem mit lokal fortgeschrittenen Mammakarzinomen assoziiert. Da Luminal-A-Karzinome mit einer guten Prognose verknüpft sind, kann das C-Allel in *MDMX SNP 34091* im Vergleich mit dem A-Allel als prädikativer Marker für einen guten Verlauf betrachtet werden (Vasema et al., 2015). Das A-Allel ist signifikant mit einem früheren

Diskussion

Erkrankungsalter bei HER2-positiven und östrogenrezeptornegativen Mammakarzinomen assoziiert. Darüber hinaus haben die Patientinnen mit diesem Genotyp signifikant öfter Luminal-B-Karzinome. Zur weiteren Analyse dieses Zusammenhangs wird die Untersuchung des Gesamtüberlebens, in Abhängigkeit der Genotypen, sinnvoll sein.

5.5 *LGR6* rs667891

Das *LGR6*-Gen ist wie *MDMX* auf Chromosom 1q32 lokalisiert. In einer 2013 veröffentlichten genomweiten Assoziationsstudie wurde für die beiden Einzelnukleotid-Polymorphismen in *LGR6* und *MDMX* SNP 34091 ein signifikanter Zusammenhang mit östrogenrezeptornegativen Mammakarzinomen nachgewiesen (Garcia-Closas et al., 2013). Zu diesem Zeitpunkt beschäftigten wir uns bereits mit den Einzelnukleotid-Polymorphismen *MDMX* SNP 31826 und 34091. Die Ergebnisse der genomweiten Assoziationsstudie von Garcia-Closas et al. veranlassten uns dazu, neben den bereits analysierten Polymorphismen im p53-Pathway, ebenfalls den Einfluss von *LGR6* rs6678914 auf Mammakarzinome im Patientenkollektiv der PiA-Studie zu untersuchen. Patientinnen mit einem östrogenrezeptornegativen Mammakarzinom zeigten nicht signifikant häufiger die Variante A/A. Ferner wurde untersucht, ob die unterschiedlichen Varianten von *LGR6* rs6678914 einen Einfluss auf das Erkrankungsalter haben. Patientinnen mit dem Genotyp A/A erkrankten im Mittel mit 63,2 Jahren, 1,4 Jahre später als Patientinnen mit der Variante G/G. Patientinnen mit dem Genotyp G/G und einem negativen Östrogenrezeptorstatus erkrankten im Mittel 4,1 Jahre früher, der Unterschied ist nicht signifikant ($p=0,076$). Da dennoch ein Unterschied im Erkrankungsalter in Abhängigkeit des Genotyps ersichtlich ist, wurden die Daten zur weitergehenden Analyse mittels binär-logistischer Regression untersucht. Hier zeigte sich, dass Patienten mit dem A-Allel signifikant ($p=0,036$) später erkranken, die Wahrscheinlichkeit nach dem 60. Lebensjahr zu erkranken, ist um das 1,8-fache höher (OR=1,761; $p=0,036$; 95% KI 1,038-2,988). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Patientinnen mit dem A-Allel signifikant öfter eine lymphonodale Metastasierung zum Diagnosezeitpunkt aufweisen ($p=0,02$), die Wahrscheinlichkeit ist um das 1,4-fache erhöht (OR=1,444; $p=0,02$; 95% KI 1,060-1,968).

In der Zusammenschau der Daten ist das A-Allel in *LGR6* signifikant mit einem späteren Erkrankungsalter und einer fortgeschrittenen lymphonodalen Metastasierung assoziiert. Das A-Allel zeigte keine signifikante Assoziation mit östrogenrezeptornegativen Mammakarzinomen. Wie bei *MDMX* SNP 34091 können die Ergebnisse als Folge unterschiedlicher Studiendesigns gewertet werden.

5.6 Methodenkritik

Grundlage dieser Arbeit war die genetische Untersuchung von nativen, kryokonservierten Gewebematerial, welches aus Mammakarzinomen, im Rahmen der PiA-Studie, entnommen worden war. Im Anschluss erfolgte der Vergleich der Ergebnisse mit den bekannten klinischen und pathologischen Variablen. Insgesamt wurden 815 Patientinnen in die Analyse einbezogen.

Zunächst ist zu diskutieren ob die untersuchte Patientengruppe ausreichend groß war, um signifikante Zusammenhänge zwischen den Einzelnukleotid-Polymorphismen und dem Erkrankungsalter und weiteren klinisch-pathologischen Parametern nachweisen zu können. Al-Quasem et al. konnten in einer Studie mit 100 Patientinnen aus dem Jahr 2011 einen signifikanten Zusammenhang zwischen der homozygoten C-Variante in *TP53* Codon 72 und einem früheren Erkrankungsalter bei Mammakarzinomen unter Saudi-arabischen Frauen nachweisen (Al-Quasem et al., 2011). Auch Johnson et al. zeigten, dass Patientinnen mit der homozygoten C-Variante vergleichsweise jung erkranken. Diese Arbeitsgruppe schloss 2463 Kontrollproben und 473 Mammakarzinompatientinnen in Ihre Studie ein (Johnson et al., 2007). Sinilnikova et al. konnten in Abhängigkeit der Pro72-Variante kein erhöhtes Risiko für nachweisen, in dieser Studie wurden insgesamt 2222 Mammakarzinompatientinnen untersucht (Sinilnikova et al., 2009). Auch in dieser Arbeit konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen den Allelvarianten und dem Erkrankungsalter nachgewiesen werden. Bei SNPs mit einer niedrigen Allelfrequenz für das seltenere Allel ist die Größe des Patientenkollektivs besonders entscheidend. In diesem Kontext ist *MDM2 SNP 285* zu nennen. Lediglich vier der untersuchten Frauen waren Trägerin der homozygoten C-Variante, der Anteil an allen Fällen beträgt weniger als 0,5%. Zwar konnte für diesen Polymorphismus eine signifikante Assoziation mit dem Erkrankungsalter nachgewiesen werden, eine Untersuchung des Zusammenhangs mit den Hormonrezeptoren war aufgrund der geringen Patientenzahl jedoch nicht sinnvoll. Die homozygote A-Variante in *MDMX SNP 31826* ist bei östrogenrezeptornegativen Mammakarzinomen signifikant mit einem früheren Lebensalter assoziiert, jedoch finden sich in unserer Studie nur 6 Frauen mit dieser Konstellation. Basierend auf diesen Ergebnissen ist es insbesondere bei SNPs, welche eine Assoziation zum Östrogenrezeptorstatus aufweisen, entscheidend, ein möglichst umfangreiches Patientenkollektiv zu untersuchen. Ebenfalls regionale Unterschiede und der Einfluss weiterer SNPs oder Mutationen sind als Ursache für widersprüchliche Ergebnisse zu diskutieren.

Darüber hinaus ist die begrenzte Vergleichbarkeit zu älteren Publikationen kritisch zu hinterfragen. Zum Zeitpunkt des Abschlusses dieser Arbeit lagen noch keine Daten zum

Überleben der Patientinnen vor. Viele Autoren konnten zeigen, dass ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Genotyp und dem Überleben der Patientinnen besteht (Al-Quasem et al., 2011, Silwal-Pandit et al., 2014, Xu et al., 2008, Zhang et al., 2012). Sobald diese Daten vorliegen, sollten die Ergebnisse dieser Arbeit, basierend auf den Überlebensdaten, erneut diskutiert werden. In diesem Kontext ist auch der (noch) fehlende Mutationsstatus von *TP53* zu nennen. Aktuell werden die DNA-Proben auf Mutationen in *TP53* untersucht, anschließend werden die Effekte der Einzelnukleotid-Polymorphismen evaluiert.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit basiert auf der Untersuchung von den SNPs in *TP53* Codon 72, *MDM2* SNP 309 und 285, *MDMX* 31826 und 34091 sowie *LGR6* rs6678914. Einzelnukleotid-Polymorphismen des P53-Pathway beeinflussen das Risiko zur Entwicklung von malignen Tumoren (Bond und Levine 2007; Grochola et al., 2010).

Es konnte gezeigt werden, dass die Prolin-Variante (C) in *TP53* Codon 72 ist mit einem früheren durchschnittlichen Erkrankungsalter von 2,1 Jahren gegenüber der Arginin-Variante und östrogenrezeptorpositiven Mammakarzinomen assoziiert ist. Frauen mit der Arginin-Variante (G) erkranken signifikant öfter an einem gut differenzierten ($p=0,032$) lobulären invasiven Mammakarzinom ($p=0,026$).

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass Patientinnen mit der Variante G/G in *MDM2* SNP 309 und einem östrogenrezeptornegativen Mammakarzinom durchschnittlich 5,2 Jahre früher erkranken als Patientinnen mit einem östrogenrezeptorpositiven Mammakarzinom ($p=0,057$). Ferner erkrankten die Patientinnen mit der Variante C/C in *MDM2* SNP 285 signifikant ($p=0,0004$) früher, das mittlere Alter zum Diagnosezeitpunkt war mit 44,3 Jahren, 18,1 Jahre früher, als Patientinnen mit den Variante G/G und G/C. Dieser Zusammenhang sollte anhand eines weiteren Kollektivs untersucht werden, um zu analysieren, ob sich der Effekt bestätigen lässt.

Die Variante A/A in *MDMX* SNP 31826 ist signifikant mit dem Erkrankungsalter ($p=0,05$) und der Tumorausbreitung (Lymphgefäßinfiltration, $p=0,047$) assoziiert. In Abhängigkeit des Östrogenrezeptorstatus erkranken die Patientinnen mit dem Genotyp A/A signifikant 8,8 Jahre früher ($p=0,025$).

Junge Patientinnen mit dem C-Allel in *MDMX* SNP 34091 haben signifikant öfter östrogenrezeptornegative Mammakarzinome ($p=0,042$). Über alle Altersgruppen verteilt zeigt

Diskussion

sich jedoch eine signifikante Assoziation des C-Allels mit Luminal-A-Mammakarzinomen ($p=0,015$) mit einem positiven Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus. Das C-Allel ist außerdem mit lokal fortgeschrittenen Mammakarzinomen assoziiert ($p=0,014$). Das A-Allel ist signifikant mit einem früheren Erkrankungsalter bei HER2-positiven und östrogenrezeptornegativen Mammakarzinomen assoziiert. Darüber hinaus haben die Patientinnen mit diesem Genotyp signifikant öfter Luminal-B-Karzinome ($p=0,023$).

Es konnte gezeigt werden, dass das A-Allel in *LGR6* signifikant mit einem späteren Erkrankungsalter ($p=0,036$) und einer fortgeschrittenen lymphnodalen Metastasierung ($p=0,02$) verknüpft ist. Eine signifikante Assoziation mit dem östrogenrezeptornegativen Mammakarzinom fand sich hingegen nicht ($p=0,216$).

In Zusammenschau der Ergebnisse kann unsere Arbeitshypothese, dass die Einzelnukleotid-Polymorphismen im p53-Pathway signifikant mit dem Erkrankungsalter und klinisch-pathologischen Variablen assoziiert ist, bestätigt werden. Dabei fanden sich auch interessante neue Erkenntnisse, andere Daten stehen im Widerspruch zu vorangegangenen Studien. Für zukünftige Studien wird es von großer Bedeutung sein ausreichend große Patientenkollektive zu untersuchen. Viele der Polymorphismen zeigen eine Abhängigkeit zum Östrogenrezeptorstatus. Insbesondere bei Effekten, welche sich bei östrogenrezeptornegativen Mammakarzinomen finden, haben auch in einem umfangreichen Patientenkollektiv nur noch sehr wenige Frauen die entscheidende Kombination der Parameter.

Zur weiterführenden Analyse der Effekte der Einzelnukleotid-Polymorphismen soll das Patientenkollektiv hinsichtlich des Überlebens untersucht werden. Die Überlebensdaten liegen aktuell jedoch noch nicht vor. Außerdem werden die DNA-Proben zurzeit nach Mutationen in *P53* untersucht. Wir erwarten, dass in Abhängigkeit des *TP53*-Mutationsstatus weitere Effekte nachgewiesen werden können.

7. Literaturverzeichnis

- Albert US, Altland H, Duda V, Engel J, Geraedts M, Heywang-Köbrunner S et al. (2008) Stufe-3-Leitlinie Brustkrebs-Früherkennung in Deutschland 2008, 1. Aktualisierung, www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/077-001_S3_Brustkrebs-Fruherkennung_lang_02-2008_02-2011.pdf, 31.05.2016.
- Al-Quasem A, Touleimat M, Tulbah A, Elkum N, Al-Tweigeri T, Aboussekhra A (2011) The p53 codon 72 polymorphism is associated with risk and early onset of breast cancer among saudi women, *Oncology letters* 3:875-878.
- Barker N, Clevers H (2010) Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptors as markers of adult stem cells, *Gastroenterology* 138:1681-1696.
- Bartel F, Jung J, Böhnke A, Gradhand E, Zeng K, Thomssen C, Hauptmann S (2008) Both germ line and somatic genetics of the p53 pathway affect ovarian cancer incidence and survival, *Clinical Cancer Research* 14:89-96.
- Beckman G, Birgander RIA, Sjölander A, Saha N, Holmberg PA, Kivelä A, Beckman L. (1994) Is p53 polymorphism maintained by natural selection?, *Hum Hered* 44:266-270.
- Benner A, Mansouri L, Rossi D, Majid A, Wilander K, Parker A, Bond G et al. (2014) MDM2 promotor polymorphism and disease characteristics in chronic lymphocytic leukemia: results of an individual patient data-based meta-analysis, *Haematologica* 99:1285-1291.
- Bertz J, Dahm S, Haberland J, Kraywinkel K, Kurth B, Wolf U (2010) Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland, Robert Koch Institut, Zentrum für Krebsdaten, edoc.rki.de/documentes/rki_fv/re2vZ2t28lr8Y/PDF/23GSS31yBOGKUHU.pdf, 21.05.2016 S. 77-82
- Blümcke S, Pathologie. 1.Aufl. Walter de Gruyter, Berlin, 1995, S. 782-788.
- Böcker W, Denk H, Heitz PU, Höfler G, Kreipe H, Moch H, Pathologie, 5. Aufl. Urban & Fischer München, 2012, S. 811-826.
- Bojesen SE, Nordestgaard BG (2008) The common germline Arg72Pro polymorphism of p53 and increased longevity in humans, *Cell Cycle* 15:158-163.
- Boldrup L, Bourdon JC, Coates PJ, Sjöström B, Nylander K (2006) Expression of p53 isoforms in squamous cell carcinoma of the head and neck, *European Journal of Cancer* 43:617-623.
- Bond G L, Hirshfield K, Kirchhoff T, Alexe G, Bond E, Robins H, Bartel F et al. (2006) MDM2 SNP309 Accelerates Tumor Formation in a Gender-Specific and Hormone-Dependent Manner, *Cancer Research* 10:5104-5110.
- Bond GL, Levine AJ (2007) A single nucleotide polymorphism in the p53 pathway interacts with gender, environmental stresses and tumor genetics to influence cancer in humans, *Oncogene* 2007 26:1317-1323.
- Colleoni M, Rotmensz M, Maisonneuve P, Mastropasqua MG, Luini A, Veronesi P et al. (2012) Outcome of special types of luminal breast cancer, *Annals of Oncology* 23:1428-1436.
- Cotignola J, Chou JF, Roy P, Mitra N, Busam K, Halpern AC, Orlow I (2012) Investigation of the effect of MDM2 SNP309 and TP53 Arg72Pro polymorphism in the age of onset of cutaneous melanoma, *Journal of Investigative Dermatology* 132:1471–1478.

- Dahabreh IJ, Schmid CH, Lau J, Varvarigou V, Murray S, Trikalinos TA (2013) 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.
- DeLeo AB, Jay G, Appella E, Dubois GC, Law LW, Old LJ (1979) Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse, *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 76:2420-2424.
- Done SJ, Eskandarian S, Bull Shelley, Redstone M, Andrulis IL (2001) p53 Missense Mutations in Microdissected High-Grade Ductal Carcinoma in situ of the Breast, *Journal of the National Cancer Institute* 93:700-704.
- Easton DF, Pooley KA, Dunning AM, Pharoah PD, Thompson D, Ponder BA et al. (2007) Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci, *Nature* 447:1087-1093.
- Economopoulos KP, Sergentanis TN (2010) Differential effects of MDM2 SNP309 polymorphism on breast cancer risk along with race: a meta-analysis, *Breast Cancer Research Treatment* 120:211-216.
- Elston CW, Ellis IO (1991) Pathologic prognostic factors in breast cancer, I. The value of histologic grade in breast cancer: experience from a large study with long term follow-up, *Histopathology* 19:403-410.
- Förster T (1948) Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz, *Annalen der Physik* 437:55.
- Gansmo LB, Romundstad P, Birkeland E, Hv, K, Vatten L, Knappskog S, Lonning P (2015) MDM4 SNP 34091 (rs4245739) and its effect on breast-, lung-, and prostate cancer risk, *Cancer Medicine* 4:1901-1907.
- Garcia-Closas M, Couch FJ, Lindstrom S, Michailidou K, Schmidt MK, Brook MN et al. (2013) Genome-wide association studies identify four ER negative-specific breast cancer risk loci, *Nature Genetics* 45:392-398.
- Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, King MC (1990) Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21, *Science* 250:1684-1689.
- Holinski-Feder E, Brandau O, Nestle-Krämling C, Derakshandeh-Peykar P, Murken J, Untch M, Meindl A (1998) Genetik des erblichen Mammakarzinoms: Grundlagen-Forschung-Diagnostik, *Deutsches Ärzteblatt*, 95:A-600-605.
- Gembarska A, Luciani F, Fedele C, Russell EA, Dewaele M, Villar S et al. (2012) MDM4 is a key therapeutic target in cutaneous melanoma, *Nature medicine* 18:1239-1247.
- Gilkes DM, Pan Y, Coppola D, Yeatman T, Reuther GW, Chen J (2008) Regulation of MDMX expression by mitogenic signaling, *Molecular Cell Biology* 28:1999-2010.
- Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, et al. (2013) Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013, *Annals of Oncology* 24:2206-2223.
- Gong X, Carmon KS, Lin Q, Thomas A, Yi J, Liu Q (2012) LGR6 is a high affinity receptor of R-spondins and potentially functions as a tumor suppressor, *PLoS One* 7:e37137.

- Grochola L F, Zeron-Medina J, Mériaux S, Bond G L (2010) Single-nucleotide Polymorphism in the p53 Signaling Pathway, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2:1-17.
- Groß S, Immel UD, Klitschar M, Bartel F (2014) Germline genetics of the p53 pathway affect longevity in a gender specific manner, *Current Aging Science* 7:91-100.
- Hamaguchi M, Nishio M, Toyama T, Sugiura H, Kondo N, Fujii Y, Yamashita H (2008) Possible difference in frequencies of genetic polymorphisms of Östrogen receptor alpha, Östrogen metabolism and P53 genes between Östrogen receptor-positive and -negative breast cancers, *Japanese Journal of Clinical Oncology* 38:734-742.
- Heil J, Gondos A, Rauch G, Marmé F, Rom J, Golatta M et al. (2012) Outcome analysis of patients with primary breast cancer initially treated at a certified academic breast unic, *The breast* 21:303-308.
- Hatzenbichler F, Stoehr CG, Rogenhofer M, Wieland WF, Ruummele P, Hartmann A, Stoehr R (2014) Mdm2 SNP309 G-variant is associated with invasive growth of human urinary bladder cancer, *Pathobiology* 81:53-59.
- Jin S, Levine A J (2001) The p53 functional circuit, *Journal of Cell Science* 114:4139-4140.
- Jones SN, Roe AE, Donehower LA, Bradley A (1995) Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53, *Nature* 378:206-208.
- Johnson N, Fletcher ON, Pelles C, Rudd M, Webb E, Sellick G et al. (2007) Counting potentially functional variants in BRCA1, BRCA2 and ATM predicts breast cancer susceptibility, *Human Molecular Genetics* 16:1051-1057.
- Hu W, Feng Z, Ma L, Wagner J, Rice JJ, Stolovitzky G, Levine AJ (2007) A Single Nucleotide Polymorphism in the MDM2 Gene Disrupts the Oscillation of p53 and MDM2 Levels in Cells, *Cancer Research* 67:2757-2765.
- Kalemi T G, Lambropouplos A F, Gueorguiev M, Chrisafis S, Papazisis K T, Kotsis A (2005) The association of p53 mutations an p53 codon 72, Her 2 codon 655 and MTHFR C677T polymorphisms with breast cancer in Northern Greece, *Cancer Letters* 222:57-65.
- Klöppel G, Dietel M, Remmele W, Böcker W, *Pathologie: Mamma, Weibliches Genitale, Schwangerschaft und Kindererkrankungen*, 3. neubearbeitete Aufl. Springer, Heidelberg, 2013, S. 88-92a.
- Klöppel G, Dietel M, Remmele W, Böcker W, *Pathologie: Mamma, Weibliches Genitale, Schwangerschaft und Kindererkrankungen*, 3. neubearbeitete Aufl. Springer, Heidelberg, 2013, S. 73-87b.
- Klöppel G, Dietel M, Remmele W, Böcker W, *Pathologie: Mamma, Weibliches Genitale, Schwangerschaft und Kindererkrankungen*, 3. neubearbeitete Aufl. Springer, Heidelberg, 2013, S. 12-129c.
- Klug SJ, Rensing M, Koenig J, Abba MC, Agorastos T, Brenna SM et al. (2009) TP53 codon 72 polymorphism and cervical cancer: a pooled analysis of individual data from 49 studies, *Lancet Oncology* 10:772-728.
- Knappskog S, Bjørnslett M, Myklebust LM, Huijts PE, Vreeswijk MP, Edvardsen H et al. (2011) The MDM2 promoter SNP285C/309G haplotype diminishes Sp1 transcription factor binding and reduces risk for breast and ovarian cancer in Caucasians, *Cancer Cell* 19:273-282.

- Knappskog S, Gansmo LB, Dibirov K, Metspalu A, Cybulski C, Peterlongo P et al. (2011) Population distribution and ancestry of the cancer protective MDM2 SNP 285 (rs117039649) (2014) *Oncotarget* 5:8223-8234.
- Knappskog S, Lonning P E (2011) Effects of the MDM2 promotor SNP 285 and SNP 309 on Sp1 transcription factor binding and cancer risk, *Transcription* 2:207-210.
- Kreienberg R (2012) Interdisziplinäre S3-Leitlinie für Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, AWMF-Registernummer 032-0450L, Kurzversion 3.0, www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-0450L_k_S3_Brustkrebs_Diagnostik_Therapie_Nachsorge_2012-07.pdf, 31.05.2016, S.28-30.
- Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH (1997) Regulation of p53 stability by Mdm2, *Nature* 387:299-303.
- Kulkarni DA, Vazquez A, Haffty BG, Bandera EV, Hu W, Sun et al. (2009) A polymorphic variant in human MDM4 associates with accelerated age of onset of Östrogen receptor negative breast cancer, *Carcinogenesis* 30:1910-1915.
- Lakhani SR, Ellis I O, Schnitt S J, Tan P H, van de Vijer M J, WHO Classification of Tumors of the Breast, 4. Auflage International Agency for Research on Cancer, World Health Organisation Press, Genf 2013.
- Lane DP (1992) p53, guardian of the genome, *Nature* 358:15-16.
- Laurie NA, Donovan SL, Shih CS, Zhang J, Mills N, Fuller C, Dyer MA et al. (2006) Inactivation of the p53 pathway in retinoblastoma, *Nature* 444:61-66.
- Lebeau A, Kriegsmann M, Burandt E, Sinn HP (2014) Invasive Mammakarzinome: Die aktuelle WHO-Klassifikation, *Pathologie* 35:7-17.
- Levine AJ, Oren M (2009) The first 30 years of p53: growing ever more complex, *Nature Review Cancer* 9:749-758.
- Malhotra GK, Zhao X, Band H, Band V (2010) Histological, molecular and functional subtypes of breast cancer, *Cancer Biology and Therapy* 10:955-960.
- Malkin D (2011) Li-Fraumeni Syndrome. *Genes & Cancer* 2:475-484.
- Mavaddat N, Pharoah PD, Michailidou K, Tyrer J, Brook MN, Bolla MK et al. (2015) Prediction of breast cancer risk based on profiling with common genetic variants, *Journal of the National Cancer Institute* 107:1-15.
- McEvoy J, Ulyanov A, Brennan R, Wu G, Pounds S, Zhang J, Dyer MA (2012) Analysis of MDM2 and MDM4 single nucleotide polymorphisms, mRNA splicing and protein expression in retinoblastoma, *PLoS One* 7:e42739.
- Millikan RC, Heard K, Winkel S, Hill EJ, Heard K, Massa B et al. (2006) No association between the MDM2 -309 T/G promoter polymorphism and breast cancer in African-Americans or Whites, *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 15:175-177.
- Mülhardt C, *Der Experimentator, Molekularbiologie/Genomics* 6. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2009a, S. 283-286.
- Mülhardt C, *Der Experimentator, Molekularbiologie/Genomics* 6. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2009b, S. 283-286.

Mülhardt C, Der Experimentator, Molekularbiologie/Genomics 6. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2009c, S. 109-114.

Müller-Esterl W, Anderka O, Brandt U, Kerscher S, Biochemie Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler 2. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2010 a, S. 483-514.

Müller-Esterl W, Anderka O, Brandt U, Kerscher S, Biochemie Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler 2. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2010 b, S. 317.

Müller-Esterl W, Anderka O, Brandt U, Kerscher S, Biochemie Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler 2. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2010 c, S. 251-354.

Müller-Esterl W, Anderka O, Brandt U, Kerscher S, Biochemie Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler 2. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2010 d, S. 251-354.

Naume B, Sørli T (2005) Molecular profiling of early breast cancer in relation to detection of micrometastases and outcome, Breast cancer research 7:35.

NCBI Datenbank dbSNP, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=6678914, 13.05.2016.

Nunobiki O, Ueda M, Yamamoto M, Toji E, Sato N, Izuma S, Okamoto Y, Torii K, Noda S. (2009) Polymorphisms of p53 codon 72 and MDM2 promoter 309 and the risk of endometrial cancer, Human Cell 22:101-106.

Nothacker M, Lelgemann M, Giersiepen K, Weinbrenner S (2007) Evidenzbericht 2007 zur S-3-Leitlinie Brustkrebsfrüherkennung in Deutschland. Band 31. ed Version 1.00. Berlin: Ärztliches Zentrum für Qualität in der Medizin (ÄZQ), www.senologie.org/fileadmin/media/documents/pdf/Leitlinien%20der%20Deutschen%20Gesellschaft%20für%20Senologie/evidenzbericht_bkf_2007.pdf, 31.05.2016.

Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B (1992) Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas, Nature 358:80-83.

Onel K, Cordon-Cardo C (2004) MDM2 and prognosis, Molecular Cancer Research 2:1-8.

Pei D, Zhang Y, Zheng J (2012) Regulation of p53: a collaboration between Mdm2 and Mdmx, Oncotarget 3:228-235.

Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P, Olivier M (2007) Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database, Human Mutation 28:622-629.

Pishas KI, Al-Ejeh F, Zinonos I, Kumar R, Evdokiou A, Brown MP, Callen DF, Neilsen PM (2010) Nutlin-3a is a potential therapeutic for ewing sarcoma, Clinical Cancer Research 17: 494-504.

Römer L, Klein C, Dehmer A, Kessler H, Buchner J (2006) p53-A Natural Cancer Killer: Structural Insights and Therapeutic Concepts, Angewandte Chemie International Edition 45:6440-6460.

Rozak A, Misztal M, Sowińska A, Jagodziński PP (2015) Murine Double-Minute 2 Homolog Single Nucleotide Polymorphisms 285 and 309 in Cervical Carcinogenesis, Molecular Diagnosis and Therapy 19:235-244.

- Sawyer E, Roylance R, Petridis C, Brook M, Nowinski S, Papouli E et al. (2014) Genetic Predisposition to In Situ and Invasive Lobular Carcinoma of the Breast 10: e1004285.
- Scalia-Wilbur J, Colins BL, Penson RT, Dizon DS (2016) Breast Cancer Risk Assessment: Moving Beyond BRCA1 and 2, *Radiation Oncology* 26:3-8.
- Schaaf C, Zschocke J, *Basiswissen Humangenetik*, 1. Aufl, Springer Verlag, Heidelberg, 2008, S. 42.
- Schmidt MK, Reincke S, Broeks A, Braaf LM, Hogervorst FB, Tollenaar RA, Johnson N, Fletcher O, Peto J, Tommiska J, Breast Cancer Association Consortium et al. (2007) Do MDM2 SNP309 and TP53 R72P interact in breast cancer susceptibility? A large pooled series from the breast cancer association consortium, *Cancer Research* 67:9584-9590.
- Schmidt-Matthiesen H, Wallwiener D, von Fournier D, Hoyme B, Licht P, von Loewenich V, Schauf B, Taubert HD, *Gynäkologie und Geburtshilfe*, 10. Aufl, Schattauer-Verlag, Stuttgart, 2004, S. 416-428.
- Shvarts A, Bazuinen M, Dekker P, Ramosa YFM, Steengenga WT, Merckx G, van Hama RCA, van der Houven van Oordta W, van der Eba AJ, Jochemsen AG (1997) Isolation and Identification of the Human Homolog of a New p53-Binding Protein, Mdmx, *Genomics* 43:34-42.
- Silwal-Pandit L, Vollan H-KM, Chin SF, Rueda OM, McKinney S, Osako T, Quigley DA, Kristensen VN, Aparicio S, Børresen-Dale A-L, Caldas C, Langerød A (2014) TP53 Mutation Spectrum in Breast Cancer Is Subtype Specific and Has distinct Prognostic Relevance, *Clinical Cancer Research* 20:1-12.
- Sinilnikova OM, Antoniou AC, Simard J, Healey S, Léoné M, Sinnett D, Spurdle AB, Beesley J, Chen X, Stoppa-Lyonnet D et al. (2009) The TP53 Arg72Pro and MDM2 309 G>T polymorphisms are not associated with breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers, *British Journal of Cancer* 101:1456-1460.
- Song CG, Fu FM, Wu XY, Wang CC, Shao ZM (2012) Correlation of polymorphism rs1563828 in MDM4 gene with breast cancer risk an onset age, *Chinese Journal of Surgery* 50:53-56.
- Soussi T (2010) The history of p53 A perfect example of the drawbacks of scientific paradigms, *Science and Society* 11:822-826.
- Sørliæ T, Peroua MC, Tibshirani R, Aasf T, Geislerg S, Johnsenb H, Hastie ET, Eisenh B, van de Rijni M, Jeffreyj SJ, Børresen-Daleb AL et al. (2011) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications, *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 98:10869-10874.
- Stoehr CG, Stoehr R, Wengers A, Hartmann A, Bertz S, Spath V et al.(2016) Homozygous G/G variant of SNP309 in the human MDM2 gene is associated with earlier tumor onset in Caucasian female renal cell carcinoma patients, *Oncogenesis* 5:e205.
- Swetzig WM, Wang J, Das GM (2016) Östrogen receptor alpha (ER α /ESR1) mediates the p53-independent overexpression of MDM4/MDMX and MDM2 in human breast cancer, *Oncotarget* 7:16049-16069.
- Tavasolli FA, Devilee P, *World Health Organization Classification of Tumors Band 4, Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs*, 1. Aufl. International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon 2003, S. 10-113.

- Thomas M, Kalita A, Labrecque S, Pim D, Banks L, Matlashewski G (1999) Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically, *Molecular and Cellular Biology* 19:1092-1100.
- Tommiska J, Eerola H, Heinonen M, Salonen L, Kaare M, Tallila J, Ristimäki A, von Smitten K, Aittomäki K, Heikkilä P, Blomqvist C, Nevanlinna H (2005) Breast cancer patients with p53 Pro72 homozygous genotype have a poorer survival, *Clinical Cancer Research* 11:5098-5103.
- Tsuda H, Iwaya K, Fukutomi T, Hirohashi S (1993) p53 mutations and c-erbB2 amplification in intraduktal and invasive breast carcinomas of high histologic grade, *Japanese Journal of Cancer Research* 84:294-401.
- Untch M, Gerber B, Möbus V, Schneeweis A, Thomssen C, von Minckwitz G (2011). St.-Gallen-Konferenz 2011 zum primären Mammakarzinom, *Meinungsbild deutscher Experten, Geburtshilfe und Frauenheilkunde Stuttgart* : Thieme, Bd. 71. S. 383-385.
- Untch M, Gerber B, Möbus V, Schneeweis A, Thomssen C, von Minckwitz G (2011). St.-Gallen-Konferenz 2011 zum primären Mammakarzinom, *Meinungsbild deutscher Experten Geburtshilfe und Frauenheilkunde Stuttgart* : Thieme, Bd. 71. S. 385-389.
- Vasema, Auerbach A, Czuchnowski DR, Bocklage T, Chabot-Richards D, Aguilera N, Hunt Karner K, *Diagnostic Pathology Molecular Oncology*, 1. Aufl. Elsevier, Philadelphia 2015, S. 8-186-195.
- Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, Kong N, Kammlott U, Lukacs C, Klein C, Fotouhi N, Liu EA (2004) In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2, *Science* 303:844-848.
- Venkitaraman AR (2001) Functions of BRCA1 and BRCA2 in the biological response to DNA damage, *Journal of Cell Science* 114:3591-3598.
- Wade M, Li YC, Wahl GM (2013) MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy; *Nature Reviews Cancer* 13:83-96.
- Wade M, Wang YV, Wahl GM (2010) The p53 orchestra: Mdm2 and Mdmx set the tone, *Trends in Cell Biology* 20:299-309.
- Wittekind C, Asamura H, Sobin LH, *TNM Atlas*, 6. Aufl. Wiley Blackwell, West Sussex, 2014, S.229-247.
- Wittekind C, Meyer HJ, *TNM, Klassifikation maligner Tumoren*, 7. Aufl. Wiley Blackwell, West Sussex, 2010, S. 169-179.
- Wu X, Bayle JH, Olson D, Levine AJ (1993) The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop, *Genes Development* 7:1126-1132.
- Wynendaele J, Böhnke A, Leucci E, Nielsen SJ, Lambertz I, Hammer S et al. (2010) An illegitimate microRNA target site within the 3' UTR of MDM4 affects ovarian cancer progression and chemosensitivity, *Cancer Research* 70:9641-9649.
- Xu Y, Yao L, Zhao A, Ouyang T, Li J, Wang T, Fan Z, Fan T, Lin B, Lu Y, Xie Y (2008) *International Journal of Cancer* 122:2761-2766.
- Zajac A, Smolarz B, Stachowiak G, Wilczyński JR (2014) TP53 and MDM2 polymorphisms and the risk of endometrial cancer in postmenopausal women, *Medical Oncology* 31:286.
- Zhang YW, Guan J, Zhang Y, Qiu YR, Chen LH (2012) Role of an MDM4 polymorphism in the early age of onset of nasopharyngeal carcinoma, *Ocology letters* 3:1115-1118.

8. Thesen

1. Polymorphismen im P53-Pathway haben einen signifikanten Einfluss auf das Erkrankungsalter sowie den Krankheitsverlauf.
2. Der Polymorphismus *P53* Codon 72 ist signifikant mit einem früheren Erkrankungsalter assoziiert.
3. Patienten mit dem G-Allel in *MDM2* SNP 309 erkranken, insbesondere in Abhängigkeit des Östrogenrezeptorstatus, signifikant früher.
4. Patienten mit dem C-Allel in *MDM2* SNP 285 haben ein vermindertes Risiko an einem Mammakarzinom zu erkranken, falls Sie erkranken, dann in einem vergleichsweise hohen Alter.
5. Patienten mit dem Polymorphismus *MDMX* SNP 31826 erkranken in Abhängigkeit des Östrogenrezeptorstatus signifikant früher.
6. *MDMX* SNP 34091 ist signifikant mit östrogenrezeptornegativen Mammakarzinomen assoziiert, die Patientinnen mit dem C-Allel erkranken später.
7. *LGR6 rs6678914* sind signifikant mit dem östrogenrezeptornegativen Mammakarzinom assoziiert, die Patientinnen mit dem G-Allel erkranken früher.

9. Lebenslauf

Marcus Bauer

Persönliche Daten

Geburtsdatum	13.10.1989
Geburtsort	Zwickau, Sachsen
Familienstand	ledig

Schulische Ausbildung

09/1996 – 07/2000	Dittes- Grundschule Wilkau-Haßlau
09/2000 – 07/2008	Gymnasium „Am Sandberg“ in Wilkau- Haßlau

Zivildienst

09/2008 – 08/2009	Kreiskrankenhaus Kirchberg GmbH
-------------------	---------------------------------

Studium

10/2009 – 11/2015	Studiengang Humanmedizin Martin- Luther- Universität Halle- Wittenberg
09/2011	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
10/2014	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
11/2014 – 00/2015	Praktisches Jahr
11/2015	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Beruf

seit 12/2015	AiW im Institut für Pathologie, Universitätsklinik Halle/Saale
--------------	-------------------------------------------------------------------

Danksagung

Zunächst einmal Danke ich Herrn PD Dr. Frank Bartel für die Überlassung des Themas, die zahlreichen Hilfestellungen und Diskussionen, sowie die gute Zusammenarbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Prof. Claudia Wickenhauser für die Unterstützung und die vielen wertvollen Ratschläge bedanken.

Mein Dank gilt des Weiteren den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Pathologie, allen voran Frau Dr. Anja Haak, Beate Heydel, Ilona Wiederhold und Sandra Erhardt für die Unterstützung bei der Durchführung der Versuche und den zahlreichen Hilfestellungen.

Mein besonderer Dank geht an Frau Dr. Martina Vetter und Frau Dr. Eva Kantelhardt für die Überlassung der Tumorproben und der klinisch-pathologischen Daten sowie der Unterstützung bei statistischen Fragestellungen.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Dr. Dorothea Darmer vom Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung für die Durchführung der vielen Sequenzierreaktionen bedanken.

Abschließend Danke ich meinen Freunden, meiner Familie und ganz besonders Matthias für die stetige Motivation und moralische Unterstützung.

Erklärung

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

Diese Dissertation wurde an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Begutachtung eingereicht. Des Weiteren habe ich mich selbst noch nicht um die Erlangung des Doktorgrades beworben.

Halle/Saale, den

Marcus Bauer