

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR FRAUENHEILKUNDE UND GEBURTSHILFE
PROF. DR. MED. OLAF ORTMANN
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

GENOTYPISIERUNG EINES POLYMORPHISMUS IM PROMOTOR DES ESRRAGENS BEI FRAUEN MIT KARZINOMEN DER BRUST ODER DES
GENITALTRAKTES

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Eleanor Keeton

2019

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR FRAUENHEILKUNDE UND GEBURTHSHILFE
PROF. DR. MED. OLAF ORTMANN
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

GENOTYPISIERUNG EINES POLYMORPHISMUS IM PROMOTOR DES ESRRA-
GENS BEI FRAUEN MIT KARZINOMEN DER BRUST ODER DES
GENITALTRAKTES

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Eleanor Keeton

2019

Dekan: Prof. Dr. med. Dipl. Phys. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Oliver Treeck

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Christa Büchler

Tag der mündlichen Prüfung: 07.02.2020

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	5
1.1	Mammakarzinom.....	5
1.1.1	Epidemiologie	5
1.1.2	Ätiologie und Risikofaktoren	5
1.1.3	Klinische und pathologische Klassifikation	6
1.1.4	Prognosefaktoren und molekulare Marker.....	9
1.2	Ovarialkarzinom	14
1.2.1	Epidemiologie	14
1.2.2	Ätiologie und Risikofaktoren	14
1.2.3	Klinische und pathologische Klassifikation	15
1.2.4	Prognosefaktoren und molekulare Marker.....	18
1.3	Endometriumkarzinom	19
1.3.1	Epidemiologie	19
1.3.2	Ätiologie und Risikofaktoren	20
1.3.3	Klinische und pathologische Klassifikation	21
1.3.4	Prognosefaktoren und molekulare Marker.....	24
1.4	Single nucleotide polymorphisms.....	25
1.5	Estrogen related receptor alpha	28
1.5.1	Aufbau, Charakteristiken und biologische Funktionen des Rezeptors.....	28
1.5.2	ESRRA in östrogenabhängigen Karzinomen.....	30
1.5.2.1	ESRRA beim Mammakarzinom.....	30
1.5.2.2	ESRRA beim Ovarialkarzinom	32
1.5.2.3	ESRRA beim Endometriumkarzinom	32
1.5.3	Agonisten und Antagonisten des ESRRA.....	35
1.6	Zielsetzung.....	37

Inhaltsverzeichnis

2. Material und Methoden	38
2.1 Patientenkollektiv	38
2.2 Materialien.....	39
2.3 SNP-Auswahl	43
2.4 Polymerase Chain Reaction.....	43
2.5 Tetra-Primer Amplification Refractory Mutation System-PCR	44
2.6 SNP-Primer	45
2.7 PCR-Ansatz	46
2.8 Agarosegelelektrophorese	48
2.9 Optimierungsversuche	50
2.9.1 Doppelter Ansatz	50
2.9.2 Ansatz für uneindeutige Proben.....	51
2.10 Methodenvalidierung	51
2.11 Quantitative Real Time PCR	52
2.12 Statistische Auswertung	53
2.12.1 Assoziationsstudien	54
2.12.2 Das Hardy-Weinberg-Equilibrium	55
2.12.3 Chi ² -Test und Fisher's Exact Test	55
2.12.4 Odds Ratio und Konfidenzintervall 95%	56
3. Ergebnisse.....	59
3.1 Ergebnisse zur Kontrollgruppe	59
3.2 Ergebnisse zum Mammakarzinom	60
3.2.1 Assoziation des SNPs rs72924108 mit dem Mammakarzinom	60
3.2.2 Assoziation des SNPs rs72924108 mit dem Mammakarzinom nach Alterskorrektur.....	63
3.2.3 Assoziation des SNPs rs72924108 mit klinisch-pathologischen Merkmalen des Mammakarzinoms.....	65

Inhaltsverzeichnis

3.2.3.1	Assoziation des SNPs rs72924108 mit der Tumogröße	67
3.2.3.2	Assoziation des SNPs rs72924108 mit dem Nodalstatus	69
3.2.3.3	Assoziation des SNPs rs72924108 mit dem Grading.....	72
3.2.3.4	Assoziation des SNPs rs72924108 mit dem Her2-Rezeptorstatus	74
3.2.3.5	Assoziation des SNPs rs72924108 mit dem Hormonrezeptorstatus	76
3.3	Ergebnisse zum Ovarialkarzinom.....	80
3.3.1	Assoziation des SNPs rs72924108 mit dem Ovarialkarzinom	80
3.3.2	Assoziation des SNPs rs72924108 mit dem Ovarialkarzinom nach Alterskorrektur.....	83
3.3.3	Assoziation des SNPs rs72924108 mit dem Grading	85
3.4	Ergebnisse zum Endometriumkarzinom.....	88
3.4.1	Assoziation des SNPs rs72924108 mit dem Endometriumkarzinom	88
3.4.2	Assoziation des SNPs rs72924108 mit dem Endometriumkarzinom nach Alterskorrektur.....	91
3.4.3	Assoziation des SNPs rs72924108 mit dem Grading	93
4	Diskussion	96
4.1	Methoden zur Genotypisierung von SNPs	96
4.2	Bedeutung von ESRRA und dessen Polymorphismen in der Forschung	97
4.3	Mammakarzinom.....	99
4.3.1	Der SNP rs72924108 als Risikofaktor für das Mammakarzinom	99
4.3.2	Der SNP rs72924108 in Verbindung mit klinisch-pathologischen Merkmalen des Mammakarzinoms	100
4.4	Ovarialkarzinom	101
4.4.1	Der SNP rs72924108 als Risikofaktor für das Ovarialkarzinom.....	101
4.4.2	Der SNP rs72924108 in Verbindung mit klinisch-pathologischen Merkmalen des Ovarialkarzinoms	102
4.5	Endometriumkarzinom	103

Inhaltsverzeichnis

4.5.1	Der SNP rs72924108 als Risikofaktor für das Endometriumkarzinom.....	103
4.5.2	Der SNP rs72924108 in Verbindung mit klinisch-pathologischen Merkmalen Merkmale des Endometriumkarzinoms	104
5	Zusammenfassung und Ausblick	106
6	Anhang	108
6.1	Abkürzungsverzeichnis	108
6.2	Tabellenverzeichnis.....	111
6.3	Abbildungsverzeichnis.....	114
7	Literatur.....	117

Einleitung

1. Einleitung

1.1 Mammakarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das Mammakarzinom ist laut der World Health Organization (WHO) sowohl die am häufigsten diagnostizierte als auch die am häufigsten zum Tode führende Krebserkrankung der Frau. Im Jahr 2012 wurden weltweit 1,7 Millionen neue Fälle diagnostiziert und 0,5 Millionen Frauen starben an der Erkrankung (1). Das Karzinom kommt auch bei Männern vor, diese machen jedoch mit 1% nur einen Bruchteil der Erkrankten aus (2).

1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Bei der Entstehung des Mammakarzinoms muss man zwischen den sporadisch auftretenden und den familiär gehäuften Fällen unterscheiden. In die zuletzt genannte Gruppe fallen sowohl Patientinnen mit einem hereditären Mammakarzinom, bei der die Ursache in einer Keimbahnmutation eines Gens liegt, als auch Patientinnen, bei denen zwar eine familiäre Belastung jedoch keine Genmutation vorliegt. Es ist schon eine Reihe von Genen identifiziert worden, deren Mutationen mit dem Mammakarzinom assoziiert sind. Am besten bekannt sind wohl die BRCA1- oder BRCA2-Gene. Diese werden autosomal-dominant vererbt, sodass bei einem betroffenen Elternteil, eine 50%-ige Chance auf weitere Vererbung an Nachkommen besteht. Betroffene haben nicht nur ein deutlich erhöhtes Mammakarzinom- sondern auch Ovarialkarzinomrisiko. Im Falle einer Mutation des BRCA1-Gens liegt das mittlere Risiko bis zum 70. Lebensjahr an einem Mammakarzinom zu erkranken bei etwa 65%, beim BRCA2-Gen fällt das Risiko mit 45% etwas geringer aus (3). Es existiert aber auch eine Reihe weiterer Gene und Syndrome, die mit einem erhöhten Mammakarzinomrisiko in Zusammenhang stehen. Beispiele sind das Li-Fraumeni-Syndrom (TP53-Genmutation), das Cowden-Syndrom (phosphatase and tensin homolog (PTEN)-Genmutation), partner and localizer of BRCA2 (PALB2)-Genmutationen, RAD51C- und checkpoint kinase 2 (CHEK2)-Genmutationen (4,5).

Einleitung

Dem Großteil der Mammakarzinome liegt aber eine multifaktorielle Genese zugrunde. Es sind Faktoren bekannt, deren risikosteigernde Wirkung für die Genese des Mammakarzinoms wissenschaftlich belegt ist. Zunächst muss dem Alter eine bedeutende Rolle zugeschrieben werden, da das Risiko mit steigendem Lebensalter zunimmt (6). Da die Brustdrüse unter dem hormonellen Einfluss weiblicher Sexualhormone steht, steigern endokrinologische Faktoren, wie beispielsweise die Nulliparität bzw. ein spätes Lebensalter bei der ersten Schwangerschaft, eine frühe Menarche und späte Menopause das Risiko. Umgekehrt sollen Frauen, die ihr erstes Kind schon früh auf die Welt bringen und länger Stillen ein niedrigeres Erkrankungsrisiko haben (6,7). Der Einfluss einer exogenen Östrogenexposition, etwa im Rahmen einer Hormontherapie oder der Einnahme oraler Kontrazeptiva, auf die Brustdrüse wurde ebenfalls untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Hormontherapie mit einem erhöhten Risiko zur Entwicklung eines Mammakarzinoms in Verbindung steht (8,9). Im Gegensatz dazu sind die Daten zur Einnahme oraler Kontrazeptiva unklar (10–12). Schließlich geben auch weitere anamnestische Daten bzw. Umwelt- und Lebensstilfaktoren Hinweise: vorangegangene benigne Erkrankungen der Brust, postmenopausale Adipositas und Strahlenexposition gehen mit einem erhöhten Risiko einher (6).

1.1.3 Klinische und pathologische Klassifikation

Die Bezeichnung invasive ductal carcinoma, not otherwise specified wurde in der vierten Ausgabe der WHO Klassifizierung von Mammakarzinomen zugunsten des Begriffes des invasive breast carcinoma of no special type (NST) abgelöst. In Abgrenzung dazu werden spezifische Subtypen unterschieden, z.B. das invasive lobuläre Karzinom. Einen Sonderfall stellt das Karzinom vom gemischten Typ dar, das zum Teil Charakteristika des NST, zum anderen der spezifischen Karzinome besitzt (13).

Im klinischen Alltag wird die TNM-Klassifikation herangezogen, um festzulegen in welchem Stadium sich ein Karzinom befindet. Man spricht in diesem Zusammenhang vom Staging. Dabei werden die Tumogröße (T) in cm, der Lymphknotenbefall bzw. Nodalstatus (N) und die Metastasierung (M) berücksichtigt (Tabelle 1). Im Vergleich dazu wird der Differenzierungsgrad, das Grading (G), genutzt, um anzugeben wie stark sich das veränderte Gewebe vom ursprünglichen Gewebe unterscheidet. Anhand der Tubulusbildung, der Anzahl der Mitosen und der Kernpolymorphie kommt man zu

Einleitung

einem Differenzierungsgrad zwischen eins und drei (Tabelle 2) (14). Die aktuellste (achte) Auflage des Klassifikationssystems des American Joint Commission of Cancer (AJCC) für das Mammakarzinom berücksichtigt u.A. die Steroidhormonrezeptoren und den human epidermal growth factor receptor 2 (Her2) beim Staging. Diese sind im Gegensatz zu den anderen eben erwähnten Tumormerkmalen nicht anatomische Charakteristika, sondern molekulare Marker und werden im nächsten Abschnitt näher beschrieben (15).

Tabelle 1: TNM-Klassifikation und Union Internationale Contre le Cancer (UICC)-Stadien des Mammakarzinoms (in Anlehnung an Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) 2018) (5)

TNM-Klassifikation	UICC-Stadium
TX: Primärtumor kann nicht beurteilt werden	0: Tis N0 M0
T0: Kein Anhalt für Primärtumor	IA: T1 N0 M0
Tis: Carcinoma in situ <ul style="list-style-type: none">- Tis (DCIS): Duktales Carcinoma in Situ- Tis (LCIS): Lobuläres Carcinoma in Situ- Tis (Paget): M. Paget der Mamille ohne nachweisbaren Tumor	IB: T0+1 N1mi MO IIA: T0+1 N1 M0 und T2 N0 M0 IIB: T2 N1 M0 und T3 N0 M0 IIIA: T0-2 N2 M0 und T3 N1+2 M0 IIIB: T4 N0-2 M0 IIIC: alle T, N3, M0 IV: alle T, alle N, M1 (T1 schließt T1mi ein)
T1: Tumor ≤2 cm im größten Durchmesser <ul style="list-style-type: none">- T1mi: <0,1 cm- T1a: 0,1-0,5 cm- T1b: 0,5-1 cm- T1c: 1-2 cm	
T2: Tumor >2 cm ≤5 cm	
T3: Tumor >5 cm	
T4: Tumor jeder Größe mit direkter Ausdehnung auf Brustwand oder Haut <ul style="list-style-type: none">- T4a: Ausdehnung auf Brustwand (Rippen, Interkostalmuskulatur, vorderer Serratusmuskel, nicht jedoch auf Pectoralmuskulatur)- T4b: Ödem (einschließlich „peau d'orange“) oder Ulzeration der Brusthaut	

Einleitung

<p>oder Satellitenknötchen der Haut der gleichen Brust</p> <ul style="list-style-type: none">- T4c: Kriterien 4a und 4b- T4d: entzündliches (inflammatorisches) Karzinom	
<p>Nx: Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden</p> <p>N0: Keine Lymphknoten befallen</p> <p>pN1mi: Mikrometastasen</p> <p>N1: Metastase(n) in beweglichen ipsilateralen axillären Lymphknoten Level I und II</p> <p>N2: Metastase(n) in ipsilateralen axillären Lymphknoten der Level I und II, untereinander oder an anderen Strukturen fixiert (N2a) oder in klinisch erkennbaren ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna in Abwesenheit klinisch erkennbarer axillärer Lymphknotenmetastasen (N2b)</p> <p>N3: Metastase(n) in ipsilateralen infraklavikulären Lymphknoten (Level III) mit oder ohne Beteiligung der axillären Lymphknoten des Level I und II (N3a), oder in klinisch erkennbaren ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna in Anwesenheit axillärer Lymphknotenmetastasen des Level I und II (N3b) oder Metastase(n) in ipsilateralen supraklavikulären Lymphknoten mit oder ohne Beteiligung der axillären Lymphknoten oder der Lymphknoten entlang der A. mammaria interna (N3c)</p>	
<p>M0: Keine Fernmetastasen</p> <p>M1: Fernmetastasen</p>	

Einleitung

Tabelle 2: Kriterien zur Festlegung des Differenzierungsgrades des Mammakarzinoms (in Anlehnung an Elston C & Ellis I 1991) (14)

Tubulusbildung	Kernpolymorphie	Mitoserate – je nach Mikroskopfläche variabel, z.B. Leitz Ortholux x25 Objektiv	Score
Großteil des Tumors (>75%)	Kleine, regelmäßig geformte Zellen	0-9	1
Moderat (10-75%)	Moderate Zunahme in Größe und Variabilität	10-19	2
Wenig bis gar nicht (<10%)	Hohe Variabilität	>20	3
Bewertung des Scores: 3-5 Punkte: Grading 1 (gut differenziert) 6-7 Punkte: Grading 2 (mittelgradig differenziert) 8-9 Punkte: Grading 3 (undifferenziert)			

1.1.4 Prognosefaktoren und molekulare Marker

Es ist schon eine Reihe von Faktoren identifiziert worden, die die Prognose des Mammakarzinoms beeinflussen. Dazu gehören die bereits erwähnte Tumorgröße und die Anzahl an betroffenen Lymphknoten (16). Weiterhin spielt der Differenzierungsgrad eine Rolle (14). Diese drei genannten Faktoren waren bei der Bildung des Nottingham Prognostic Index maßgebend. Dabei wurde festgelegt, dass ein hoher Index mit einer schlechteren Prognose korreliert (17). Zusätzlich nehmen laut aktueller Leitlinie die Fernmetastasierung, der Resektionsrandstatus, der histologische Subtyp, die peritumorale Lymphgefäßinvasion, das Alter, der Proliferationsindex Ki-67 und der Status der verschiedenen Rezeptoren Einfluss auf die Prognose (5).

Beim Mammakarzinom gilt es den Östrogenrezeptor- (ER), den Progesteronrezeptor- (PR) und den Her2-Status zu bestimmen, da diese sowohl prognostischen als auch prädiktiven Wert haben. Dies bedeutet, dass sie sowohl eine prognostische Aussagekraft besitzen als auch das Ansprechen der Patientin auf eine medikamentöse

Einleitung

Hormon- bzw. Antikörper- oder Chemotherapie vorhersagen können. Der ER- und PR-Status werden immunhistochemisch bestimmt, der Her2-Rezeptorstatus kann zusätzlich über die Methode der fluoreszenten in-Situ-Hybridisierung bzw. der chromogenen in-Situ-Hybridisierung festgelegt werden (5). Ein Mammakarzinom wird dann als ER- bzw. PR-positiv bezeichnet, wenn mindestens 1% der Zellen in der Immunhistochemie positiv sind (18). Außerdem können Scores angegeben werden, die aus der Farbintensität und dem Prozentsatz positiver Zellkerne gebildet werden. Man unterscheidet den Immunreaktiven Score (IRS) (19) und den Allred-Score (20) (Tabelle 3). Tumore die einen positiven Hormonrezeptorstatus aufweisen, können gezielt antihormonell behandelt werden und haben somit eine bessere Prognose. Dagegen wird der Her2-Status, der zur Gruppe der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren gehört, über einen komplizierten Algorithmus bestimmt, woraus ebenso ein Score gebildet wird. Ab einem Score von drei geht man von einem Her2-positiven Tumor aus, bei denen sich die Möglichkeit zu einer Antikörpertherapie mit Trastuzumab (Herceptin©) ergibt (5). Wird dann noch der Ki-67-Status festgelegt, erhält man eine Einteilung in intrinsische Subtypen (Tabelle 4), anhand derer die Indikation zur endokrinen Therapie bzw. Chemotherapie festgelegt werden kann (21). Dennoch zeigt die Studienlage, dass es noch Probleme bei der Verwendung des Proliferationsindexes Ki-67 als Prognosefaktor gibt. Es existiert weder eine standardisierte Methode zu Erhebung des Markers noch wird ein einheitlicher Grenzwert definiert (5). Möchte man mehrere der genannten Prognosefaktoren im Zusammenhang betrachten, kann man die St. Gallener Risikoeinteilung von 2007 verwenden (Tabelle 5) (22).

Einleitung

Tabelle 3: Immunhistochemische Scores zur Hormonrezeptorbewertung des Mammakarzinoms (in Anlehnung an das Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) 2018) (5)

Prozentsatz positiver Zellkerne		Farbintensität	Score
IRS			
Keine	0 Punkte	Keine Farbreaktion	IRS=Prozentsatz positiver Zellkerne x Farbintensität (0-12 Punkte)
<10%	1 Punkt	Schwache Färbereaktion	
10-50%	2 Punkte	Mäßige Färbereaktion	
51-80%	3 Punkte	Färbereaktion	
>80%	4 Punkte	Starke Färbereaktion	
Allred-Score			
Keine	0 Punkte	Keine Farbreaktion	Allred Score=Prozentsatz positiver Zellkerne + Farbintensität (0-8 Punkte)
<1%	1 Punkt	Schwache Färbereaktion	
1-10%	2 Punkte	Mäßige Färbereaktion	
11-33%	3 Punkte	Starke Färbereaktion	
34-66%	4 Punkte	Färbereaktion	
>66%	5 Punkte	Starke Färbereaktion	

Einleitung

Tabelle 4: Einteilung der Mammakarzinome anhand des Hormon-, Her2- und Ki-67-Status und Indikation zur endokrinen bzw. Chemotherapie (in Anlehnung an Goldhirsch A et al. 2011) (21)

(Intrinisischer) Subtyp	Klinisch-pathologische Definition
Luminal A	ER- und/oder PR-positiv, Her2-negativ und Ki-67 niedrig (<14 %)
Luminal B	Her2-negativ: ER- und/oder PR-positiv und Her2-negativ und Ki-67 hoch Her2-positiv: ER- und/oder PR-positiv, Her2 überexprimiert oder amplifiziert, jedes Ki-67
Her2-Überexpression	Her2 überexprimiert oder amplifiziert, ER- und PR-negativ
'Basal-like'	ER-, PR- und Her2-negativ

Einleitung

Tabelle 5: St. Gallener Risikoeinteilung für operierte Mammakarzinome von 2007 (in Anlehnung an Goldhirsch A et al. 2007) (22)

Risiko	Merkmale
Niedriges Risiko	<p>Nodal-negativ und ALLE anderen Bedingungen:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tumogröße ≤ 2cm • Grading 1 • Keine peritumorale vaskuläre Invasion • ER und/oder PR exprimiert • Her2 weder überexprimiert noch amplifiziert • Alter ≥35 Jahre
Mittleres Risiko	<p>Nodal-negativ UND mindestens eines der folgenden Bedingungen:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tumogröße >2cm • Grading 2-3 • Peritumorale vaskuläre Invasion • ER und/oder PR abwesend • Her2 überexprimiert oder amplifiziert • Alter <35 Jahre <p>Nodal-positiv (1-3 Lymphknoten befallen) UND</p> <ul style="list-style-type: none"> • ER und/oder PR exprimiert • Her2 weder überexprimiert noch amplifiziert
Hohes Risiko	<p>Nodal-positiv (1-3 Lymphknoten befallen) UND</p> <ul style="list-style-type: none"> • ER und PR abwesend ODER • Her2 überexprimiert oder amplifiziert <p>Nodal-positiv (4 oder mehr befallene Lymphknoten)</p>

Schließlich existieren dank Genexpressionsanalysen noch weitere Möglichkeiten. Diese werden im klinischen Alltag bei Patientinnen angewendet, bei denen die Indikation zu einer Chemotherapie überprüft werden soll. Oncotype DX® ist ein Beispiel für einen Multigentest, der 21 Gene mittels eines reverse-transcriptase polymerase chain reaction-Assays untersucht. Anhand dieser Ergebnisse wird der Recurrence Score gebildet, der eine Zuordnung in eine niedrige, mittlere oder hohe Risikogruppe erlaubt. Die Zielgruppe des Tests sind Patientinnen mit einem Mammakarzinom mit

Einleitung

freien Lymphknoten sowie einer Tamoxifenbehandlung bei ER-Positivität. Die anfänglichen Daten zum Oncotype DX® zeigten bereits, dass mithilfe des Tests sowohl eine Aussage über die Rezidivrate, als auch über den Nutzen einer Chemotherapie bei diesen Patientinnen getroffen werden kann. Jedoch bestand noch Unsicherheit bezüglich der Gruppe, die mit einem mittleren Risiko klassifiziert wurden (23,24). Aktueller ist jedoch die kürzlich veröffentlichte TAILORx Studie, in der die mittlere Risikogruppe den größten prozentualen Anteil einnahm. Im Hinblick auf das krankheitsfreie Überleben und die Mortalität innerhalb dieses Patientinnenkollektivs konnte zwar kein Unterschied zwischen der endokrinen Therapie alleine und der Kombination aus einer endokrinen und Chemotherapie festgestellt werden. Jedoch profitierten in einer Subgruppenanalyse jüngere (<50 Jahre) Frauen von der zusätzlichen Chemotherapie (25).

1.2 Ovarialkarzinom

1.2.1 Epidemiologie

Nach dem Mammakarzinom ist das Ovarialkarzinom die am häufigsten zu Tode führende gynäkologische Krebserkrankung und der achthäufigste bösartige Tumor, der bei Frauen in Deutschland auftritt. Das Lebenszeitrisiko einer Frau diese Erkrankung zu erleiden beträgt 1:71 (2). Weltweit steht die Erkrankung an siebter Stelle der häufigsten Krebserkrankungen bei Frauen (1).

1.2.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Zunächst spielt, wie bei allen Krebserkrankungen, die Genetik bei der Genese eine Rolle. In etwa 5-10% der Fälle lässt sich die Erkrankung auf hereditäre Ursachen zurückführen. Am häufigsten sind Mutationen im BRCA1- und BRCA2-Gen verantwortlich, aber auch das hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC)- oder Li-Fraumeni-Syndrom stehen mit der Erkrankung im Zusammenhang (4). Das Risiko von Trägerinnen des BRCA1- bzw. BRCA2-Gens ein Ovarialkarzinom zu entwickeln wird dabei auf 39 bzw. 11% geschätzt (3). Betrachtet man die Datenlage ist es aber offenbar nicht ausreichend Risikopatientinnen nur auf BRCA1- und BRCA2-Mutationen zu testen. Es ist nämlich eine Vielzahl anderer Risikogene identifiziert worden. Neben den bekannten BRCA1- und BRCA2-Mutationen wurden in zwei Studien weitere Genmutationen einerseits bei Patientinnen mit einem primären

Einleitung

Ovarialkarzinom andererseits bei Patientinnen mit einem Rezidiv gefunden (26,27). Eine familiäre Häufung ist auch ein nennenswerter Risikofaktor (7).

Des Weiteren existiert eine Reihe von Risikofaktoren, die die Wahrscheinlichkeit zu erkranken steigern. Ähnlich wie beim Mammakarzinom können endo- und exogene Einflüsse auf den Östrogenhaushalt das Risiko erhöhen oder vermindern. In dieser Hinsicht sind natürlich auch die Menarche und das Alter bei Eintritt der Menopause interessant, allerdings wird in der aktuellen Leitlinie von keinem Zusammenhang berichtet (28). Eine protektive Wirkung weist die Multiparität auf (7). Auch eine Sterilisation führt zu einer Senkung des Risikos (29). Exogene Einflüsse auf den Hormonhaushalt wurden ebenso untersucht. Dabei wird die hormonelle Therapie mit einem erhöhten Risiko in Zusammenhang gebracht (30). Im Gegensatz dazu verringert die Einnahme oraler Kontrazeptiva die Wahrscheinlichkeit für ein Ovarialkarzinom (31). Die Adipositas und das polyzystische Ovarialsyndrom gelten auch als Risikofaktoren (7).

1.2.3 Klinische und pathologische Klassifikation

Die TNM-Klassifikation und die Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO)-Stadien ermöglichen die nähere Beschreibung eines Ovarialkarzinoms. Das Tuben- und das primäre Peritonealkarzinom werden im selben Klassifikationssystem aufgeführt (Tabelle 6).

Das Grading wird benutzt, um den Differenzierungsgrad des Tumors näher zu beschreiben und wird anders als beim Mammakarzinom festgelegt, da es vom histopathologischen Subtyp abhängig ist (Tabelle 7).

Tabelle 6: TNM-Klassifikation und FIGO-Stadien der Tumoren des Ovars, der Tube und des primären peritonealen Karzinoms (in Anlehnung an Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) 2019) (28)

TNM-Klassifikation	FIGO-Stadium
TX Primärtumor nicht bekannt, keine Angaben möglich	
T0 Kein Anhalt für einen Tumor	
T1 Tumor auf Ovarien oder Tuben begrenzt	I
- T1a: Tumor auf ein Ovar oder eine Tube beschränkt (Kapsel oder Serosa intakt), Ovar- oder Tubenoberfläche tumorfrei, negative Spülzytologie	IA

Einleitung

<ul style="list-style-type: none"> - T1b: Befall beider Ovarien oder beider Tuben (Kapsel oder Serosa intakt), Ovar- oder Tubenoberfläche tumorfrei, negative Spülzytologie - T1c: Tumor auf ein oder beide Ovarien oder Tuben begrenzt, mit Nachweis einer iatrogenen Kapsel- oder Serosaruptur (T1c1) oder einer präoperativen Kapsel- oder Serosaruptur oder Tumor auf der Ovar- oder Tubenoberfläche (T1c2) oder maligne Zellen im Aszites oder in der Spülzytologie nachweisbar (T1c3) 	<p>IB IC1/IC2/IC3</p>
<p>T2: Tumor der Ovarien oder Tuben mit zytologisch oder histologisch nachgewiesener Ausbreitung in das kleine Becken oder primäres Peritonealkarzinom</p> <ul style="list-style-type: none"> - T2a: Ausbreitung und/oder Tumormetastasen auf Uterus und/oder Tuben und/oder Ovarien - T2b: Ausbreitung auf weitere intraperitoneale Strukturen im Bereich des kleinen Beckens 	<p>II IIA IIB</p>
<p>T3 und/oder N1: Tumor befällt ein oder beide Ovarien oder Tuben oder primäres Peritonealkarzinom mit zytologisch oder histologisch nachgewiesener Ausbreitung außerhalb des kleinen Beckens und/oder retroperitoneale Lymphknotenmetastasen</p> <p>T3: Nur retroperitoneale Lymphknotenmetastasen</p> <p>N1a: Metastasen ≤10 mm</p> <p>N1b: Metastasen >10 mm</p> <p>T3a jedes N: mikroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen</p> <p>T3b jedes N: makroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens ≤2 cm mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen</p> <p>T3c jedes N: makroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens >2 cm mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen; schließt eine Ausbreitung auf die Leberkapsel und/oder Milzkapsel ein</p>	<p>III IIIA1i IIIAii IIIA2 IIIB IIIC</p>

Einleitung

M1: Fernmetastasen mit Ausnahme peritonealer Metastasen M1a: Pleuraerguss mit positiver Zytologie M1b: Parenchymale Metastasen der Leber und/oder der Milz, Metastasen in außerhalb des Abdomens gelegenen Organen (einschließlich inguinaler Lymphknotenmetastasen und/oder anderer außerhalb des Abdomens gelegener Lymphknotenmetastasen)	IV IVA IVB
--	------------------

Tabelle 7: Graduierung der Ovarialkarzinome (in Anlehnung an Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) 2019) (28)

Histologischer Subtyp	Graduierung			Bemerkung
Serös	Low-grade (G1)		High-grade (G3)	
Muzinös	-		Keine einheitliche Graduierung	
Seromuzinös				
Endometrioid	G1	G2	G3	Analog dem Endometrium
Klarzellig	G3		Immer als G3 klassifiziert	

Hinsichtlich der Histopathologie können mehrere Arten von Ovarialkarzinomen unterschieden werden, die in Tabelle 8 dargelegt werden. Möglich ist aber auch eine Einteilung in Typ I bzw. Typ II Tumore. Diese zwei Gruppen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Entstehung: während Typ I Tumore über eine längere Zeit entstehen, entwickeln sich Typ II Tumore schneller und metastasieren frühzeitig (32).

Je nach pathologischer Entität können unterschiedliche genetische Besonderheiten und Prognosen festgestellt werden. Dabei werden die high-grade serösen Karzinome, die mit 70% den Großteil aller ausmachen, von vier anderen Subtypen unterschieden. Die restlichen 30% verteilen sich auf die endometrioiden und klarzelligen Tumore, die beide jeweils 10% aller Ovarialkarzinome darstellen und auf die muzinösen (3%) und low-grade serösen Tumore (<5%). Wichtig ist die Feststellung, dass alle fünf Subtypen jeweils ein eigenständiges Karzinom mit wichtigen Besonderheiten darstellen (33).

Einleitung

Tabelle 8: Ovarialkarzinome nach Histologie (in Anlehnung an Prat J 2012) (33)

	High grade serös	Low grade serös	Muzinös	Endometrioid	Klarzellig
Risikofaktoren	BRCA1/2	?	?	HNPCC	?
Genetische Besonderheiten	BRCA1/2, p53	BRAF, KRAS	KRAS, Her2	PTEN, AT-rich interactive domain-containing protein 1A (ARID1A)	Hepatocyte nuclear factor-1 (HFN-1), ARID1A
Ansprechen auf Chemotherapie	Gut	Mittel	Schlecht	Gut	Schlecht
Prognose	Schlecht	Mittel	Günstig	Günstig	Mittel

1.2.4 Prognosefaktoren und molekulare Marker

Das Ovarialkarzinom wird meistens in einem schon fortgeschrittenen Stadium entdeckt, mehr als 60% der Patientinnen befinden sich bei Erstdiagnose im Stadium T3, weshalb die Prognose mit einer 5-Jahresüberlebensrate von 41% gering ist (2). Gründe sind beispielsweise die Tatsache, dass die Erkrankung sich nicht mit Frühsymptomen präsentiert (7). Aktuell werden für Patientinnen ohne Risiken für ein erbliches Ovarialkarzinom keine Screeningverfahren empfohlen, da z.B. das Durchführen eines transvaginalen Ultraschalls oder die Bestimmung des Tumormarkers CA 125 im Serum nicht die Mortalität senken kann (28).

Wenn es um die Einschätzung der Prognose geht, sind das Tumorstadium, der Tumorrest nach Resektion, das Alter, der Allgemeinzustand, die Histologie, das Grading und die leitliniengerechte Therapie von Bedeutung (28). Die Forschung bemüht sich jedoch um die Identifikation molekularer Marker, die als Prognose- bzw. prädiktive Faktoren dienen könnten, und damit auch einen therapeutischen Angriffspunkt darstellen. Denn außer Bevacizumab existiert bis jetzt keine zielgerichtete Therapie beim Ovarialkarzinom. Die Verabreichung des monoklonalen Antikörpers gegen den vascular endothelial growth factor (VEGF) als

Einleitung

Angiogenesehemmer wird im fortgeschrittenen Stadium und in der Rezidivsituation empfohlen (28).

Trotz einer großen Anzahl durchgeföhrter Studien zu diesem Thema, wird im klinischen Alltag – im Gegensatz zum Mammakarzinom – nicht zur Bestimmung solcher Marker geraten (28). Beispielsweise wurde schon öfter untersucht, ob die Expression von Her2, ein etablierter Prognosefaktor des Mammakarzinoms, auch beim Ovarialkarzinom bedeutend für die Prognose ist. Während manche Autoren von keinem Zusammenhang berichten (34), kommen andere zu dem Ergebnis, dass eine Her2-Expression mit einer schlechteren Prognose verbunden ist (35,36). Eine kürzlich erschienene Metaanalyse über 56 Studien bestätigt jedoch letztere Aussage (37). Außerdem wurde die Rolle des Tumorsuppressorgens p53 mehrfach überprüft. Auch in diesem Fall ist die Datenlage sehr widersprüchlich. Einerseits wurde festgestellt, dass dessen Überexpression mit einer verbesserten Prognose zusammenhängt (34), andererseits konnte kein Zusammenhang nachgewiesen werden (36) bzw. genau das Gegenteil wurde belegt (38). Solche Marker sind auch dann von Bedeutung, wenn deren Expression mit dem Ansprechen auf eine Chemotherapie korreliert, weshalb dies auch schon Gegenstand der Forschung war (39,40). Auch hier bleibt abzuwarten, ob die Literatur konkrete und klinisch anwendbare Empfehlungen diesbezüglich aussprechen kann.

Schließlich bleibt noch die Hoffnung auf neue Entwicklungen im Bereich der Genexpressionsanalysen. Im Bereich der Therapie des Mammakarzinoms sind diese schon im klinischen Alltag integriert. Beziiglich dem Ovarialkarzinom sind auch schon Studien zu diesem Thema durchgeföhrten worden, die vielversprechende Ergebnisse zeigen (41,42).

1.3 Endometriumkarzinom

1.3.1 Epidemiologie

Das Endometriumkarzinom, auch Korpuskarzinom genannt, ist das vierhäufigste Karzinom und das häufigste Karzinom des Genitaltraktes, das bei Frauen in Deutschland auftritt (2). Weltweit stellt sich die Situation allerdings anders dar: Das Endometriumkarzinom steht an sechster Stelle der am häufigsten vorkommenden Krebserkrankungen der Frau (1).

Einleitung

Hinsichtlich der Endometriumkarzinom bedingten Mortalität lässt sich die Aussage treffen, dass diese vergleichsweise niedrig ist, da diese Krebserkrankung mit einer besseren Prognose verbunden ist (2).

1.3.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Auch bei dieser malignen Tumorerkrankung spielt die Genetik eine Rolle. Bei den hereditären Endometriumkarzinomen sind das HNPCC- und PTEN-Hamartom-Syndrom am häufigsten für eine Erkrankung verantwortlich (43).

Das Endometriumkarzinom ist zudem eine Erkrankung, die vorwiegend in einem höheren Lebensalter auftritt (mittleres Erkrankungsalter 69 Jahren) und das Alter gilt als ein Risikofaktor für das Auftreten dieses Karzinoms (2,7).

Bereits die Einteilung der Karzinome in entweder östrogenabhängige- oder östrogenunabhängige Karzinome (44) lässt vermuten, dass der Hormonhaushalt eine wichtige Rolle bei der Entstehung des Endometriumkarzinoms spielt. Es hat sich herausgestellt, dass eine exogene Östrogenzufuhr im Rahmen einer Hormontherapie das Risiko ein Endometriumkarzinom zu erleiden erhöht (45). In der Million Women Study wurden die Auswirkungen einer Hormontherapie untersucht. Dabei konnten die negativen Auswirkungen einer Östrogen- oder Tibolontherapie gezeigt werden. Bezuglich der kombinierten postmenopausalen Hormontherapie wurden zwei Möglichkeiten betrachtet, zum einen die kontinuierliche kombinierte Hormontherapie und zum anderen die zyklische Applikation eines synthetischen Gestagens zusätzlich zum Östrogen. In der ersten Gruppe wurde das Risiko durch die kontinuierliche Hormontherapie gesenkt, in der zweiten Gruppe konnte kein Unterschied festgestellt werden. Vor allem in Subgruppen von adipösen Frauen konnten die positiven Effekte des synthetischen Gestagens auf das Endometrium dargelegt werden (46). Aus diesen und weiteren durchgeführten Studien zu diesem Thema zieht die aktuelle Leitlinie den Entschluss, dass eine Hormontherapie ohne Gestagenschutz nicht verabreicht werden soll. Die Risiken einer kombinierten Hormontherapie variieren je nach der Dauer der Behandlung, Applikationsform (kontinuierlich- oder sequenziell-kombiniert) und dem zugeführten Gestagen (43).

Im Hinblick auf orale Kontrazeptiva gilt, dass diese protektiv wirken (47–49).

Eine Behandlung mit Tamoxifen, die im Rahmen der Therapie eines Mammakarzinoms durchgeführt wird, hat ebenfalls risikosteigernde Auswirkungen (50).

Einleitung

Weitere Risikofaktoren, die zu einer erhöhten Exposition gegenüber Östrogenen führen oder auf erhöhte Östrogenspiegel zurückzuführen sind, sind z.B. die Adipositas, Endometriumhyperplasien, die Nulliparität, eine frühe Menarche und späte Menopause, Granulosazelltumore, das polyzystische Ovarialsyndrom oder eine Leberzirrhose. Kaaks et al. stellen die genauen Zusammenhänge der Hormone, die für die Risikoerhöhung verantwortlich sind, im Rahmen einer Adipositas sehr ausführlich dar (51). Diabetikerinnen und Patientinnen im Zustand nach einer Beckenbestrahlung haben auch ein erhöhtes Risiko. Im Vergleich dazu stellen eine späte Menarche und Intrauterinpressare – sowohl die Kupfer- als auch die Levonorgestrel freisetzende Hormonspirale – protektive Faktoren dar (2,7,43).

1.3.3 Klinische und pathologische Klassifikation

Wie beim Ovarialkarzinom werden auch beim Endometriumkarzinom die TNM-Klassifikation und die FIGO-Stadien herangezogen, um die Krebserkrankung genau zu definieren. Tabelle 9 zeigt, wie anhand der TNM-Klassifikation Rückschlüsse auf das Stadium gezogen werden können.

Einleitung

Tabelle 9: FIGO-Stadien und TNM-Klassifikation des Endometriumkarzinoms (in Anlehnung an Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) 2018) (43)

TNM-Klassifikation	FIGO-Stadium
TX: Primärtumor kann nicht beurteilt werden	
T0: Kein Anhalt für Primärtumor	
T1: Tumor begrenzt auf Corpus uteri - T1a: Tumor begrenzt auf Endometrium oder infiltriert weniger als die Hälfte des Myometriums - T1b Tumor infiltriert die Hälfte oder mehr des Myometriums	I IA IB
T2: Tumor infiltriert das Stroma der Zervix, breitet sich jedoch nicht jenseits des Uterus aus	II
T3 und/oder N1: Lokale und/oder regionäre Ausbreitung wie nachfolgend beschrieben: - T3a: Befall der Serosa und/oder Adnexe (direkte Ausbreitung oder Metastasen) - T3b: Vaginal- oder Parametriumbefall (direkte Ausbreitung oder Metastasen)	III IIIA IIIB
N1: Metastasen in Becken- und/oder paraaortalen Lymphknoten Metastasen in Beckenlymphknoten Metastasen in paraaortalen Lymphknoten	IIIC IIIC1 IIIC2
T4: Tumor infiltriert Blasen- und/oder Rektumschleimhaut M1: Fernmetastasen, einschließlich intraabdomineller Metastasen (ausgenommen Metastasen in Vagina, Beckenserosa oder Adnexen, einschließlich Metastasen in inguinalen und anderen intraabdominellen Lymphknoten als paraaortalen und/oder Beckenlymphknoten)	IVA IVB

Das Grading des Endometriumkarzinoms basiert auf dem zugrundeliegenden histologischen Tumortyp, wobei nur für die endometrioiden und muzinösen Tumore ein Graduierungssystem nach FIGO existiert, das den Anteil solider, nicht plattenepithelialer Areale berücksichtigt. Bei G1-Karzinomen liegt dieser Anteil bei

Einleitung

<5%, bei G2-Karzinomen zwischen 6-50% und bei G3-Karzinomen ist der Anteil >50% (52) (Tabelle 10).

Tabelle 10: Grading des Endometriumkarzinoms (52)

Histologischer Tumortyp	Grading		
Endometrioid/Muzinös	Anteil solider, nicht plattenepithelialer Areale:		
	G1: <5%	G2: 6-50%	G3: >50%
Serös/Klarzellig	Immer G3		

Wie bereits erwähnt, werden Endometriumkarzinome zunächst nach ihrer Entstehung in zwei Gruppen eingeteilt. Die Typ I Karzinome, die östrogenabhängig sind, machen mit etwa 80% den Großteil der Karzinome aus, während Typ II nur 10% darstellen (1). Diese Einteilung wurde bereits 1983 von Bokhman vorgeschlagen und hat auch einen prognostischen Wert, denn Typ I Karzinome profitieren von einer besseren Prognose als Typ II Karzinome (44). Anhand dieser Einteilung lassen sich histopathologische Unterschiede der Gruppen feststellen. Zu den Typ I Karzinomen gehören das endometrioide und das muzinöse Karzinom. In die Kategorie der Typ II Karzinome fallen die muzinösen und serösen Karzinome (43). Die schlechtere Prognose der Typ II Karzinome ergibt sich aus der erhöhten Neigung zur Infiltration des Myometriums und zur Ausbildung von Lymphknotenmetastasen (44). Weitere Unterschiede liegen in den genetischen Besonderheiten. Diese lassen sogar eine Unterteilung in vier Subtypen zu (53,54). Einen Überblick zu diesen Daten gibt Tabelle 11.

Einleitung

Tabelle 11: Überblick über die Unterschiede der Typ I und Typ II Karzinome (1, 43, 44, 53, 54)

Merkmal	Typ I Karzinome	Typ II Karzinom
Häufigkeit	80%	10%
Genese	Östrogenabhängig	Östrogenunabhängig
Pathologie	Endometrioid, muzinös	Klarzellig, serös
Grading	G1 und G2	G3
Genetik (Auswahl)	Mikrosatelliteninstabilität, Mutationen: phosphatidylinositol-4,5- bisphosphate 3-kinase (PIK3CA), KRAS, β -Catenin, PTEN	TP53- Mutationen, chromosomale Instabilität
Prognose	Gut	Schlecht
weitere Besonderheiten	Entwicklung aus atypischer Endometriumhyperplasie	Mangelnde Progesteron Sensitivität

1.3.4 Prognosefaktoren und molekulare Marker

Zunächst sind der histologische Typ, das Grading, das chirurgisch-pathologische Stadium, die Infiltrationstiefe des Myometriums sowie die vaskuläre und zervikale Beteiligung bereits als wichtige Prognosefaktoren identifiziert worden (55). Weitere wichtige Parameter sind der Resektionsstatus im Sinne einer inkompletten chirurgischen Resektion oder Tumorreste >1cm, die Lymphknotenbeteiligung und die lymphovaskuläre Invasion sowie das Alter (56).

Bendifallah et al. entwickelten ein Scoring System, mit dessen Hilfe sich die Gefahr eines Rezidivs beim frühen Typ 1 Endometriumkarzinom einschätzen lässt. Ob die Patientin laut Scoring System zu der Gruppe mit einem niedrigen oder hohen Rezidivrisiko gehört, wird anhand von fünf Faktoren überprüft. Diese waren: ein Alter ≥ 60 Jahre, ein histologisches Grading von drei, eine primäre Tumogröße $> 2\text{ cm}$, eine myometriale Invasionstiefe $\geq 50\%$ und eine bestehende lymphovaskuläre Beteiligung (57). Die aktuelle Leitlinie erwähnt weitere morphologische und molekulare Parameter und diskutiert deren Bedeutung zur Prognoseeinschätzung. Beim Endometriumkarzinom spielen die molekularen Marker jedoch aktuell nur in Studien

Einleitung

eine Rolle (43). Die genetischen Besonderheiten waren in Studien bereits Ziel einer targeted therapy. Im Falle der PTEN-Mutationen, die als Beispiel gelten sollen, wurden mechanistic target of rapamycin (mTOR) Inhibitor eingesetzt (Slomovitz & Coleman, 2012; Slomovitz et al., 2010).

Vor dem Hintergrund, dass das Endometriumkarzinom ein hormonabhängiges Karzinom ist, konnten bereits Zusammenhänge zwischen dem ER- und dem PR-Status und der Prognose bzw. mit dem Stadium der Erkrankung sowie klinisch-pathologischen Merkmalen dargelegt werden. Diese verdeutlichen, dass der Hormonstatus auch bei dieser Erkrankung einen prädiktiven und prognostischen Wert hat (61–63). Eine endokrine Therapie, wie sie beim Mammakarzinom durchgeführt wird, wird aber aktuell nur in der Rezidivsituation erwähnt. Diese ist aber einer anderen Therapie oder Best Supportive Care nicht überlegen (43).

1.4 Single nucleotide polymorphisms

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) bezeichnen das Phänomen, dass sich Nukleotidsequenzen an bestimmten Stellen der Desoxyribonukleinsäure (DNA) von anderen unterscheiden. Durch den Austausch einer Base durch eine andere kommt es zur Entstehung zweier verschiedener Allele. Theoretisch sind vier Allele mit allen vier Basen Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) und Thymin (T) möglich. Der zugehörige Genotyp, der durch Betrachten der doppelsträngigen DNA zustande kommt, wird entweder als heterozygot oder homozygot bezeichnet. Bei einem SNP mit T und C als möglichen Allelen sind also folgende Genotype jeweils denkbar: CT (heterozygoter Genotyp), TT und CC (homozygote Genotype, wovon eines jeweils den selteneren Genotyp darstellt).

Man spricht von einem SNP, wenn der Anteil der Bevölkerung, bei dem die Allele auftreten, mindestens 1% beträgt. Die Anzahl an SNPs, die diese Bedingung erfüllen, wird auf etwa zehn Millionen geschätzt. Sie treten mit einer hohen Frequenz von etwa 1330 Basenpaaren auf, sodass sie zur Entschlüsselung unseres Genoms genutzt werden können, das sogenannte genetic mapping. Schließlich bilden SNPs Haplotypen, die sich aus mehreren SNPs an einer Region zusammensetzen (64). Mit dem Kopplungsungleichgewicht bzw. dem Linkage Desequilibrium ist es möglich zu berechnen, wie wahrscheinlich zwei Allele zufällig gemeinsam vererbt werden (65).

Tag SNPs dienen als Marker für häufige Haplotypen. Das international HapMap Project bemühte sich mithilfe häufig vorkommender genetischer Variationen der

Einleitung

menschlichen DNA, deren höchsten Anteil SNPs bilden, eine Art Landkarte dieser zu erstellen. Durch diese Karte könnten Risikofaktoren für Erkrankungen identifiziert werden und sowohl Diagnostik als auch Therapie optimieren (66). Die Erkrankungen, die das Interesse des HapMap Project darstellen, sind sogenannte common diseases, also Krankheiten, an denen ein großer Teil der Bevölkerung leidet wie etwa kardiovaskuläre Erkrankungen, Diabetes, aber auch Krebserkrankungen. Im Gegensatz zu monogenetischen Erkrankungen, werden common diseases polygen vererbt und sind Umweltfaktoren ausgesetzt (67).

Je nachdem, wo ein SNP lokalisiert ist, hat dies unterschiedliche biologische Konsequenzen. Es ist bekannt, dass unsere DNA aus unterschiedlichen funktionellen Abschnitten besteht (Abbildung 1). Eine Veränderung der Basensequenz in einem Exon, einer kodierenden Sequenz, könnte über eine abweichende Aminosäuresequenz bis zu einem veränderten und eventuell nicht funktionsfähigen Genprodukt führen. Ein Vorkommen von SNPs in den Promotoren, die an der Regulierung der Genexpression beteiligt sind, ist ebenso möglich. Die Introns, nicht-kodierende Sequenzen, verfügen jedoch ebenso über vielfältige biologische Funktionen z.B. das Spleißen der messenger – Ribonukleinsäure (mRNA), sodass intronische SNPs auch Gegenstand der Forschung sind (68). Schließlich ist auch denkbar, dass SNPs in den Abschnitten zwischen den Genen, in den intergenen Regionen, auftreten. Der Anteil an SNPs in den nicht-kodierenden Sequenzen, die in genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) mit Erkrankungen oder Merkmalen assoziiert werden, liegt sogar bei 93% (69).

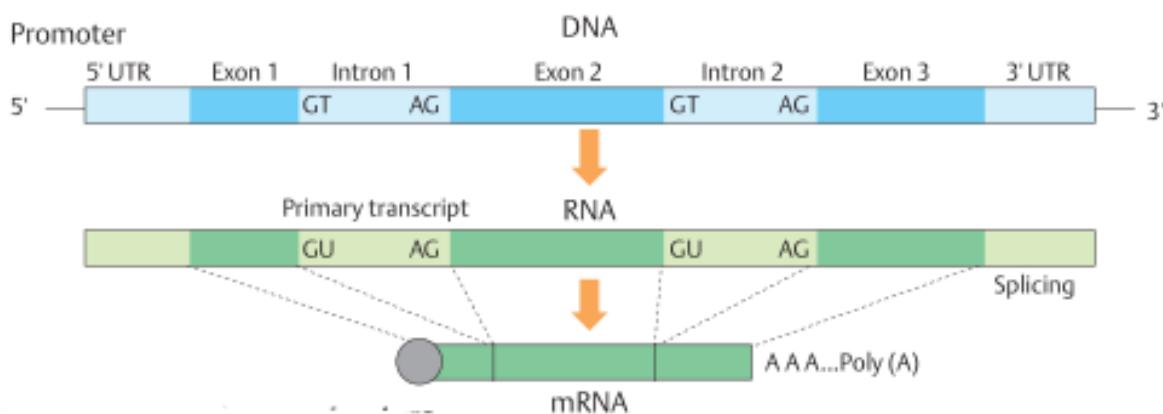


Abbildung 1: Grundlegende Struktur eukaryotischer Gene (nach <https://www.magazinescience.com/en/biology/eukaryotic-gene-structure/>, abgerufen am 28.08.2019. Basic eukaryotic gene structure)

Einleitung

Die Datenbank der NCBI, nämlich dbSNP, gibt Informationen zu allen möglichen genetischen Variationen, die hauptsächlich die SNPs darstellen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>).

SNPs spielen eine große Rolle in der medizinischen Forschung und werden im Hinblick auf ihrer Rolle bei der Ätiologie und Therapie unterschiedlicher Erkrankungen untersucht. Eine sehr bekannte genetische Veränderung, die letztendlich auf einen SNP beruht, ist das Faktor-V-Leiden, auch als aktivierte Protein C (APC)-Resistenz bekannt. Physiologischerweise spaltet das aktivierte Protein C den aktvierten Faktor V, wodurch letzterer inaktiviert wird. Bei dieser genetischen Besonderheit, die zu einer erhöhten Thromboseneigung führt, wird im Faktor V-Gen die Base G durch A ersetzt, was zur Folge hat, dass an der Stelle 506 nicht die Aminosäure Arginin, sondern Glutamin eingebaut wird (70). Es kommt also zu einer Punktmutation. Dadurch kann der mutierte Faktor V nicht mehr gespalten werden, er ist gegenüber dem aktvierten Protein C resistent, man spricht von aktiverter Protein C-Resistenz (APC-Resistenz). Bis die APC-Resistenz mit dieser Mutation in Zusammenhang gebracht werden konnte, musste zuerst die Möglichkeit, dass die APC-Resistenz auf einen Cofaktor, der mit Protein C in Verbindung steht, beruht, in Erwägung gezogen werden (71). Dieser Cofaktor konnte später als der Gerinnungsfaktor V identifiziert werden (72). Außerdem sind SNPs ebenso in der Domäne der Pharmakotherapie von Bedeutung, z.B. wenn es um die Metabolisierung von Medikamenten geht. Denn, wenn ein SNP in einer DNA-Sequenz vorkommt, das für ein Gen kodiert, das für die Verstoffwechselung von Pharmaka verantwortlich ist, wie beispielsweise Cytochrom P 450-Enzyme, kann dies Auswirkungen auf die nötige Dosierung haben, z.B. von Warfarin (64). Es existieren aber auch andere Beispiele, die darlegen, dass eine Genotypisierung vor Verabreichung eines Wirkstoffs durchaus sinnvoll sein könnte. Progesteron ist ein weibliches Geschlechtshormon, dem eine große Rolle in der Aufrechterhaltung einer Schwangerschaft zukommt. Schwangere Patientinnen, bei denen ein erhöhtes Risiko für eine Frühgeburt besteht, können mit 17-alpha-hydroxyprogesteron caproat (17-OHPC) therapiert werden. In einer Studie wurden SNPs im PR bei Frauen mit bekanntem Frühgeburtsrisiko analysiert und daraufhin der Erfolg einer Therapie mit 17-OHPC ausgewertet. Die Studie ergab, dass je nachdem, wo die Patientinnen ihre Ursprünge hatten und welche Genotypen der SNPs festgestellt wurden, die Behandlung gute oder schlechte Erfolgsaussichten hatte (73).

Einleitung

Zusammenfassend kann man sagen, dass SNPs vielfältige biologische Funktionen aufweisen. Dieser kann man sich in der Medizin unterschiedlich zunutze machen, sei es um Risikogruppen zu identifizieren oder um die Therapie auf den einzelnen Patienten individuell abzustimmen.

1.5 Estrogen related receptor alpha

1.5.1 Aufbau, Charakteristiken und biologische Funktionen des Rezeptors

Der estrogen related receptor alpha (ESRRA) – in der Literatur oft auch als NR3B1, ERR1 oder $\text{ERR}\alpha$ bezeichnet – ist ein nukleärer Rezeptor und bildet zusammen mit dem estrogen related receptor beta und dem estrogen related receptor gamma die Subgruppe der nuclear receptor subfamily 3 group B Rezeptoren.

Der ESRRA wurde erstmals beschrieben, als es einer Arbeitsgruppe gelang zwei complementary DNA (cDNA) Klone zu isolieren. Die Genprodukte, für die sie kodierten, wurden hERR1 und hERR2 benannt. Das erstgenannte ist der bedeutende Rezeptor für diese Arbeit und soll weiterhin als ESRRA bezeichnet werden. Dies wurde mithilfe der DNA-Bindungsdomäne (DBD) des ER erreicht, dessen Aminosäuresequenz zu 68% in der DBD und zu 36% in der Ligandenbindungsdomäne (LBD) mit der des hERR1s übereinstimmen. Damals stellte sich heraus dass die hERR trotz der strukturellen Gemeinsamkeiten mit dem ER nicht in der Lage sind Östrogene oder andere Steroidhormone zu binden (74). Aus diesem Grund wurde der ESRRA als orphan receptor bekannt (75).

Wie andere Kernrezeptoren hat der ESRRA eine klassische Struktur, die sich aus verschiedenen Bereichen zusammensetzt. Am wichtigsten zu nennen sind die DBD mit Zink-Fingern, die sich in der C-Domäne befindet und hochkonserviert ist sowie die Ligandenbindungsdomäne im Bereich der E-Domäne, die etwas variabler ist. In dieser Domäne ist auch die activating function (AF)-2 enthalten. Die DNA-Bindungsfähigkeit wird sichergestellt, indem die sogenannte P-Box in der DBD Sequenzen, die die Nukleotidabfolge (A/G)GGTCA beinhalten, erkennt. Abschnitte der DNA, die diese Kernsequenz beinhalten werden auch als hormone response elements bezeichnet. Weitere Bereiche sind die A/B-Domäne mit der AF-1, die unterschiedliche gestaltet sein kann und die sogenannte hinge Region zwischen DBD und LBD (76,77).

Die Abbildung 2 zeigt einerseits den Aufbau des ESRRA im Vergleich zu den anderen ERRs und den ERs, andererseits die funktionell bedeutsamen Abschnitte darin.

Einleitung

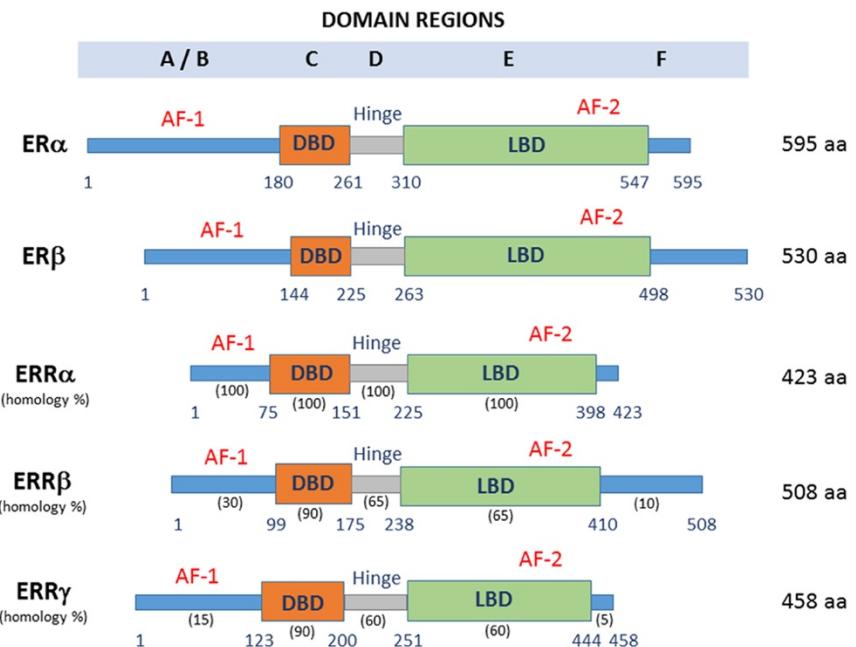


Abbildung 2: Struktur der ERRs im Vergleich zu den ERs nach Misawa A & Inoue S 2015 (78)

Die strukturellen Gemeinsamkeiten haben zu der Namensgebung des ESRRAs geführt, jedoch ist auch gezeigt worden, dass der ESRRA die ER-abhängigen Signalwege beeinflusst. Dies soll am Beispiel des Lactoferrins gezeigt werden, ein Protein, das im menschlichen Körper vielfältige Funktionen aufweist und unter dem Einfluss des Östrogens steht. Zunächst ist bedeutend, dass der ESRRA den response element des steroidogenic factor -1 (SFRE) und verschiedene des ERs (ERE) erkennt (79,80). Yang et al. gelang es cDNA zu isolieren, deren Aminosäuresequenz zu 99% mit der des ESRRAs übereinstimmt. Diese Nukleotidabfolge war dazu in der Lage an den Promotorbereich des Gens, das Lactoferrin kodiert, zu binden (81). Über Erkennung der SFRE und ERE kann der Promotor des Lactoferrins unabhängig von Östrogen transaktiviert werden (82).

Der Rezeptor wird in allen Geweben exprimiert, die Konzentrationen variieren jedoch je nach Organ system. Mittels quantitativer Real Time PCR (qPCR) untersuchte man die Expression der mRNA unterschiedlicher nukleärer Rezeptoren im Tiermodell. Während man im zentralen Nervensystem, im Gastrointestinaltrakt, in der Leber, in der Niere, im weißen und braunem Fettgewebe, in der Muskulatur und im kardiovaskulären System hohe Werte des ESRRAs gefunden hat, sind diese in endokrinologischen und immunologischen Organen sowie in den Genitalien, in der Haut und in den Knochen moderat (83). Der Rezeptor ist also weit verbreitet, was zur Annahme führt, dass er viele unterschiedliche Funktionen auf zellulärer Ebene hat.

Einleitung

Es konnte gezeigt werden, dass der ESRRA, z.B. über das Enzym medium-chain acyl coenzyme A dehydrogenase an der Beta-Oxidation der Fettsäuren (84) sowie über weitere Zielgene des Citratzyklus, der oxidativen Phosphorylierung und der mitochondrialen Biogenese (85) an wichtigen Stoffwechselwegen der Energiegewinnung beteiligt ist und ebenso an der adaptiven Thermogenese (86). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wird der ESRRA verstärkt in Geweben exprimiert, die einen hohen Energieverbrauch aufweisen (87).

Der ESRRA gehört zu der Gruppe der Rezeptoren, die konstitutiv aktiv sind. Das heißt der Rezeptor ist unabhängig von einem Liganden aktiv und kann die Transkription seiner Zielgene eigenständig initiieren. Die Gründe für diese Eigenschaft des Genes wurden schon auf molekularer Ebene untersucht, wobei eine Abweichung in der Aminosäuresequenz im Vergleich zum ER α verantwortlich gemacht wurde (88).

1.5.2 ESRRA in östrogenabhängigen Karzinomen

1.5.2.1 ESRRA beim Mammakarzinom

Der ESRRA übernimmt also vielfältige Funktionen im menschlichen Körper und weist deshalb Verbindungen zu verschiedenen Krankheiten wie Adipositas, Diabetes, Osteoporose und malignen Tumorerkrankungen auf (87).

Besonders intensiv wird die Rolle des ESRRA beim Mammakarzinom, einem östrogenabhängigen Karzinom, erforscht. Mit den Steroidhormon- und Her2-Rezeptoren existieren beim Mammakarzinom bereits etablierte molekulare Marker. Was die zukünftige Rolle als Prognosefaktor und therapeutisches Ziel betrifft, sind aktuelle Studien zu ESRRA zudem vielversprechend.

Die Stellung der Steroidhormone beim Mammakarzinom und die Fähigkeit des ESRRAs EREs zu binden wurde bereits erläutert. Unter Berücksichtigung dieser Faktoren überrascht es nicht, dass der ESRRA in Mammakarzinom-Zelllinien ER-abhängige Signalwege beeinflusst. Je nach ER-Status der Mammakarzinomzelllinie wird die ERE-abhängige Transkription aktiviert oder verhindert. Die Inhibierung der Transkription wurde bei der ER-positiven Michigan Cancer Foundation-7-Zelllinie beobachtet und in Abhängigkeit von 17-Beta-Östradiol (17- β -E2) beeinflusst. Umgekehrt verhielt sich die ER-negative Zervixkarzinom-Zelllinie HeLa, bei denen eine Aktivierung der Transkription festgestellt wurde (89). Eine Interaktion auf molekularer Ebene ist also gesichert, zusätzlich finden Bemühungen um Assoziationen mit etablierten klinisch-pathologischen Parametern statt (Tabelle 12).

Einleitung

Allgemein gesprochen wird der ESRRRA zunächst mit einem negativen Ausgang der Krankheit in Zusammenhang gebracht (90). Im Hinblick auf die bestehenden molekulare Marker stellte sich eine negative Korrelation zwischen erhöhten ESRRRA-Spiegeln in Mammakarzinomen mit dem Steroidhormonrezeptorstatus einerseits und eine positive Korrelation mit dem Her2-Status andererseits heraus (91). Diese Daten widersprechen jedoch zum Teil den Ergebnissen einer anderen vergleichbaren Studie (90). VEGF hat im Rahmen der Angiogenese eine wichtige Bedeutung für Karzinome. Es gibt Daten, die zeigen konnten, dass die mRNA des VEGF durch den aktivierten ESRRRA verstärkt exprimiert wird. VEGF konnte außerdem als Transkriptionsziel des ESRRAs identifiziert werden (92). Weitere Zielgene des ESRRAs konnten in einer Genomweiten Studie erkannt werden. Diese Arbeitsgruppe zeigte, dass in Mammakarzinomzelllinien der ESRRAs zwar nur 18% seiner Zielgene mit dem ER α gemeinsam hat, diese aber für Signalwege beim Mammakarzinom von Bedeutung sind, unter anderem der Her2-Rezeptor. Schließlich berichten dieselben Autoren davon, dass die Expression dieser Zielgene sowohl mit der Prognose der Erkrankung assoziiert ist, als auch eine Einteilung der Karzinome in vier verschiedenen Subtypen ermöglicht, die an die Klassifikation nach Goldhirsch et al. 2011 (21) erinnert (93). Auch eine weitere Arbeitsgruppe fand heraus, dass die Gruppe an Genen, die sowohl vom ER α als auch ESRRRA reguliert wird, relativ klein ist und somit der ESRRRA in Mammakarzinomzellen auch unabhängig vom ER α agieren kann. Diese Ergebnisse regten zur Untersuchung des ESRRAs in ER α -negativen Mammakarzinomzellen an. In diesem Zusammenhang führte ein Verlust des Rezeptors zu einer verminderten Migration der Tumorzellen in vitro (94).

Im Hinblick auf die Therapie wurden bereits unterschiedliche Optionen bei verschiedenen Mammakarzinomen Phänotypen erforscht z.B. die Substanz XCT790 bei triple-negativen Mammakarzinom (95–97). XCT790, ein inverser Agonist, der eine antagonistische Wirkung am Rezeptor entfaltet, zeigte auch Potential bezüglich der Steigerung der Effektivität einer adjuvanten Therapie mit dem Antiöstrogen Fulvestrant (98). Aber auch bei ER-positiven Mammakarzinomen wurden Therapien gegen den ESRRRA erprobt (99,100) und der Einsatz von micro-RNAs war in Studien erfolgreich (101,102).

Schließlich wurde vom möglichen prädiktiven Wert des ESRRAs zur Tamoxifen-Empfindlichkeit bei triple-negativen Karzinomen berichtet (103).

Einleitung

1.5.2.2 ESRRA beim Ovarialkarzinom

Die Literatur zum Status des ESRRAs beim Ovarialkarzinom ergibt Untersuchungen zum Rezeptor als Fusionsgen. Diese molekulare Besonderheit wurde noch nicht vorgestellt, ist aber für eine andere onkologische Erkrankung – die chronisch myeloische Leukämie – grundlegend was die Ätiologie und die daraus folgende Therapie angeht. Bei serösen Ovarialkarzinomen wurde eine wiederauftretende Genfusion ESRRA-C11orf20 bei 15% der untersuchten Karzinome gefunden (104). Dennoch wurden in einer anderen Arbeit diese Ergebnisse überprüft und das Auftreten dieser Fusion bei einer größeren Stichprobe von 163 serösen Ovarialkarzinom konnte nicht bestätigt werden (105).

Der ESRRA könnte auch beim Ovarialkarzinom in Zukunft als molekularer Marker und Prognosefaktor im klinischen Bereich eingesetzt werden. Diese These wird durch verschiedene Aspekte unterstützt (Tabelle 12). Zum einen durch die erhöhte Expression in Ovarialkarzinomzellen, zum anderen durch einen positiven Zusammenhang mit dem Tumormarker CA 125 sowie mit einem verringerten Gesamtüberleben (106). Die Erkenntnis, dass hohe ESRRA-Expressionen einen prognostischen Wert für das Ovarialkarzinom haben könnten, konnte in einer weiteren Arbeit bestätigt werden. Dort waren höhere mRNA-Spiegel des Rezeptors mit weiter fortgeschrittenen Stadien assoziiert (107).

Der ESRRA könnte Bestandteil einer zielgerichteten Behandlung des Ovarialkarzinoms sein. Verschiedene Substanzen, die in Signalwege, an denen der ESRRA beteiligt ist, wurden schon erforscht. Dazu gehörten Cordycepin, das die Metastasierung von Ovarialkarzinomzellen verhinderte und Kaempferol, das die Angiogenese unterdrückte (108,109). Die epitheliale-mesenchymale Transition erlaubt die Migration der Karzinomzellen und ist somit entscheidend, wenn es um Metastasierung von Karzinomen geht. Der ESRRA spielt hier wohl eine wichtige Rolle, beispielweise bewirkte der Knockdown des Rezeptors eine Inhibierung dieses Übergangs und ebenso eine Reduktion des Aszitesvolumens (110).

1.5.2.3 ESRRA beim Endometriumkarzinom

Im Hinblick auf das Endometriumkarzinom muss man sich wieder vor Augen führen, dass je nach Östrogenexposition zwei unterschiedliche Karzinomtypen existieren: das östrogenabhängige Typ I-Karzinom und das östrogenunabhängige Typ II-Karzinom.

Einleitung

Die bisherigen Ergebnisse zum ESRRA spiegeln dies wieder. Zunächst bewirkte eine Überexpression des Rezeptors die verminderte E2-induzierte, ERE-abhängige Transkription in einer Endometriumkarzinom Zellline, die einen positiven ER-Status aufweist (Ishikawa-Zelllinie). Die Inhibierung des ESRRAs führte in dieser Zelllinie zur Verminderung der ERE-abhängigen Transkription bei gleichzeitigem Fehlen von E2 und Serum, wohingegen die Anwesenheit des E2s zu einer erhöhten Transkriptionsrate führte (111). In einer anderen Studie wurden Nachforschungen zum ESRRA bei Ishikawa- und ER-negativen HEC1A-Zelllinien angestellt. In der ER-positiven Ishikawa-Zelllinie konnte die Interaktion des orphan receptors mit dem ER α bestätigt werden, indem eine Überexpression des ESRRAs zur verminderten Transkription des ER α s führte. Weiterhin konnten Unterschiede in Abhängigkeit des ER-Status dargestellt werden. Eine Behandlung mit 17- β -E2 führte bei den Ishikawa-Zellen zur verminderten ESRRA-Expression, die aber durch ICI 182780 – einem Antiöstrogen – zum Teil aufgehoben werden konnte. Die ESRRA-überexprimierenden Ishikawa-Zellen wuchsen in Anwesenheit von 17- β -E2 deutlich langsamer. Die HEC-1A-Zelllinie verhielt sich bei den oben genannten Experimenten gegensätzlich (112). In Anbetracht dieser Ergebnisse ist es nicht überraschend, dass eine Applikation von XCT790, als Antagonist am ESRRA, bei HEC-1A-Zellen zu einem verminderten Wachstum dieser führt (113).

Im Zusammenhang mit anderen klinischen und molekularen Tumormerkmalen ist der Status des orphan receptors beim Endometriumkarzinom in der Literatur allerdings in vielen Bereichen nicht eindeutig (Tabelle 12). Einerseits wird dargestellt, dass die ESRRA-Expression tendenziell mit ER α -Negativität verbunden ist (114). Andere Autoren hingegen finden keinen Zusammenhang zwischen beiden Rezeptoren, wohl aber eine Assoziation zum VEGF und eine zentrale Rolle beim Wachstum des Karzinoms (115). Was den Krankheitsverlauf betrifft, geht ein Fortschreiten der Erkrankung hinsichtlich des klinischen Stadiums, der myometrialen Invasion und der Tumorentdifferenzierung mit einem Sinken der ER α -mRNA einher. Gegenteilig verhält es sich mit der ESRRA-Expression, jedoch unabhängig von der Tumordifferenzierung (116). Der Zusammenhang mit der myometrialen Invasion wird wiederum von anderen Autoren widerlegt (115).

Schließlich sind weitere Autoren der Ansicht, dass der ESRRA sowohl prognostisch – als negativer Prognosefaktor – und auch therapeutisch von Nutzen sein könnte. Ein

Einleitung

Knockdown des Rezeptors führte zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber dem Chemotherapeutikum Paclitaxel (115).

Diese Erkenntnisse zu dem Status des ESRRAs in den vorgestellten östrogenabhängigen, gynäkologischen Tumorentitäten sind auf dem ersten Blick sehr vielschichtig. Sie zeigen dennoch, dass der ESRRA womöglich für die Heterogenität dieser gynäkologischen Karzinome mitverantwortlich ist, aber auch einer zielgerichteten Therapie zugänglich sein könnte bzw. eine maßgeschneiderte Therapie erlauben könnte. Die Zusammenhänge des ESRRAs bezüglich der drei Karzinome werden in Tabelle 12 zusammenfassend dargestellt.

Einleitung

Tabelle 12: Der ESRRA beim Mamma-, Ovarial- und Endometriumkarzinom

Expression des ESRRA in den Karzinomzellen	Zusammenhang des ESRRA mit bestehenden Tumormerkmalen	Prognostische Bedeutung
Mammakarzinom		
- Erhöhte ESRRA-mRNA-Expression (90)	<ul style="list-style-type: none"> - Unabhängigkeit von Tumorgröße, Nodalstatus, Grading (90) - Tendenz zur ERα-Positivität und zur positiven Korrelation mit ERα-Immunreaktivität (90) - Unabhängigkeit von PR-Immunreaktivität (90) - Korrelation mit ER- und PR-Negativität (91) - Positive Korrelation (91) bzw. Unabhängigkeit vom Her2-Status (90) 	<ul style="list-style-type: none"> - Erhöhtes Rezidivrisiko und negativer Ausgang (90)
Ovarialkarzinom		
- Erhöhte ESRRA-mRNA-Expression (106)	<ul style="list-style-type: none"> - Zusammenhang mit fortgeschrittenen FIGO-Stadien (106,107) - Zusammenhang mit Entdifferenzierung (106) - Zusammenhang mit erhöhten CA 125-Spiegel (106) 	<ul style="list-style-type: none"> - verringertes Gesamtüberleben (106)
Endometriukrazinom		
- Erniedrigte ESRRA-mRNA-Expression in ER α -positiven Karzinome, Tendenz zu erhöhter Expression in ER α -negativen Karzinomen (114)	<ul style="list-style-type: none"> - Tendenz zur ERα-Negativität (114) bzw. Unabhängigkeit vom ERα-Status (115) - Zusammenhang mit fortgeschrittenen FIGO-Stadien (115,116) - Zusammenhang mit Fortschreiten der myometrialen Invasion (114,116) bzw. Unabhängigkeit davon (115) - Unabhängigkeit von der Differenzierung (114–116) 	<ul style="list-style-type: none"> - verringertes krankheitsfreies Gesamtüberleben (115)

1.5.3 Agonisten und Antagonisten des ESRRA

Es gilt also, dass der ESRRA ein potentieller Prognosefaktor in der Onkologie ist. Mögliche therapeutische Ansätze wurden auch schon dargestellt, weshalb die pharmakologischen Entwicklungen kurz erläutert werden sollen. Es sind schon früh mögliche Antagonisten identifiziert worden, nämlich die Pestizide Toxaphen und Chlordan (117). Doch die Liste an möglichen Liganden ist seitdem ergänzt worden und

Einleitung

die Wirkung verschiedenster Stoffe am Rezeptor wird immer wieder erprobt (118–121). Einige der erwähnten Stoffe wurden schon im Zusammenhang mit den zielgerichteten Behandlungen von gynäkologischen Karzinomen vorgestellt. Um diese Stoffe in der Therapie einsetzen zu können, ist aber sicherlich noch weitere Erforschung am Rezeptor nötig, denn die komplexen Mechanismen des ESRRAs sind längst noch nicht ganz aufgedeckt. Zu beachten ist, dass mittlerweile die Wirkung einiger natürlich vorkommender Isoflavone und Flavone, die zu den Phytoöstrogenen zählen, als Agonisten nachgewiesen werden konnte (122). Deren strukturelle Gemeinsamkeiten und Unterschiede zum 17- β -E2, ein natürliches Östrogen, das im menschlichen Körper als Ligand des ERs fungiert, wird in Abbildung 3 verdeutlicht. Trotz dieser Entdeckung ist der Rezeptor in der Literatur weiterhin als orphan receptor bekannt.

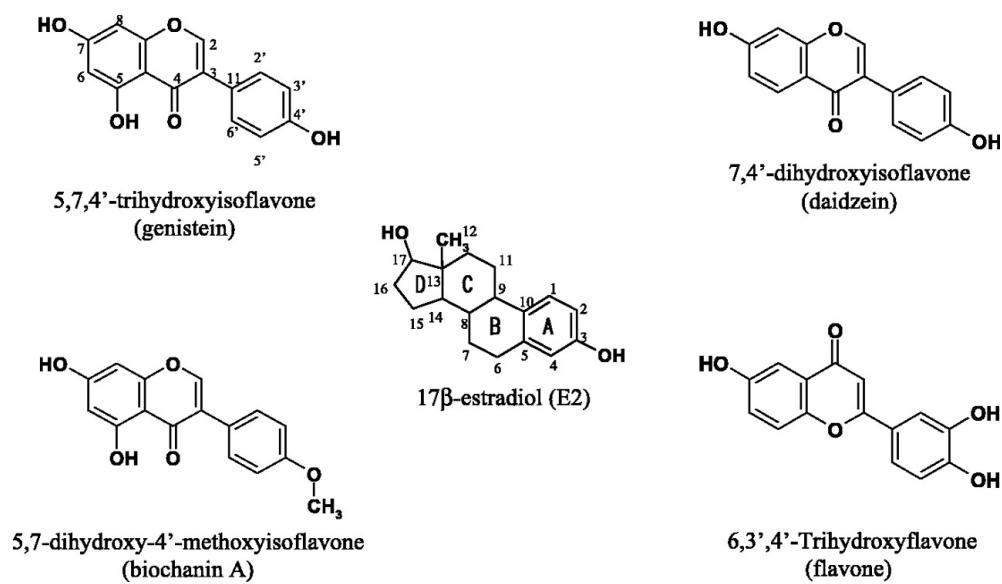


Abbildung 3: Chemische Strukturen von 17- β -E2 und Phytoöstrogenen nach Suetsugi M et al. 2003 (122)

Einleitung

1.6 Zielsetzung

Im Vordergrund der Forschungsarbeit der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. rer. nat. Treeck steht die Identifizierung neuer molekularer Marker, die für die Ätiologie, Diagnostik, Therapie und Prognose gynäkologischer Krebserkrankungen von Bedeutung sind. Der ESRRA ist ein nuklearer Rezeptor, der strukturelle und funktionelle Gemeinsamkeiten mit dem ER α zeigt (74,80). Eine Bedeutung für die Karzinogenese östrogenabhängiger, gynäkologischer Karzinome wird ihm zugeschrieben, sodass dieser Rezeptor als ein möglicher Prognosefaktor und therapeutischer Ansatzpunkt gesehen wird (89,91,106,109,112,115).

Ziel dieser Arbeit war es folgende Fragen zu beantworten. Zum einen, ob ein SNP, der im Promotor des ESRRA-Gens lokalisiert ist, mit dem Mamma-, Ovarial- und Endometriumkarzinom assoziiert ist. Zum anderen untersuchten wir, ob klinisch-pathologische Merkmale der Karzinome mit dem SNP in einem statistisch signifikanten Zusammenhang stehen. Signifikante Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass der SNP ein möglicher Risikofaktor für die Entstehung eines Karzinoms bzw. für bestimmte Tumorcharakteristika darstellt.

2. Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Insgesamt wurden Blutproben von 1579 Patientinnen untersucht. Den interessierenden Subgruppen konnten 1101 Patientinnen zugeordnet werden. Davon waren 373 der Patientinnen an einem Mammakarzinom, 133 an einem Ovarialkarzinom und 176 an einem Endometriumkarzinom erkrankt. Die Kontrollgruppe bestand aus Blutproben von 419 gesunden bzw. nicht an malignen Tumorarten erkrankten Frauen. In der Kategorie der nicht an malignen Tumorarten erkrankten Frauen wurden gesunde Frauen und Patientinnen erfasst, die beispielsweise von Uterus myomatous, Fibroadenomen, Hyperplasien des Endometriums (jedoch keine, die mit Atypien vergesellschaftet waren) und anderen benignen gynäkologischen Erkrankungen betroffen waren. Diese werden im Folgenden als Patientinnen der Kontrollgruppe bezeichnet. Die Proben wurden von verschiedenen Instituten aus Deutschland und Polen zur Verfügung gestellt. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Universität Regensburg zugelassen. Eine Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie lag von jeder Patientin vor.

Nachdem die Patientinnen hinsichtlich Erkrankungsstatus klassifiziert wurden, fand eine Einordnung dieser anhand klinisch-pathologischer Merkmale in weitere Gruppen statt. Tabelle 13 gibt hierzu einen Überblick. Bei allen Karzinompatientinnen wurde dazu der Grad der Tumordifferenzierung erfasst, bei den Mammakarzinompatientinnen zusätzlich noch die Tumogröße, der Nodalstatus, der ER-, PR- und Her2-Status. Bei der Tumordifferenzierung wurden die gut (G1) und mittelgradig differenzierte (G2) Karzinome zusammengefasst und mit den undifferenzierten (G3) Karzinomen verglichen. Im Hinblick auf die Tumogröße wurden in Situ und T1-Karzinome in eine Gruppe eingeordnet und den Karzinomen im Stadium T2-4 gegenübergestellt. Zur Klassifizierung des Nodalstatus wurde eine Gruppe mit positivem Lymphknotenstatus und eine mit negativem Status gebildet. Lediglich Patientinnen mit gar keinem Befall der Lymphknoten wurden in die Gruppe mit negativem Nodalstatus eingeordnet. Ab dem Vorhandensein von Mikrometastasen galt eine Patientin als nodal-positiv. Auch zur Bewertung des Steroidhormonrezeptorstatus, also des ERs und PRs, wurde entweder positiv oder negativ angegeben, wobei ein Score >0 als positiv bewertet wurde. Somit waren

Material und Methoden

lediglich Karzinome mit einem Score=0 negativ. Es wurde der IRS benutzt. Schließlich wurde der Her2-Status der Karzinome betrachtet. Anhand dieser wurde eine Gruppe mit negativem und positivem Her2-Status gebildet. Als negativ wurde der Her2-Status interpretiert, wenn der Score <3 war. In die positive Gruppe wurden Karzinome mit einem Score >2 eingeordnet.

Zusätzlich wurde das Durchschnittsalter der jeweiligen Gruppenmitglieder bestimmt. Dies lag bei der Kontrollgruppe bei ca. 52 Jahren, bei der Mammakarzinomgruppe bei rund 60 Jahren. Bei der Ovarialkarzinomgruppe wurde ein durchschnittliches Alter von etwa 59 Jahren errechnet und bei der Endometriumkarzinomgruppe eins von ca. 63 Jahren. Nach Bestimmung des durchschnittlichen Alters der Karzinomgruppen wurde nochmals auf einen Unterschied hinsichtlich der Genotypverteilung untersucht, nachdem eine Alterskorrektur der Kontrollgruppe durchgeführt wurde. Hierzu wurden je nach dem durchschnittlichen Alter der zu vergleichenden Karzinomgruppe jüngere Patienten aus der Kontrollgruppe entfernt, um ein annähernd gleiches Durchschnittsalter wie das der Karzinomgruppe zu erhalten.

Tabelle 13: Klinisch-pathologische Kriterien, nach denen die Karzinome jeweils untersucht wurden

Klinisch-pathologisches Merkmal	Mammakarzinom	Ovarialkarzinom	Endometriumkarzinom
Tumogröße	Tis+1 vs. T2-4	-	-
Nodalstatus	Negativ vs. Positiv	-	-
Grading	G1+2 vs. G3	G1+2 vs. G3	G1+2 vs. G3
Her2-Status	Negativ vs. Positiv	-	-
ER-Status	Negativ vs. Positiv	-	-
PR-Status	Negativ vs. Positiv	-	-

2.2 Materialien

Tabelle 14 listet alle verwendeten Reagenzien auf, während die Tabellen 15 und 16 Informationen über die benutzten Hilfsmittel und Geräte geben.

Material und Methoden

Tabelle 14: Reagenzien

Reagenz	Hersteller
<u>DNA-Lysepuffer:</u> <ul style="list-style-type: none"> • 1% v/v Triton X • 5,5 g 0,32 M Sucrose • 500 Mikroliter μl 0,01 M Tris pH 7,5 • 2,5 Milliliter ml 5 mM MgCl₂ 	Calbiochem®, San Diego, USA Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D Carl Roth® GmbH+ Co. KG, Karlsruhe, D
<u>PCR-Puffer:</u> <ul style="list-style-type: none"> • GoTaq® Puffer 5x • 0,5% Tween® 20 • 10 mAU Proteinase K 	Promega, Madison, USA Sigma Aldrich®, St. Louis, USA Merck KGaA, Darmstadt, D
GoTaq® Puffer 5x	Promega, Madison, USA
<u>Enzyme:</u> <ul style="list-style-type: none"> • GoTaq® DNA Polymerase (5 u/μl) • GoTaq® G2 DNA Polymerase (5 u/μl) 	Promega, Madison, USA Promega, Madison, USA
<u>Desoxynukleotidtriphosphat (dNTP) Mix</u> <u>10 mM:</u> <ul style="list-style-type: none"> • 50 μl Desoxyadenosintriphosphat (dATP) 100 mM • 50 μl Desoxycytosintriphosphat (dCTP) 100 mM • 50 μl Desoxyguanosintriphosphat (cGTP) 100 mM • 50 μl Desoxythymidintriphosphat (dTTP) 100 mM + 300 μ l nucleasefreies Wasser	Sigma Aldrich®, St. Louis, USA Sigma Aldrich®, St. Louis, USA Sigma Aldrich®, St. Louis, USA Sigma Aldrich®, St. Louis, USA
SNP Primer	Eurofins Genomics, Luxemburg
Nucleasefreies Wasser	Sigma Aldrich®, St. Louis, USA
Biozym LE Agarose	Biozym® Scientific GmbH, Oldendorf, D

Material und Methoden

<p><u>10x Tris-Borat-</u></p> <p><u>Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA)</u></p> <p><u>(TBE) Puffer (pH 8,0):</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • 108g 89 mM Tris • 55g 89 mM Borsäure • 7,5g 2mM EDTA-Na₂ <p>Mit destilliertem Wasser auf 1000ml aufgefüllt</p> <p><u>5x TBE Puffer in fertiger Pulverform zum Auflösen in Wasser (pH 8,3):</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • 89 mM Tris • 89 mM Borsäure • 2 mM EDTA 	Sigma Aldrich®, St. Louis, USA Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D Calbiochem®, San Diego, USA Sigma Aldrich®, St. Louis, USA
Roti®-Safe	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
<u>1 kb Plus Längenstandard:</u> <ul style="list-style-type: none"> • 50µl 1 kb Plus DNA Ladder • 50µl 10x Ladepuffer • 400µl nucleasefreies Wasser 	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA siehe unten
<u>10x Ladepuffer:</u> <ul style="list-style-type: none"> • Glycerol • Na₂-EDTA 2H₂O 0,37g 100 mM • Natriumdodecylsulfat 0,1 g 1% w/v • Bromphenolblau 0,01 g 1% w/v <p>Deionisiertes Wasser auf 10 ml</p>	Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz Carl Roth® GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Light Cycler® FastStart DNA Master SYBR® Green I	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D

Material und Methoden

Tabelle 15: Hilfsmittel

Hilfsmittel	Hersteller
Pipetten (10µl, 20µl, 100µl, 1000µl)	Eppendorf Reference®, Eppendorf, Hamburg, D
Pipettenspitzen Biosphere® Quality und Filter Tips (10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl)	SARSTEDT, Nümbrecht, D
Eppendorf Cups (1,6 ml)	Biozym® Scientific GmbH, Oldendorf, D
PCR Single Cap 8er-Softstrips 0,2 ml	Biozym® Scientific GmbH, Oldendorf, D
LightCycler® Capillaries (20µl)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D

Tabelle 16: Geräte

Gerät	Hersteller
<u>Zentrifugen:</u>	
<ul style="list-style-type: none"> • Biofuge pico • Micro Zentrifuge Sprout 	Heraeus, Hanau, D Biozym® Scientific, Oldendorf, D
<u>Heizplatte und Magnetrührer:</u>	
<ul style="list-style-type: none"> • Heidolph MR 3001 K • Stuart SB 162 	Bibby Scientific, Staffordshire, UK Bibby Scientific, Staffordshire, UK
Minishaker MS2	IKA®, Staufen im Breisgau, D
<u>Thermocycler:</u>	
<ul style="list-style-type: none"> • TGradient • T1 Thermocycler 	Biometra® GmbH, Göttingen, D Biometra® GmbH, Göttingen, D
LightCycler 2.0 PCR Device	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
<u>Gelkammern:</u>	
<ul style="list-style-type: none"> • Horizon 20.25 Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus • Horizon 11.14 Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus 	Gibco®, Life Technologies™, Carlsbad, USA Gibco®, Life Technologies™, Carlsbad, USA
Gießvorrichtung für Gelträger	Armin Baack Labortechnik, Schwerin, D
Waage	

Material und Methoden

CP 4204	Sartorius AG, Göttingen, D
ChemiDoc™ XRS+ with Image Lab Software	Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, USA
Spannungsgerät PS 304	Gibco®, Life Technologies™, Carlsbad, D
Kühlschrank +4°C	Liebherr, D
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, D
Mikrowelle Privileg 4020	Quelle, Fürth, D
<u>Software:</u> <ul style="list-style-type: none">• Microsoft Word 2008 und 2018• Microsoft Excel 2008 und 2018	Microsoft, Unterschleißheim, D Microsoft, Unterschleißheim, D

2.3 SNP-Auswahl

Für diese Arbeit wurde ein SNP im Promotor des ESRRA-Gens mit Hilfe der Internetseiten www.genecards.org und www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP ausgewählt. Dieser ist dort unter der Bezeichnung rs72924108 bekannt.

2.4 Polymerase Chain Reaction

Die Polymerase Ketten Reaktion (PCR) ist eine Labormethode, die der enzymatischen Vervielfältigung von Nukleinsäuren dient. Entdecker dieser molekularbiologischen Methode war Kary Mullis (123).

Die PCR besteht aus drei sich wiederholenden Schritten (Abbildung 4):

1. Denaturierung: Dieser Schritt dient dem Ablösen der DNA-Stränge voneinander. Hierbei entstehen zwei Einzelstränge. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Temperatur von 94 °C gewählt.
2. Annealing: Es lagert sich jeweils ein Primer an den Einzelsträngen an. Primer sind synthetisch hergestellte Oligonukleotide, die den Ausgangspunkt der Synthese festlegen und deren Sequenzen komplementär zu einem der Einzelstränge der doppelsträngigen, ursprünglichen DNA sind. Die Reaktionstemperatur in diesem Schritt ist von den eingesetzten Primern abhängig.

Material und Methoden

3. Elongation: Die DNA-Synthese erfolgt durch die DNA-Polymerase. Die Temperatur richtet sich nach dem eingesetzten Enzym. In dieser Arbeit wurde eine Temperatur von 72 °C für die verwendete Taq-Polymerase verwendet.

Am Ende jedes Zyklus liegt also theoretisch im Vergleich zum Zyklus zuvor die doppelte Menge der zu vervielfältigenden DNA vor.

Bei dieser Arbeit wurde eine Taq-Polymerase, die aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* stammt, verwendet. Sie zeichnet sich durch Hitzeunempfindlichkeit aus (124). Weiterhin werden Oligonukleotide, die die Bausteine der DNA darstellen und Polymerase-Puffer benötigt.

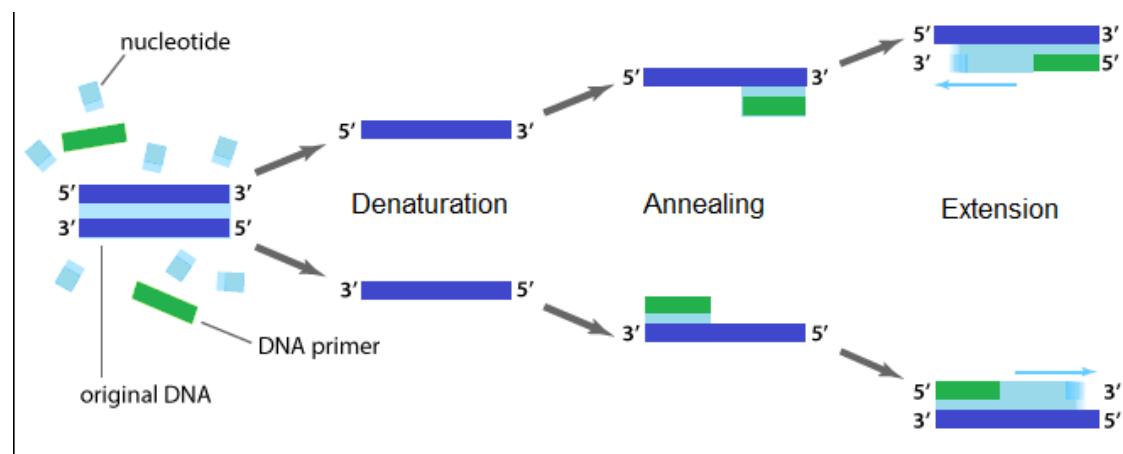


Abbildung 4: Polymerase Ketten Reaktion als Schema (nach <https://www.xpresspcr.com/all-news/polymerase-chain-reaction-the-past-present-and-future/>, abgerufen am 13.08.2019)

2.5 Tetra-Primer Amplification Refractory Mutation System-PCR

Die Tetra-Primer Amplification Refractory Mutation System (ARMS)-PCR ist eine modifizierte Methode der herkömmlichen PCR zur Analyse von SNPs, die von Ye et al. ausführlich vorgestellt wird. Bei dieser Form der PCR werden nicht zwei, sondern vier Primer eingesetzt, nämlich zwei äußere Primer und zwei innere Primer. Die inneren Primer sind durch einen Mismatch an der 3'-terminalen Base für jeweils eines der zwei Allele spezifisch. Die Spezifität wird durch einen zusätzlichen Mismatch, der zwei Positionen von der 3'-terminalen Base entfernt ist, erhöht. Die Primer können sich also nur dann erfolgreich an die DNA anlagern, wenn das entsprechende Nukleotid auch an der Stelle vorhanden ist. Außerdem werden die Primer durch die Bezeichnungen vorwärts und rückwärts näher charakterisiert. Es bilden jeweils ein

Material und Methoden

äußerer vorwärts Primer und ein innerer rückwärts Primer sowie ein äußerer rückwärts Primer und ein innerer vorwärts Primer zwei PCR-Produkte, die die unterschiedlichen Allele darstellen. Da die äußeren Primer unterschiedlich weit von dem untersuchten Nukleotid entfernt sind, sind die zwei entstehenden Amplicons unterschiedlich groß und können somit per Agarosegelektrophorese unterschieden werden (Abbildung 5) (125).

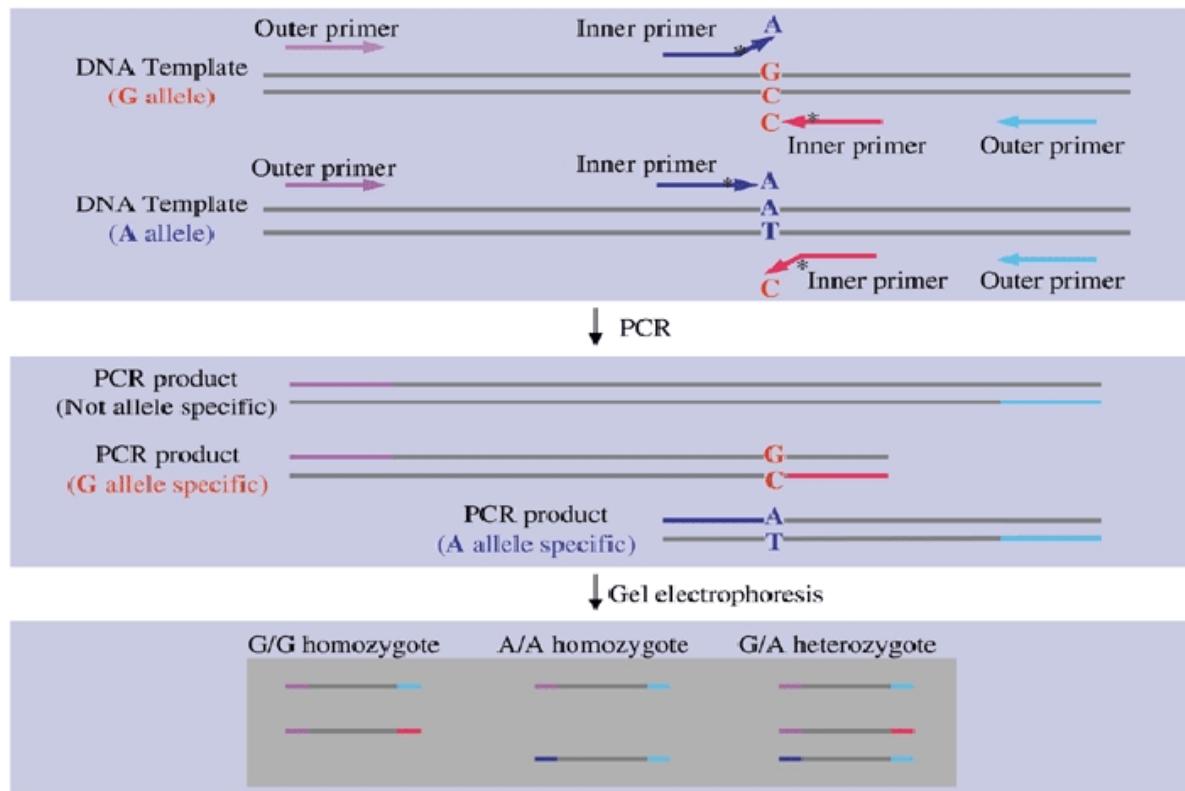


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Tetra-Primer ARMS-PCR (nach Ye S et al. 2001 (125))

2.6 SNP-Primer

Für diese Arbeit wurden zu dem SNP vier verschiedene Primer entwickelt, deren Sequenz in der nachfolgenden Tabelle 17 aufgeführt ist.

Material und Methoden

Tabelle 17: Primer zur Analyse des SNP rs72924108

Primer	Sequenz	Base pairs (bp)
Innerer T-Primer (IPT)	GAGGAGGTGTACGTCTTCCATTGT	205 bp
Innerer C-Primer (IPC)	GCTTAGAAATTGTAACCAGCAACGGG	168 bp
Äußerer Primer 1 (OP1)	TCCCAAAGTATTGGGATTACAAGTGTGA	321 bp
Äußerer Primer 2 (OP2)	TTGTGAAGTTGAAGGTGACAATCCAG	321 bp

2.7 PCR-Ansatz

Die beschriebenen SNP Primer wurden zusammen mit den anderen für die Tetra-Primer ARMS-PCR benötigten Reagenzien eingesetzt. Um einen optimalen PCR-Ansatz zu erreichen, mussten zuerst verschiedene Möglichkeiten getestet werden. Es war wichtig, den PCR-Ansatz so oft zu variieren, bis in der Agarosegelektrophorese eine eindeutige Zuordnung des Genotyps zu den Proben möglich war. Dabei wurden insbesondere das Verhältnis der Primer zueinander und die Annealingtemperatur geändert. Wir gingen zunächst von dem in Tabelle 18 aufgeführten Standardansatz aus.

Zur Herstellung des Ansatzes wurde ein Mastermix aus allen Reagenzien bis auf die DNA hergestellt. Dabei wurden alle Reagenzien bis auf die GoTaq® DNA Polymerase aufgetaut und auf Eis gelagert. Nach kurzem Vortexen und Abzentrifugieren wurden die einzelnen Reagenzien in einem Eppendorf Cup zusammengeführt, dann wieder kurz gemischt und abzentrifugiert. Zum Schluss wurde das Enzym hinzugefügt. Danach wurden jeweils 8 µl des Mastermixes in PCR-Tubes pipettiert. Zum Schluss wurde 2 µl der DNA-Probe mit einer Konzentration von 50 ng/µl hinzugefügt. Entsprechend der Probenanzahl, die genotypisiert werden sollte, wurde ein Vielfaches des Ansatzes hergestellt. Die DNA-Proben wurden während den Versuchen auf Eis gelagert. Die PCR-Tubes wurden in den Thermocycler gestellt und das Programm wurde nach dem Protokoll in Tabelle 19 gestartet. Während der Durchführung der Versuche fand ein Austausch der GoTaq® DNA Polymerase durch die GoTaq® G2

Material und Methoden

DNA Polymerase statt. Der Einfachheit halber haben wir nur die GoTaq® DNA-Polymerase in den Ansätzen aufgeführt.

Die Isolation der DNA aus Blutproben ist nicht separat als Methode aufgeführt, da für diese Arbeit bereits isolierte DNA zur Verfügung stand und verwendet wurde.

Tabelle 18: Standard 10 µl PCR-Ansatz

Reagenzien	Menge
IPC 10 µM	0,2 µl
IPT 10 µM	0,2 µl
OP1 10 µM	0,2 µl
OP2 10 µM	0,2 µl
dNTP Mix 10 mM	0,2 µl
GoTaq® Puffer 5x	2,0 µl
GoTaq® DNA Polymerase 5u/µl	0,1 µl
Nucleasefreies Wasser	4,9 µl
DNA 50 ng/µl	2 µl

Tabelle 19: PCR-Protokoll

Schritte
1. 105 °C Vorlauf
2. 94 °C für 10 min
3. 94 °C Dentaurierung für 30 s
4. 60 °C Annealing für 30 s
5. 72 °C Elongation für 1 min
→ Wiederholung der Schritte 3.-5. 37 Mal
6. 72 °C Finale Elongation für 5 min
7. 4°C Pause bis die Tubes entfernt wurden

Da die Bande des C-Allels in der Agarosegelektrophorese anfangs nicht eindeutig sichtbar war, musste mehr von dem IPC eingesetzt werden. Folgender Ansatz wurde dann etabliert (Tabelle 20). Der PCR-Ansatz musste zwar wie in Kapitel 2.10

Material und Methoden

beschrieben immer wieder abgeändert werden, um eindeutige Ergebnisse festzustellen. Die optimierten Ansätze basierten jedoch immer auf den in Tabelle 20 beschriebenen Ansatz.

Tabelle 20: 10 µl PCR-Ansatz zur Analyse des SNPs rs72924108

Reagenz	Menge
IPC 10 µM	1,0 µl
IPT 10 µM	0,2 µl
OP1 10 µM	0,2 µl
OP2 10 µM	0,2 µl
dNTP Mix 10 mM	0,2 µl
GoTaq® Puffer 5x	2,0 µl
GoTaq® DNA Polymerase 5u/µl	0,1 µl
Nucleasefreies Wasser	4,1 µl
DNA 50 ng/µl	2 µl

Die Annealing-Temperatur und der Rest des PCR-Programms konnten wie oben beschrieben belassen werden. Die PCR-Produkte wurden dann auf ein 1,5%iges Agarosegel (siehe unten) aufgetragen. Es wurde bei jedem Versuch eine Wasserprobe als Negativkontrolle mit aufgenommen, um eine Kontamination auszuschließen.

2.8 Agarosegelektrophorese

Mittels Agarosegelektrophorese können Amplicons aus einer PCR nach Ihrer Größe aufgetrennt und sichtbar gemacht werden. Das Verfahren basiert auf die Erkenntnis, dass geladene Teilchen in einem elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe unterschiedlich weit wandern können. In diesem Fall sind die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA von Bedeutung. Durch das Anlegen einer elektrischen Spannung wandern die DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe durch die aus Agarose bestehende Gelmatrix zur Anode. Dabei legen kleinere Fragmente eine größere Strecke zurück als große. Für diese Arbeit wurden 3,6 Millimeter (mm) dicke 1,5%ige Agarosegele verwendet. Diese wurden mit 2,7 g Agarose und 180 ml TBE 1x

Material und Methoden

Puffer hergestellt. Nachdem die Reagenzien in einer Mikrowelle zum Kochen gebracht wurden, wurde nach Abkühlen 9 µl des Roti®-Safe hinzugefügt. Das Gel wurde dann in einen Gelträger gegossen und zwei 30er Kämme wurden eingesetzt, damit Taschen zum Beladen der DNA-Proben entstehen. Das feste Gel wurde dann in eine mit 1x TBE gefüllte Gelelektrophoresekammer gelegt und die Kämme entfernt. Die Taschen wurden mit den DNA-Proben beladen, als Längenstandard wurde eine 1 kb Ladder mit aufgetragen. Eine Stromquelle wurde angeschlossen und eine Stromstärke von 140 mA für ca. 75 min eingestellt. Als die zu untersuchenden Proben weit genug gewandert waren, wurde die Elektrophorese beendet und der Gelträger aus der Gelkammer entfernt. Zum Schluss konnten im ChemiDoc™ Imager mittels Ultraviolet-Licht die aufgetrennten Banden im Gel sichtbar gemacht werden. Dafür war das zu Beginn eingesetzte Reagenz Roti®-Safe verantwortlich, das ein Fluoreszenzfarbstoff ist. Fluoreszenzfarbstoffe lagern sich in die DNA ein, wirken also interkalierend. Das entstandene Gelbild konnte dann ausgewertet werden: die Bandengröße der Allele war bekannt und dank der 10 kb Ladder konnte eingeschätzt werden, wo die entsprechenden Banden liegen müssten. Abbildung 6 zeigt ein Beispiel für ein Gelbild, das im Rahmen der vorliegenden Arbeit entstanden ist.

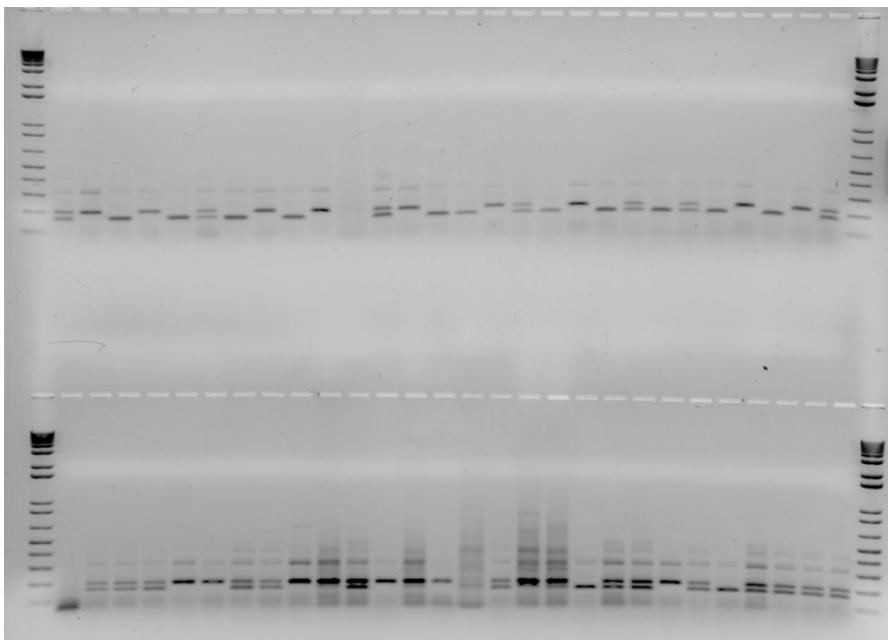


Abbildung 6: Beispiel eines Gelelektrophoresebildes des SNPs rs72924108. Auswertung der ersten vier oberen Bahnen: 1. Bahn: 10 kb Ladder, 2. Bahn: CT (heterozygot), 3. Bahn: TT (homozygot), 4. Bahn: CC (homozygot)

Material und Methoden

2.9 Optimierungsversuche

2.9.1 Doppelter Ansatz

Während der experimentellen Phase der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Variationen des PCR-Ansatzes hergestellt, um eindeutige Banden zu erkennen. Grundlage dieser Ansätze war immer das in Kapitel 2.8 vorgestellte Basisrezept. Dabei wurde je nach Bedarf vor allem die DNA-Menge variiert und die Wassermenge angepasst. Auch erhoffte man sich mit doppelten oder dreifachen Ansätzen klare Ergebnisse zu erzielen. Im Folgenden werden einige Änderungen der Ansätze beispielhaft gezeigt. Variationen des Gels wurden ebenso vorgenommen.

Noch relativ am Anfang der Arbeit konnte festgestellt werden, dass manche Proben mit dem in Kapitel 2.8 beschriebenen Ansatz nicht eindeutig genotypisiert wurden. Deshalb wurde dieser optimiert und der Ansatz wie in Tabelle 21 beschrieben verwendet.

Tabelle 21: Doppelter 20 µl Ansatz zur Analyse des SNP rs72924108

Reagenz	Menge
IPC 10 µM	2,0 µl
IPT 10 µM	0,4 µl
OP1 10 µM	0,4 µl
OP2 10 µM	0,4 µl
dNTP Mix 10 mM	0,4 µl
GoTaq® Puffer 5x	4,0 µl
GoTaq® DNA Polymerase 5u/µl	0,2 µl
Nucleasefreies Wasser	8,2 µl
DNA 50 ng/µl	4 µl

Die Zyklenzahl des Programms wurde dabei auf 40 erhöht.

Die Proben wurden dann auf ein 5 mm dickes 1,5%iges Agarosegel (250 ml TBE 1x Puffer, 3,75 g Agarose und 12,5 µl Rotisafe) aufgetragen.

Material und Methoden

2.9.2 Ansatz für uneindeutige Proben

Proben, die nach dem ersten Durchgang noch kein eindeutiges Ergebnis lieferten, wurden mit veränderten Ansätzen wiederholt und deren PCR-Produkte auf unterschiedliche Gele aufgetragen. Dabei hat sich folgender Ansatz etabliert (Tabelle 22).

Tabelle 22: Modifizierter 10 µl PCR-Ansatz zur Analyse des SNP rs72924108

Reagenz	Menge
IPC 10 µM	1,0 µl
IPT 10 µM	0,2 µl
OP1 10 µM	0,2 µl
OP2 10 µM	0,2 µl
dNTP Mix 10 mM	0,2 µl
GoTaq® Puffer 5x	2,0 µl
GoTaq® DNA Polymerase 5u/µl	0,1 µl
Nucleasefreies Wasser	0,1 µl
DNA 50 ng/µl	6 µl

Das PCR-Programm wurde auf 42 Zyklen erhöht. Die PCR-Produkte wurden auf ein 3,6 mm dickes, 1,8%iges Agarosegel aufgetragen. Dieser wurde mit 180 ml TBE 1x Puffer, 3,24 g Agarose und 9 µl Rotisafe hergestellt. Beim Gelgießen wurde nur der obere Kamm eingesetzt, sodass eine längere Laufzeit möglich war.

2.10 Methodenvalidierung

Um die Reproduzierbarkeit der Methode der Tetra-ARMS-PCR und der Agarosegelektrophorese zu bestätigen, wurden etwa 100 Proben erneut genotypisiert und die Ergebnisse des ersten und zweiten Durchgangs verglichen. Dieser Versuch war erfolgreich. Lediglich der Genotyp einer Probe zeigte ein widersprüchliches, wenn auch nicht eindeutiges Ergebnis hinsichtlich des eigentlich zugewiesenen Genotyps und wurde deshalb aus der Studie entfernt.

Material und Methoden

2.11 Quantitative Real Time PCR

Eine große Menge an Proben aus der Ovarialkarzinomgruppe ließ sich mittels Tetra-Primer ARMS-PCR nicht erfolgreich genotypisieren. Um eine ausreichend große Stichprobe dieser Karzinomgruppe zu gewährleisten, wurde für diese Proben die qPCR mittels Light Cycler® angewandt. Die qPCR stellt eine weitere Methode zur Amplifikation von DNA-Fragmenten dar, ermöglicht aber eine Messung in Echtzeit mithilfe Fluoreszenzfarbstoffe, z.B. SYBR® Green I. Wie bei einer herkömmlichen PCR werden die einzelnen Reaktionsschritte Denaturierung, Annealing und Elongation durchlaufen.

Auch bei der qPCR etablierte sich nach mehreren Versuchen ein Ansatz. Das Vorgehen zur Herstellung eines Ansatzes war ähnlich wie für die Tetra-Primer ARMS-PCR. Nach Erstellen eines Ansatzes wurde dieser jedoch nach dem Abzentrifugieren in PCR-Tubes in Light Cycler® Kapillare pipettiert. Diese wurden anschließend mit einem Stopfen verschlossen. Nach nochmaligem Abzentrifugieren wurden diese Kapillaren in das Kapillarkarussell des Light Cyclers® gestellt und die qPCR konnte nach einem bestimmten Protokoll (Tabelle 24) gestartet werden. Auch bei dieser PCR basierten Methode wurde eine Wasserprobe als Negativkontrolle immer mituntersucht (Tabelle 23).

Tabelle 23: Light Cycler Ansatz

Reagenz	Menge
RNase freies Wasser	4,8 µl
MgCl ₂	0,6 µl
IPT	0,2 µl
IPC	1,0 µl
OP1	0,2 µl
OP2	0,2 µl
10x Fast Start DNA Master	1 µl
SYBR® Green I	
DNA 50 ng/µl	2 µl

Material und Methoden

Tabelle 24: qPCR Protokoll

Schritte
1. 95 °C Startschmelze 15 min
2. 95 °C Denaturierung 15 s
3. 60 °C Annealing
4. 72 °C Elongation
Wiederholung der Schritte 2.-4. 48 Mal

Mithilfe der Schmelzkurvenanalyse, die das unterschiedliche Schmelzverhalten unterschiedlich großer PCR-Produkte ausnutzt, ist eine direkte Zuordnung des Genotyps auch möglich. Dabei spiegeln Peaks in der Schmelzkurvenanalyse die möglichen PCR-Produkte wieder (Abbildung 7). In der vorliegenden Arbeit wurden die Genotype jedoch wie nach der Tetra-Primer ARMS-PCR im Anschluss an die qPCR mittels Agarosegelektrophorese ermittelt. Das Vorgehen war wie in Kapitel 2.9 beschrieben. Im Unterschied dazu mussten die Ansätze aus den Light Cycler Kapillaren in Eppendorf Cups überführt werden und anschließend noch 1 µl eines 10x Ladebuffers hinzugefügt werden.

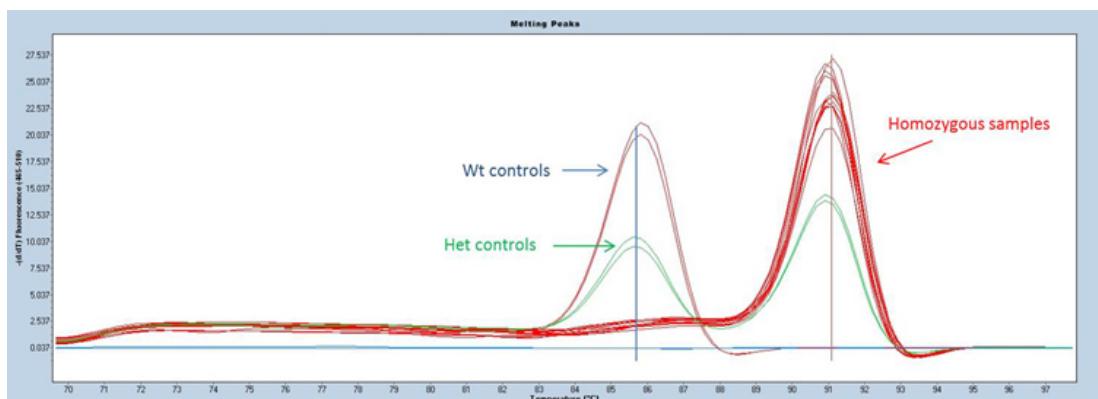


Abbildung 7: Das abgeleitete Hochauflösungsschmelzkurvendiagramm erlaubt die Darstellung der Genotype der Wildtyp-, der heterozygoten und der mutierten homozygoten Proben (nach [https://www.jax.org/news-and-insights/jax-blog/2015/september/hold-the-agarose-advanced-pcr-methods-for-genotyping-mice](https://www.jax.org/news-and-insights/jax-blog/2015/september/hold-theagarose-advanced-pcr-methods-for-genotyping-mice), abgerufen am 22.08.2019)

2.12 Statistische Auswertung

Die experimentell ermittelten Genotype wurden in Microsoft Excel übertragen.

Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse zu dem SNP rs72924108 wurden Microsoft Excel, die Webseite des Instituts für Humangenetik der Technischen Universität München (<https://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>), die die DeFinetti Software

Material und Methoden

nutzt und die Webseite SISA (<http://www.quantitativeskills.com/sisa/index.htm>) zur Durchführung des Fisher's Exact Tests eingesetzt.

Grundlage der statistischen Auswertung waren die Nullhypothese H_0 und die Alternativhypothese H_1 . Die erste geht von einer Unabhängigkeit zweier Merkmale aus (z.B. Allele des SNPs und ein Karzinom, Allele des SNPs und klinisch-pathologische Merkmale). Unterschiede in der Allelverteilung zwischen der Kontroll- und Karzinomgruppe würden demnach zufällig entstehen.

Die Alternativhypothese H_1 hingegen besagt, dass die zwei Merkmale voneinander abhängig sind und Unterschiede statistisch signifikant seien. Zur Überprüfung der Nullhypothese bzw. der Unabhängigkeit der Merkmale wurden verschiedene Tests, die im Abschnitt 2.13.3 genauer erläutert werden, durchgeführt. Es wurde ein Signifikanzniveau α von 0,05 festgelegt, bei p-Werten zwischen 0,05 und 0,1 sprach man von einem Trend. Das heißt, dass die Nullhypothese H_0 bei p-Werten $<0,05$ mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $<5\%$ zugunsten der Alternativhypothese H_1 verworfen wurde.

2.12.1 Assoziationsstudien

Mithilfe von Assoziationsstudien kann untersucht werden, ob bestimmte Allele mit Phänotypen (z.B. Erkrankungen, ER-negative oder schlecht differenzierte Karzinome) verbunden sind. Dies soll am Beispiel der vorliegenden Arbeit erklärt werden. Es wurde überprüft, ob der interessierende SNP im Zusammenhang mit einem Karzinom steht. Dazu wurden die Allel-, Genotypfrequenzen und die Allelpositivität der Kontroll- und der Karzinomgruppen ermittelt und die Verteilung dieser innerhalb der zwei Gruppen betrachtet. Die Nullhypothese H_0 besagt, dass kein Unterschied in der Verteilung vorliegt, also, dass der SNP und das Karzinom unabhängig voneinander auftreten. Kommt jedoch z.B. ein Allel des SNPs innerhalb der erkrankten Gruppe signifikant häufiger vor, wird die Alternativhypothese H_1 angenommen. Der SNP und das Karzinom sind voneinander abhängig.

Im Hinblick auf die klinisch-pathologischen Merkmale sind Assoziationsstudien ebenso möglich. In diesem Fall wird jedoch die Abhängigkeit des SNPs beispielsweise mit dem Grading eines Karzinoms untersucht.

Material und Methoden

2.12.2 Das Hardy-Weinberg-Equilibrium

Mit dem Hardy-Weinberg-Equilibrium (HWE) ist eine Berechnung der Genotyphäufigkeiten in einer Population möglich. Die oben genannte Software überprüft die erhobenen Ergebnisse auf eine mögliche Abweichung vom HWE und erlaubt somit eine Aussage darüber, ob die errechneten Häufigkeiten mit den erhobenen Häufigkeiten vereinbar sind. Da ein Signifikanzniveau α von 0,05 gewählt wurde, sprach ein p-Wert $<0,05$ für eine signifikante Verletzung des HWEs bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $<5\%$.

2.12.3 Chi²-Test und Fisher's Exact Test

Der Chi²-Test und Fisher's Exact Test sind beide Tests, die die Unabhängigkeit zweier Merkmale voneinander überprüfen. Zunächst zum Chi²-Test: Ein Beispiel aus der vorliegenden Arbeit wäre ein Allel als Exposition und der Krankheitsstatus als Ereignis. Um die Informationen darzustellen, wird eine Vierfeldertafel verwendet (Tabelle 25).

Tabelle 25: Vierfeldertafel zur Veranschaulichung der beobachteten Häufigkeiten (126)

Ereignis	Ja	Nein	
Exposition	Ja	O ₁	O ₂
Exposition	Nein	O ₃	O ₄
O ₁ +O ₃		O ₂ +O ₄	

Die Buchstaben O₁₋₄ geben dabei die jeweiligen beobachteten Häufigkeiten an. Wenn man davon ausgeht, dass die zwei Merkmale voneinander unabhängig sind, müsste der Anteil an Karzinompatientinnen mit einem Allel genauso hoch sein wie der an Kontrollpatientinnen mit diesem Allel. So kommt man zu einer zweiten Kontingenztabelle, die die erwarteten Ergebnisse (E_{1-E₄}) angibt (Tabelle 26).

Material und Methoden

Tabelle 26: Vierfeldertafel zur Veranschaulichung der zu erwartenden Häufigkeiten (126)

Ereignis	Ja	Nein	
Exposition	Ja	E_1	E_2
Exposition	Nein	E_3	E_4
	E_1+E_3	E_2+E_4	

Unsere Nullhypothese besagt also, dass der Krankheitsstatus (Kontrolle oder Karzinom) oder das klinisch-pathologische Merkmal (z.B. Grading 1 und 2 im Vergleich zum Grading 3) von dem Allel unabhängig ist. Um dies zu überprüfen vergleichen wir die Werte der ersten mit der zweiten Tabelle und stellen fest, dass diese sich entweder sehr ähnlich sind oder sich stark unterscheiden. Dazu führen wir den Chi²-Test durch:

$$\chi^2 = \sum \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}.$$

Dabei ist O die beobachtete Häufigkeit und E die erwartete Häufigkeit. Der Buchstabe i kann Werte 1 bis n annehmen, wenn n die Anzahl an Zellen in der Kontingenztabelle ist. Mit dem Wissen, dass in dieser Arbeit ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ gewählt wurde und eine 2x2 Kontingenztabelle vorliegt, ist der Chi²-Wert=3,841. Ist der Wert $\chi^2 > 3,841$, können wir davon ausgehen, dass eine Abhängigkeit vorliegt. Das heißt, die Nullhypothese wird verworfen und die Alternativhypothese, nämlich, dass eine Abhängigkeit besteht, angenommen (126).

Der Fisher's Exact Test wird auch zur Überprüfung der Abhängigkeit zweier Merkmale verwendet. Dieser Test ist jedoch genauer und vor allem bei kleineren Zahlen empfohlen (127).

2.12.4 Odds Ratio und Konfidenzintervall 95%

Außerdem wurde die Odds Ratio (OR), also das Quotenverhältnis, berechnet. Diese gibt die Chance an, dass ein Zusammenhang zwischen einer Exposition und einem Ereignis besteht. Um dies genauer zu erklären ist es hilfreich eine Vierfeldertafel zu zeichnen (Tabelle 27).

Material und Methoden

Tabelle 27: Vierfeldertafel zur Berechnung der OR (128)

Ereignis	Ja	Nein	
Exposition	Ja	a	b
Exposition	Nein	c	d

In diesem Fall wird die OR wie folgt berechnet:

$$OR = a/c / b/d = ad/bc$$

Es wird also das Verhältnis aus zwei Quoten berechnet: die, bei denen ein Ereignis eingetreten ist und die ohne Ereignis.

Die OR lässt uns also eine Aussage darüber machen, wie hoch die Chance ist, dass eine Exposition zu einem Ereignis führt, indem sie die Chance, dass dieses Ereignis unter einer bestimmten Exposition auftritt mit der vergleicht, dass diese ohne diese Exposition auftritt. Je nachdem ob die Werte größer, gleich oder kleiner eins sind, kann die OR unterschiedlich interpretiert werden:

- $OR > 1$ Exposition führt zu einer höheren Chance für das Ereignis
- $OR = 1$ Exposition ist nicht mit dem Ereignis assoziiert
- $OR < 1$ Exposition führt zu einer niedrigeren Chance für das Ereignis

Dieses Maß ist für Fall-Kontroll-Studien, wie in dieser Arbeit, geeignet.

Das Konfidenzintervall 95% (CI 95%) wiederum gibt die Genauigkeit der OR an: bei einem großen Intervall ist die OR ungenauer, bei einem kleinen Intervall kann man von einer genaueren OR ausgehen (128).

In der vorliegenden Arbeit wird statt einer Exposition ein Allel als Risikofaktor betrachtet. Um im Bereich der Genotypfrequenz die OR für den heterozygoten Genotyp CT und den selteneren homozygoten Genotyp CC anzugeben, wurde der häufigere homozygote Genotyp – in diesem Fall der Genotyp TT – als Vergleich benutzt.

Diese werden dann wie folgt berechnet:

- OR für den Genotyp CT: ad/bc mit a=Anzahl an Karzinomen mit heterozygotem Genotyp CT, b=Anzahl an Karzinomen mit homozygotem Genotyp TT, c=Anzahl an Kontrollen mit homozygotem Genotyp CT, d=Anzahl an Kontrollen mit homozygotem Genotyp TT

Material und Methoden

- OR für den Genotyp CC: ad/bc mit a =Anzahl an Karzinomen mit homozygotem Genotyp CC, b =Anzahl an Karzinomen mit homozygotem Genotyp TT, c =Anzahl an Kontrollen mit homozygotem Genotyp CC, d =Anzahl an Karzinomen mit homozygotem Genotyp TT

Die OR für den Genotyp TT ist dann der Kehrwert der OR des Genotyps CC.

Ergebnisse

3. Ergebnisse

In diesem Teil der Arbeit werden die Ergebnisse zu den Assoziationsstudien zur besseren Darstellung in Tabellen bzw. Diagrammen aufgeführt. In den Tabellen sind jeweils die absoluten Häufigkeiten sowie in Klammern die relativen Häufigkeiten in Prozent angegeben.

1101 der untersuchten Proben konnten in die vier Subgruppen, die in dieser Arbeit von Interesse waren, eingeteilt werden. Die Verteilung der Patientinnen auf die Subgruppen wird in Tabelle 28 dargestellt.

Tabelle 28: Verteilung der Patientinnen auf die Subgruppen

Subgruppe	Patientinnenanzahl n
Kontrollgruppe	419
Mammakarzinomgruppe	373
Ovarialkarzinomgruppe	133
Endometriumkarzinomgruppe	176
Gesamt	1101

3.1 Ergebnisse zur Kontrollgruppe

Bei der Genotypisierung der Kontrollgruppe konnte die folgende Genotypverteilung festgestellt werden (Tabelle 29). Mit diesen Ergebnissen wurden in dieser SNP Studie die Daten der jeweiligen Karzinomgruppe verglichen. Hinsichtlich des HWE wies die Kontrollgruppe keine Abweichung auf ($p=0,856$). Nach Ausschluss aller Patientinnen ohne Altersangabe ergab sich die Tabelle 30.

Tabelle 29: Genotypverteilung der Kontrollgruppe

Genotyp	Patientinnenanzahl n
CT	192
TT	171
CC	56
Gesamt	419

Ergebnisse

Tabelle 30: Genotypverteilung der Kontrollgruppe nach Ausschluss aller Patientinnen ohne Altersangabe

Genotyp	Patientinnenanzahl n
CT	173
TT	158
CC	49
Gesamt	380

3.2 Ergebnisse zum Mammakarzinom

Zuerst wurde die Gruppe der Patientinnen, bei denen ein Mammakarzinom diagnostiziert wurde, untersucht. Nach der Genotypisierung der Mammakarzinomgruppe konnte die folgende Verteilung der Genotype festgestellt werden (Tabelle 31). Diese wichen nicht vom HWE ab ($p=0,435$).

Tabelle 31: Genotypverteilung der Mammakarzinomgruppe

Genotyp	Patientinnenanzahl n
CT	169
TT	169
CC	35
Gesamt	373

3.2.1 Assoziation des SNPs rs72924108 mit dem Mammakarzinom

Beim Vergleich der Kontrollgruppe mit der Gruppe der Mammakarzinome konnten bezüglich einer Assoziation mit dem SNP rs72924108 zwei Trends festgestellt werden (Tabelle 32). Bei der Untersuchung der Allelfrequenz fiel auf, dass das C-Allel bei der Kontrollgruppe (36,3%) häufiger vorkam als bei der Karzinomgruppe (32,0%) ($OR=0,828$; $CI\ 95\% = 0,672-1,020$). Dagegen war der Anteil an Mammakarzinompatientinnen mit einem T-Allel größer (68,0%) als der der Kontrollgruppe (63,7%) (p -Wert χ^2 -Test=0,076; p -Wert Fisher's Exact-Test=0,080; $OR=1,208$; $CI\ 95\% = 0,980-1,488$). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Karzinomgruppe tendenziell eine Positivität für das T-Allel aufwies (p -Wert χ^2 -Test=0,079; p -Wert Fisher's Exact-Test=0,094; $OR=1,490$; $CI\ 95\% = 0,952-2,331$). Bei

Ergebnisse

dieser Gruppe lag tendenziell häufiger (90,6%) ein TT- oder CT-Genotyp vor als bei der Kontrollgruppe (86,6%).

Tabelle 32: Assoziation des SNPs rs72924108 mit dem Mammakarzinom

	Allelfrequenz		Genotypfrequenz			Allelpositivität	
	T	C	CT	TT	CC	TT+CT	CC+CT
Kontroll-gruppe	534 (63,7%)	304 (36,3%)	192 (45,8%)	171 (40,8%)	56 (13,4%)	363 (86,6%)	248 (59,2%)
Karzinom-gruppe	507 (68,0%)	239 (32,0%)	169 (45,3%)	169 (45,3%)	35 (9,4%)	338 (90,6%)	204 (54,6%)
OR	1,208	0,828	CT: 0,891 TT: 1,581 CC: 0,632			1,490	0,832
CI 95%	0,980- 1,488	0,672- 1,020	CT: 0,662-1,198 TT: 0,986-2,537 CC: 0,394-1,015			0,952- 2,331	0,628- 1,103
P-Wert Chi ² -Test	0,076		0,160			0,079	0,202
P-Wert Fisher's Exact Test	0,080		0,158			0,094	0,222

Ergebnisse

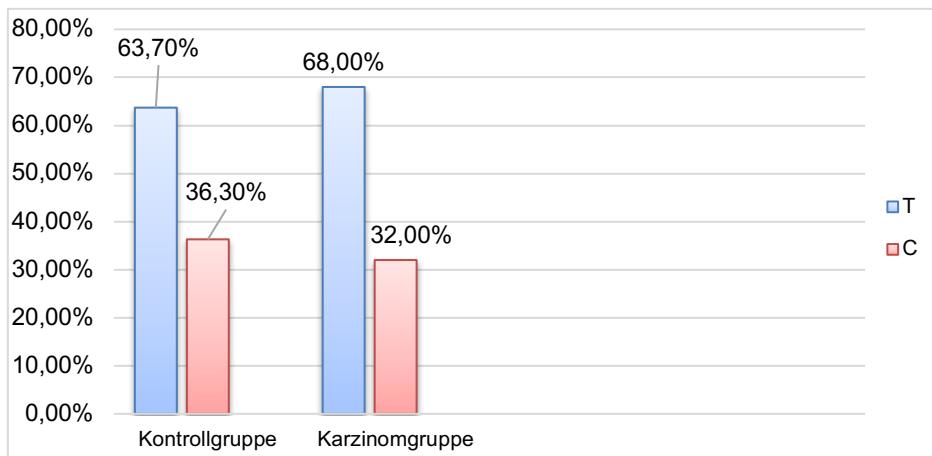


Abbildung 8: Allelfrequenzen der Kontroll- und Mammakarzinomgruppe

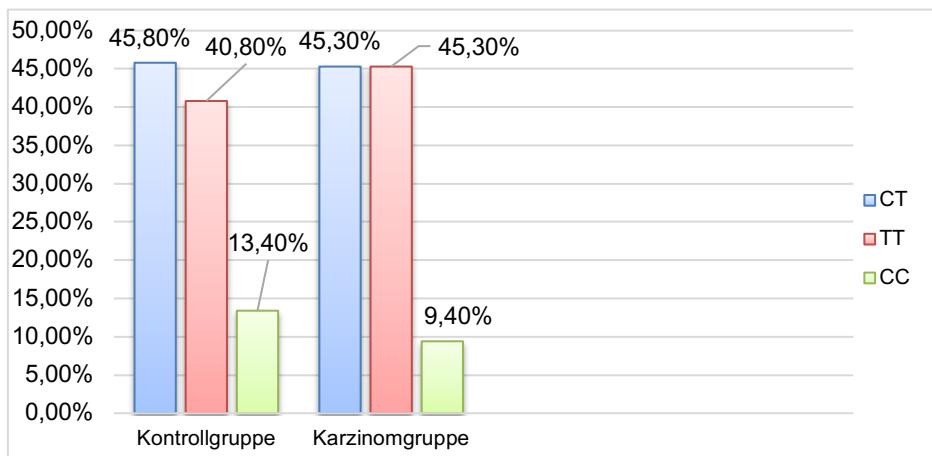


Abbildung 9: Genotypfrequenzen der Kontroll- und Mammakarzinomgruppe

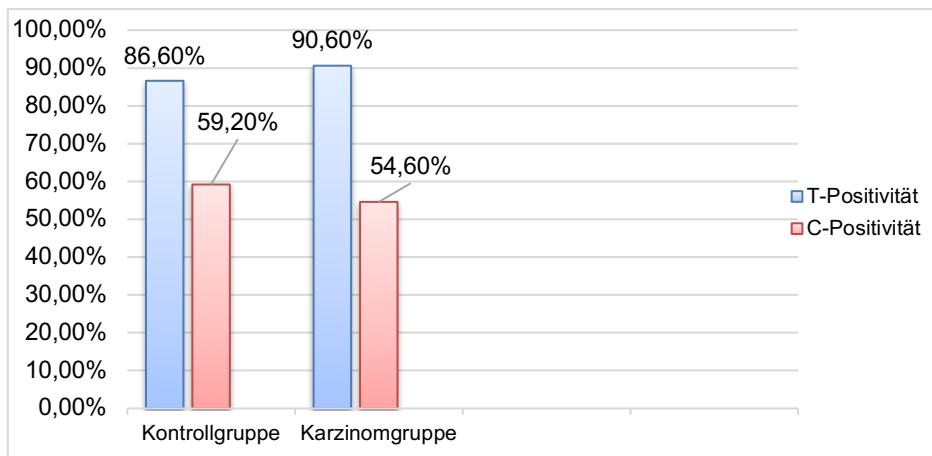


Abbildung 10: Allelpositivitäten der Kontroll- und Mammakarzinomgruppe

Ergebnisse

3.2.2 Assoziation des SNPs rs72924108 mit dem Mammakarzinom nach Alterskorrektur

Um das durchschnittliche Alter der Kontrollgruppe an die der Karzinomgruppe (ca. 60 Jahre alt) anzupassen, wurde eine Alterskorrektur durchgeführt. Dies gelang, indem ausschließlich Patientinnen mit einem Alter >46 Jahre in die Kontrollgruppe eingeschlossen wurden. Nach der Alterskorrektur lagen keine signifikanten Ergebnisse vor (Tabelle 33). Weder die Mammakarzinomgruppe ($p=0,601$), noch die Kontrollgruppe ($p=0,812$) wichen nach Alterskorrektur vom HWE ab.

Tabelle 33: Assoziation des SNPs rs72924108 mit dem Mammakarzinom nach Alterskorrektur

	Allelfrequenz		Genotypfrequenz			Allelpositivität	
Kontroll-gruppe	T 303 (63,9%)	C 171 (36,1%)	CT 111 (46,8%)	TT 96 (40,5%)	CC 30 (12,7%)	TT+CT 207 (87,3%)	CC+CT 141 (59,5%)
Karzinom-gruppe	T 487 (67,8%)	C 231 (32,2%)	CT 161 (44,8%)	TT 163 (45,4%)	CC 35 (9,7%)	TT+CT 324 (90,3%)	CC+CT 196 (54,6%)
OR	0,840	1,190	CT: 0,854 TT: 1,455 CC: 0,687			1,342	0,819
CI 95%	0,658- 1,073	0,932- 1,519	CT: 0,602-1,211 TT: 0,841-2,520 CC: 0,397-1,190			0,799- 2,252	0,587- 1,141
P-Wert Chi ² - Test	0,163		0,364			0,265	0,238
P-Wert Fisher's Exact Test	0,169		0,361			0,284	0,272

Ergebnisse

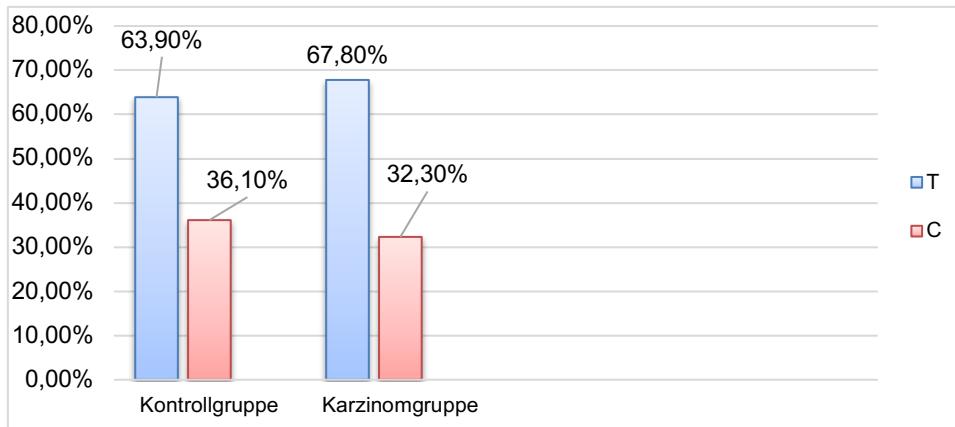


Abbildung 11: Allelfrequenzen der Kontroll- und Mammakarzinomgruppe nach Alterskorrektur

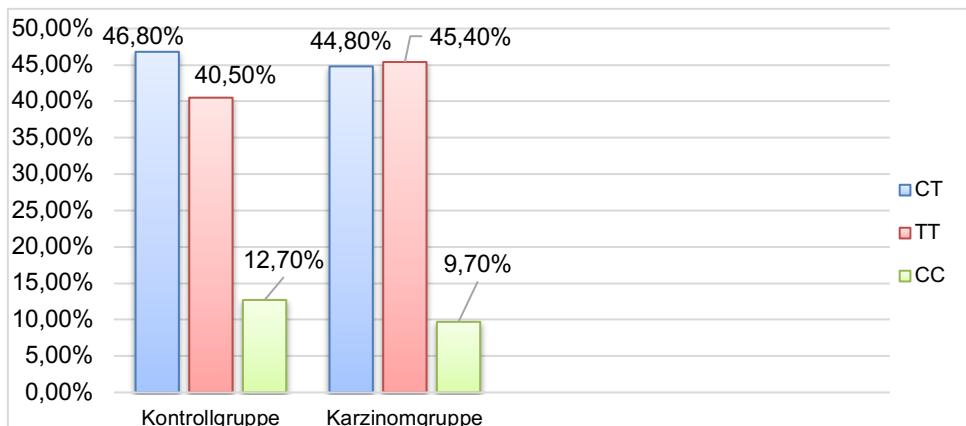


Abbildung 12: Genotypfrequenzen der Kontroll- und Mammakarzinomgruppe nach Alterskorrektur

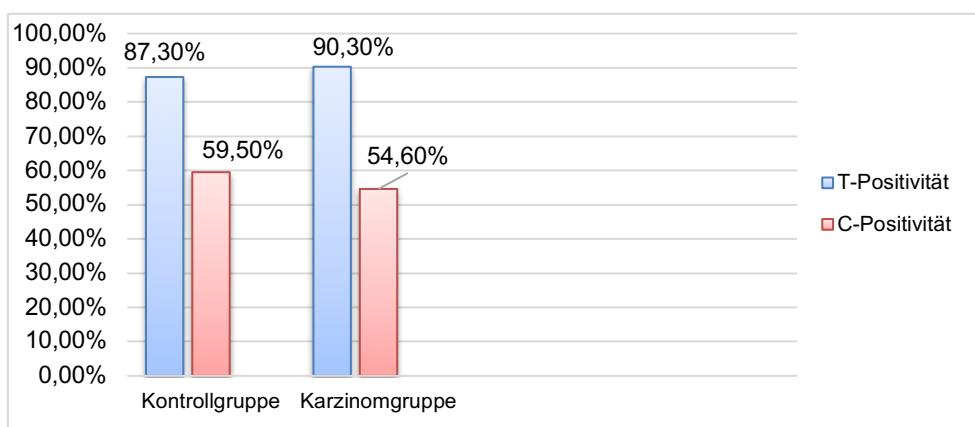


Abbildung 13: Allelpositivitäten der Kontroll- und Mammakarzinomgruppe nach Alterskorrektur

Ergebnisse

3.2.3 Assoziation des SNPs rs72924108 mit klinisch-pathologischen Merkmalen des Mammakarzinoms

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob eine Assoziation zwischen dem SNP rs72924108 und klinisch-pathologischen Merkmalen des Mammakarzinoms vorliegt. Dabei interessierten die Tumogröße, der Nodalstatus und der Differenzierungsgrad, der Steroidhormonrezeptorstatus (ER und PR) und der Her2-Rezeptorstatus. Tabelle 34 gibt Informationen zu der Verteilung der erhobenen Daten.

Ergebnisse

Tabelle 34: Patientinnen der Mammakarzinomgruppe nach Tumogröße, Nodalstatus, Grading, Hormon- und Her2-Rezeptorstatus

Merkmal	Patientinnenanzahl n
Tumogröße	
- is	7
- 1	203
- 2	129
- 3	13
- 4	8
- unbekannt	13
Nodalstatus	
- 0	218
- 1	99
- 2	21
- 3	16
- unbekannt	19
Grading	
- 1	38
- 2	219
- 3	102
- unbekannt	14
Her2-Status	
- positiv	49
- negativ	302
- unbekannt	22
ER-Status	
- positiv	313
- negativ	47
- unbekannt	13
ER-Status	
- positiv	281
- negativ	77
- unbekannt	15

Ergebnisse

3.2.3.1 Assoziation des SNPs rs72924108 mit der Tumorgröße

Das erste klinisch-pathologische Kriterium des Mammakarzinoms, das bezüglich einer Assoziation mit dem SNP rs72924108 untersucht wurde, war die Tumorgröße. Es wurde in keinem Bereich statistische Signifikanz erreicht (Tabelle 35).

Tabelle 35: Assoziation des SNPs rs72924108 mit der Tumorgröße (Tis=Carcinoma in Situ)

	Allelfrequenz		Genotypfrequenz			Allelpositivität	
	T	C	CT	TT	CC	TT+CT	CC+CT
Tis+1							
Erhobene	285	135	89	98	23	187	112
Werte	(67,9%)	(32,1%)	(42,4%)	(46,7%)	(11,0%)	(89,0%)	(53,3%)
T2-4							
Erhobene	205	95	73	66	11	139	84
Werte	(68,3%)	(31,7%)	(48,7%)	(44,0%)	(7,3%)	(92,7%)	(56,0%)
OR	1,022	0,978	CT: 1,218 TT: 1,408 CC: 0,710			1,554	1,114
CI 95%	0,744- 1,405	0,712- 1,345	CT: 0,785-1,890 TT: 0,643-3,082 CC: 0,324-1,554			0,733- 3,294	0,731- 1,697
P-Wert Chi ² -Test	0,893		0,347			0,247	0,616
P-Wert Fisher's Exact Test	0,935		0,359			0,277	0,668

Ergebnisse

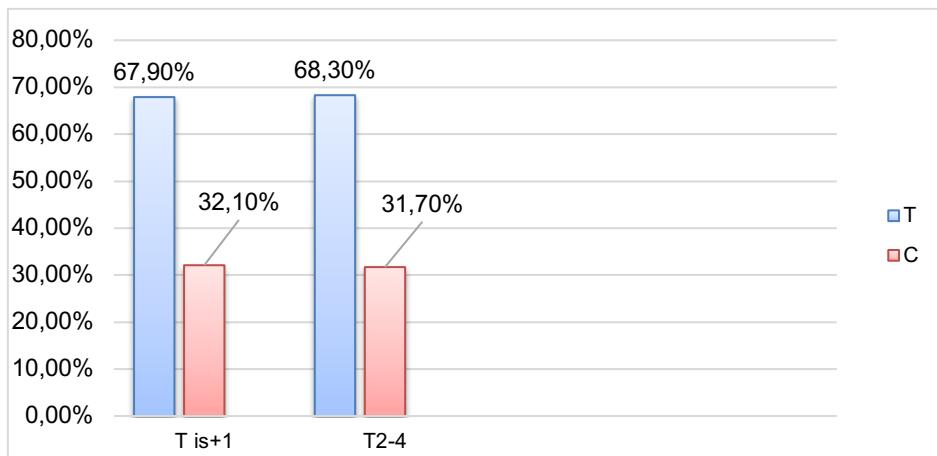


Abbildung 14: Allelfrequenzen der Mammakarzinome nach Tumogröße

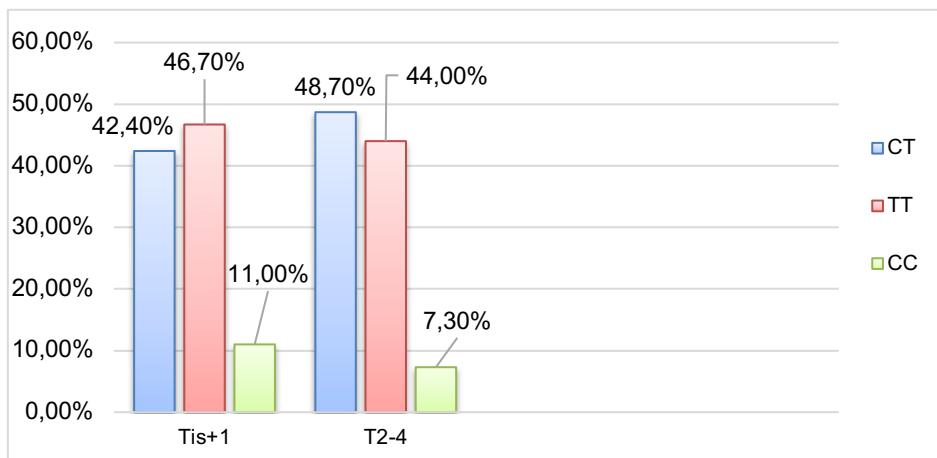


Abbildung 15: Genotypfrequenzen der Mammakarzinome nach Tumogröße

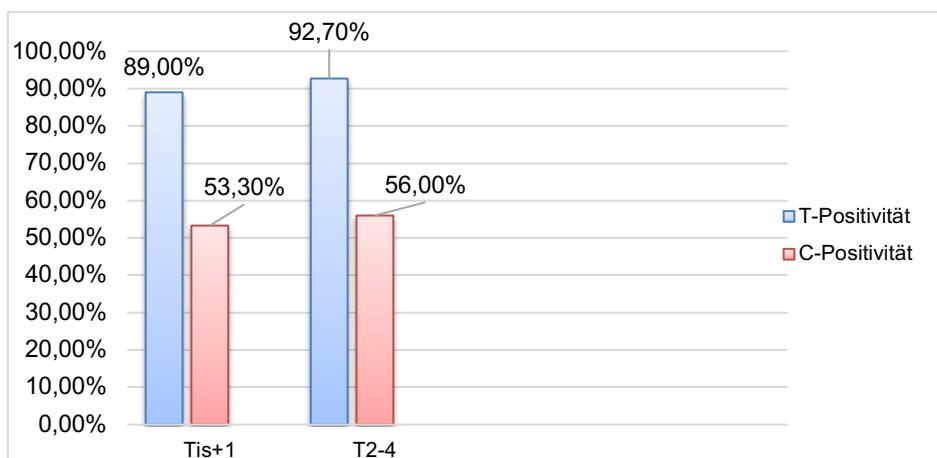


Abbildung 16: Allelpositivitäten Mammakarzinome nach Tumogröße

Ergebnisse

3.2.3.2 Assoziation des SNPs rs72924108 mit dem Nodalstatus

Bei der Erhebung der Daten zum Nodalstatus des Mammakrzinoms, konnte folgende Verteilung der Daten festgestellt werden (Tabelle 36).

Im Bereich der Allelpositivität wurde ein signifikantes Ergebnis erhoben: Die Gruppe der Patientinnen, die keine Lymphknotenmetastasen aufwiesen, war häufiger positiv für das T-Allel (94,0%) als Patientinnen mit einem positiven Nodalstatus (86,8%) (p-Wert Chi²-Test=0,019; p-Wert Fisher's Exact-Test=0,021; OR=0,416, CI 95%=0,197-0,879). Außerdem wurde sowohl in der Kategorie der Allel- als auch der Genotypfrequenz Signifikanz erreicht: Das T-Allel ist bei der nodal-negativen häufiger (71,6%) als bei der nodal-positiven (64,0%) Gruppe gefunden wurden (OR=0,706; CI 95%=0,511-0,975). Dagegen kam das C-Allel öfter bei der positiven (36,0%) als bei der negativen Gruppe (28,4%) vor (p-Wert Chi²-Test=0,034; p-Wert Fisher's Exact Test=0,037; OR=1,417; CI 95%=1,026-1,958). Schließlich wies die Gruppe ohne Lymphknotenmetastasen signifikant häufiger (49,1%) den TT-Genotyp auf, als die Gruppe mit Metastasen (41,2%). Im Vergleich dazu war der CC-Genotyp bei der zweiten Gruppe (13,2%) häufiger verteilt bei der ersten Gruppe (6,0%) (p-Wert Chi²-Test=0,045, p-Wert Fisher's Exact Test=0,047).

Ergebnisse

Tabelle 36: Assoziation des SNPs rs72924108 mit dem Nodalstatus

	Allelfrequenz		Genotypfrequenz			Allelpositivität	
N-negativ (N0) Erhobene Werte	T 312 (71,6%)	C 124 (28,4%)	CT 98 (45,0%)	TT 107 (49,1%)	CC 13 (6,0%)	TT+CT 205 (94,0%)	CC+CT 111 (50,9%)
N-positiv (N1-3) Erhobene Werte	T 174 (64,0%)	C 98 (36,0%)	CT 62 (45,6%)	TT 56 (41,2%)	CC 18 (13,2%)	TT+CT 118 (86,8%)	CC+CT 80 (58,8%)
OR	0,706	1,417	CT: 1,209 TT: 0,378 CC: 2,646			0,416	1,377
CI 95%	0,511- 0,975	1,026- 1,958	CT: 0,768-1,902 TT: 0,173-0,827 CC: 1,209-5,790			0,197- 0,879	0,894- 2,122
P-Wert Chi ² -Test	0,034		0,045			0,019	0,147
P-Wert Fisher's Exact Test	0,037		0,047			0,021	0,155

Ergebnisse

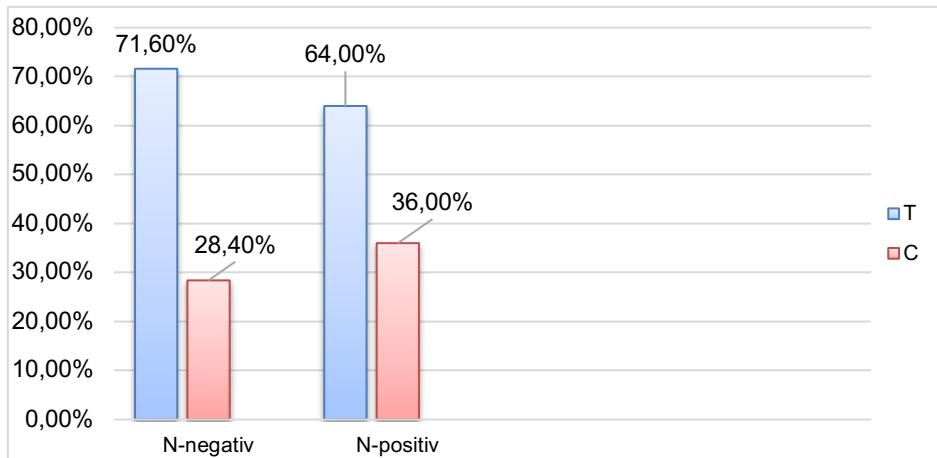


Abbildung 17: Allelfrequenzen der Mammakarzinome nach Nodalstatus

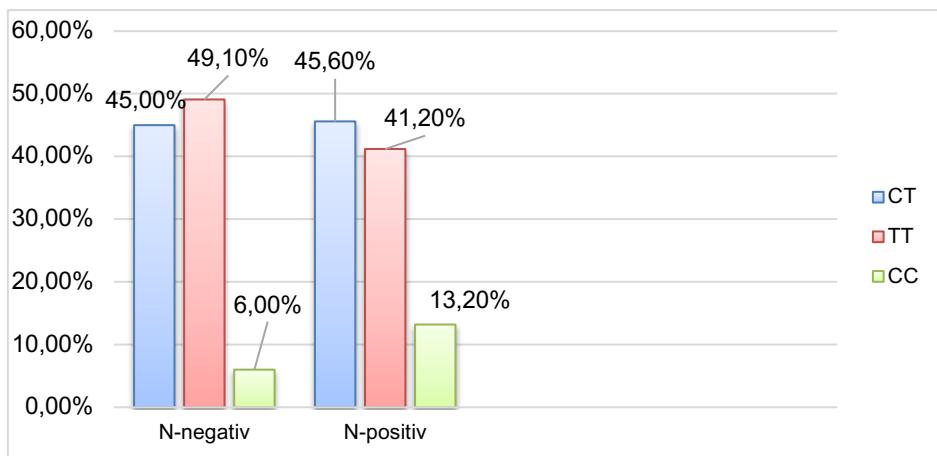


Abbildung 18: Genotypfrequenzen der Mammakarzinome nach Nodalstatus

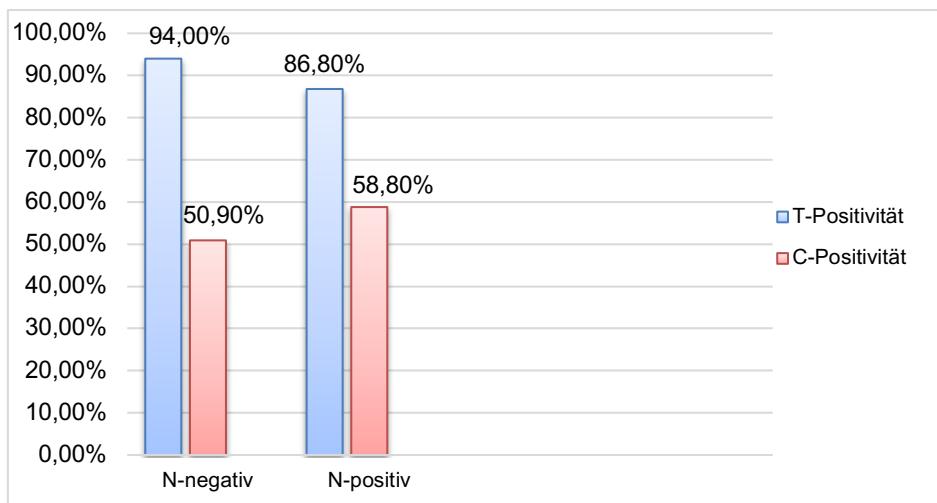


Abbildung 19: Allelpositivitäten der Mammakarzinome nach Nodalstatus

Ergebnisse

3.2.3.3 Assoziation des SNPs rs72924108 mit dem Grading

Als Nächstes war das Grading des Mammakarzinoms von Interesse. Die Unterschiede in der Verteilung der Daten waren nicht signifikant (Tabelle 37).

Tabelle 37: Assoziation des SNPs rs72924108 mit dem Grading

	Allelfrequenz		Genotypfrequenz			Allelpositivität	
	T	C	CT	TT	CC	TT+CT	CC+CT
G1+2							
Erhobene	348	166	118	115	24	233	142
Werte	(67,7%)	(32,3%)	(45,9%)	(44,7%)	(9,3%)	(90,7%)	(55,3%)
G3							
Erhobene	137	67	45	46	11	91	56
Werte	(67,2%)	(32,8%)	(44,1%)	(45,1%)	(10,8%)	(89,2%)	(54,9%)
OR	1,025	0,975	CT: 0,953 TT: 0,873 CC: 1,146			0,852	0,986
CI 95%	0,726- 1,449	0,690- 1,378	CT: 0,587-1,548 TT: 0,396-1,926 CC: 0,519-2,528			0,401- 1,811	0,622- 1,563
P-Wert Chi ² -Test	0,888		0,900			0,677	0,952
P-Wert Fisher's Exact Test	0,930		0,885			0,695	1

Ergebnisse

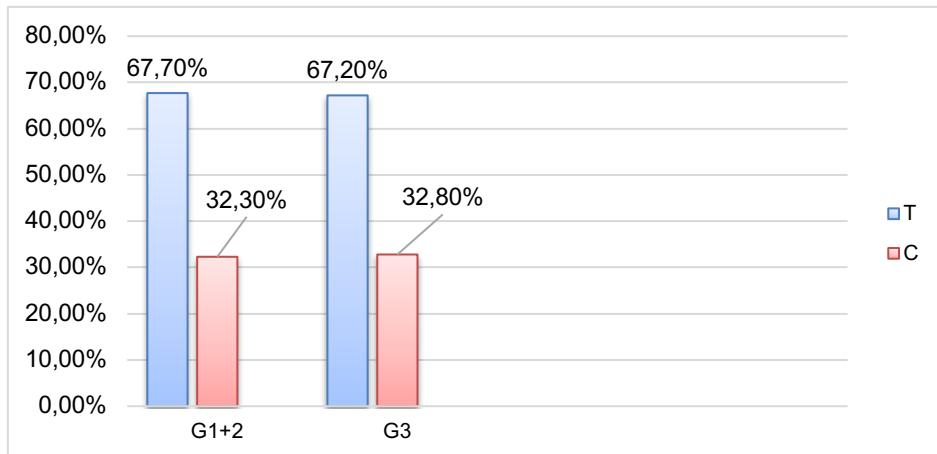


Abbildung 20: Allelfrequenzen der Mammakarzinome nach Grading

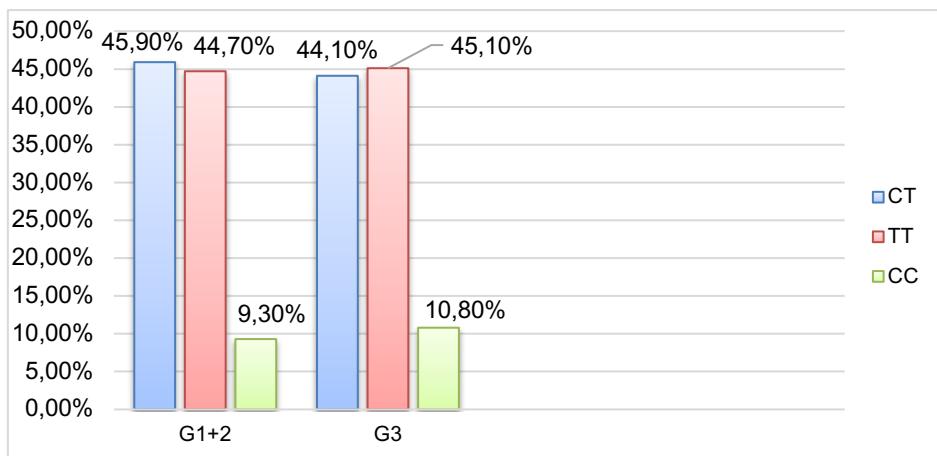


Abbildung 21: Genotypfrequenzen der Mammakarzinome nach Grading

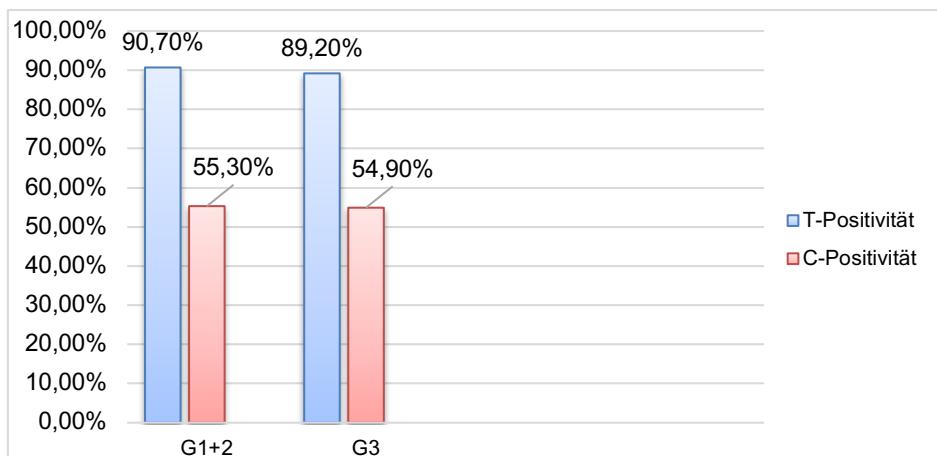


Abbildung 22: Allelpositivitäten der Mammakarzinome nach Grading

Ergebnisse

3.2.3.4 Assoziation des SNPs rs72924108 mit dem Her2-Rezeptorstatus

Im Folgenden wurde verglichen, ob die Verteilung der Allel- und Genotypfrequenzen sowie die Allelpositivität vom Her2-Status des Mammakarzinoms abhängig ist. Die Ergebnisse waren nicht signifikant (Tabelle 38).

Tabelle 38: Assoziation des SNPs rs72924108 mit dem Her2-Rezeptorstatus

	Allelfrequenz		Genotypfrequenz			Allelpositivität	
Her2-positiv	T	C	CT	TT	CC	TT+CT	CC+CT
Erhobene	68	30	18	25	6	43	24
Werte	(69,4%)	(30,6%)	(36,7%)	(51,0%)	(12,2%)	(87,8%)	(49,0%)
Her2-negativ	T	C	CT	TT	CC	TT+CT	CC+CT
Erhobene	411	193	141	135	26	276	167
Werte	(68,0%)	(32,0%)	(46,7%)	(44,7%)	(8,6%)	(91,4%)	(55,3%)
OR	0,940	1,064	CT: 1,451 TT: 1,246 CC: 0,802			1,481	1,289
CI 95%	0,592- 1,492	0,670- 1,690	CT: 0,757-2,779 TT: 0,465-3,337 CC: 0,300-2,149			0,576- 3,807	0,704- 2,358
P-Wert Chi ² -Test	0,791		0,386			0,412	0,410
P-Wert Fisher's Exact Test	0,816		0,346			0,422	0,442

Ergebnisse

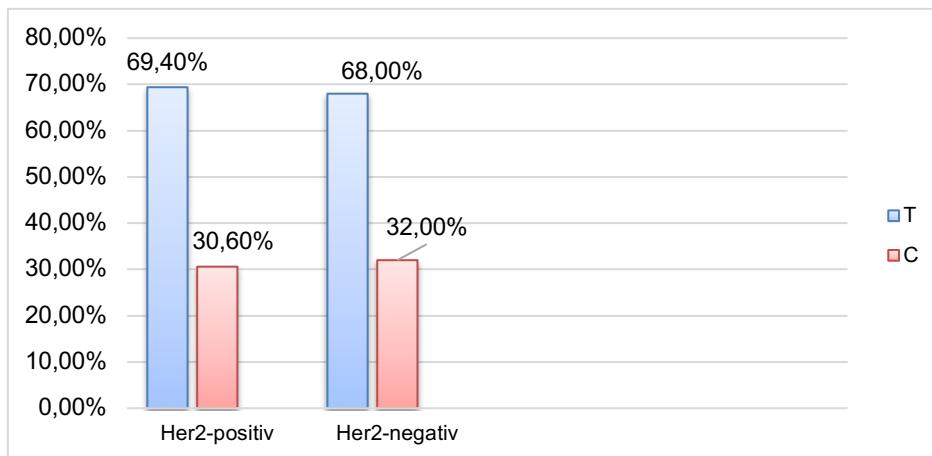


Abbildung 23: Allelfrequenzen der Mammakarzinome nach Her2-Status

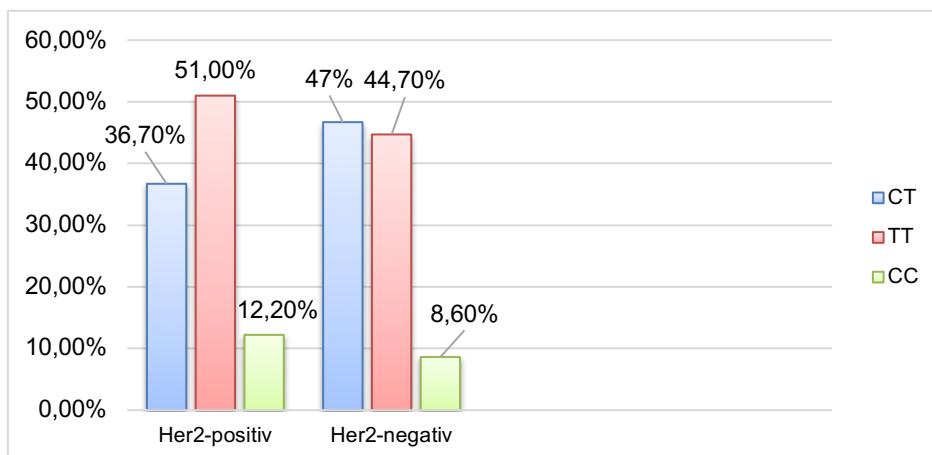


Abbildung 24: Genotypfrequenzen der Mammakarzinome nach Her2-Status

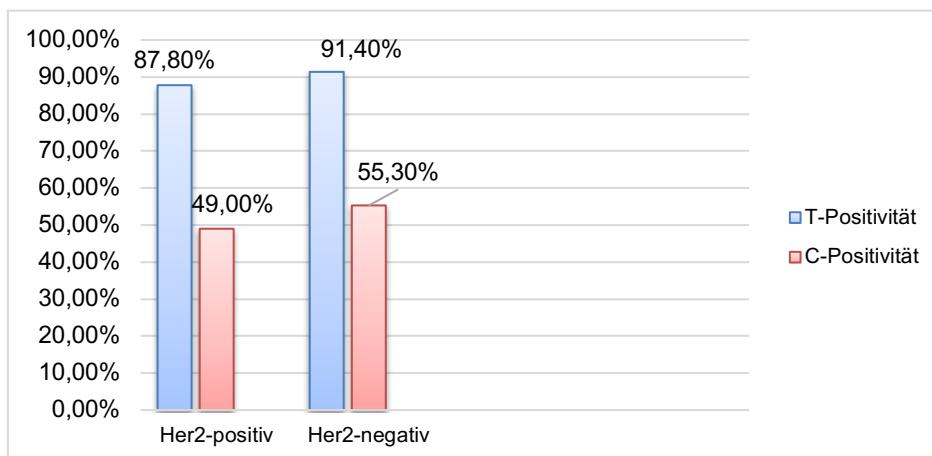


Abbildung 25: Allelpositivitäten der Mammakarzinome nach Her2-Status

Ergebnisse

3.2.3.5 Assoziation des SNPs rs72924108 mit dem Hormonrezeptorstatus

Schließlich wurde überprüft, ob sich die Verteilung der Allel- und Genotypfrequenzen sowie der Allelpositivität je nach Hormonrezeptorstatus unterschied. Dabei waren sowohl der ER als auch der PR des Mammakarzinoms von Bedeutung. Bei diesen Merkmalen konnten ebenso keine signifikanten Ergebnisse festgestellt werden (Tabellen 39 und 40).

Tabelle 39: Assoziation des SNPs rs72924108 mit dem ER-Status

	Allelfrequenz		Genotypfrequenz			Allelpositivität	
ER-positiv	T	C	CT	TT	CC	TT+CT	CC+CT
Erhobene Werte	427 (68,2%)	199 (31,8%)	143 (45,7%)	142 (45,4%)	28 (8,9%)	285 (91,1%)	171 (54,6%)
ER-negativ	T	C	CT	TT	CC	TT+CT	CC+CT
Erhobene Werte	65 (69,1%)	29 (30,9%)	19 (40,4%)	23 (48,9%)	5 (10,6%)	42 (89,4%)	24 (51,1%)
OR	1,045	0,957	CT: 0,820 TT: 0,907 CC: 1,102			0,825	0,867
CI 95%	0,654- 1,669	0,599- 1,530	CT: 0,428-1,572 TT: 0,318-2,588 CC: 0,386-3,146			0,302- 2,255	0,469- 1,601
P-Wert Chi ² -Test	0,855		0,782			0,708	0,647
P-Wert Fisher's Exact Test	0,906		0,735			0,785	0,754

Ergebnisse

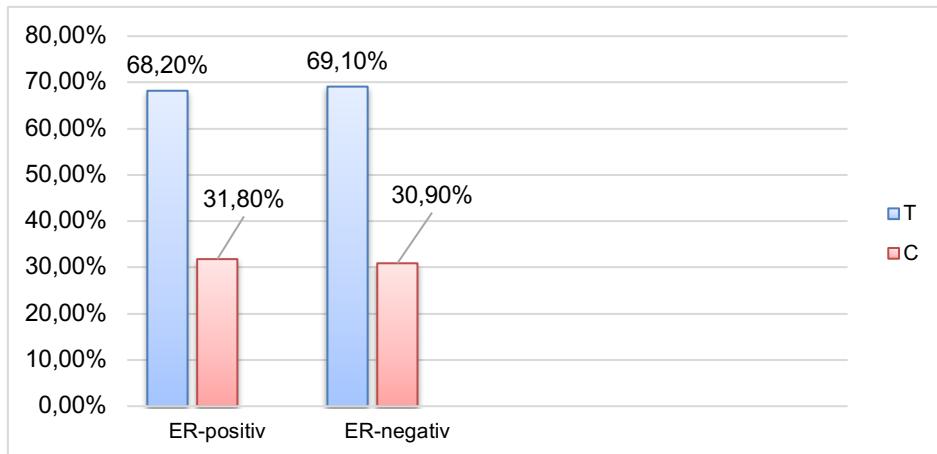


Abbildung 26: Allelfrequenzen der Mammakarzinome nach ER-Status

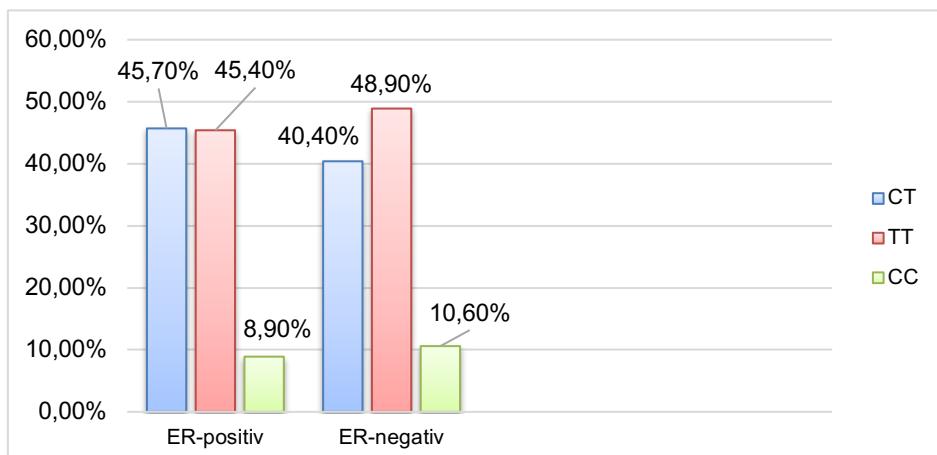


Abbildung 27: Genotypfrequenzen der Mammakarzinome nach ER-Status

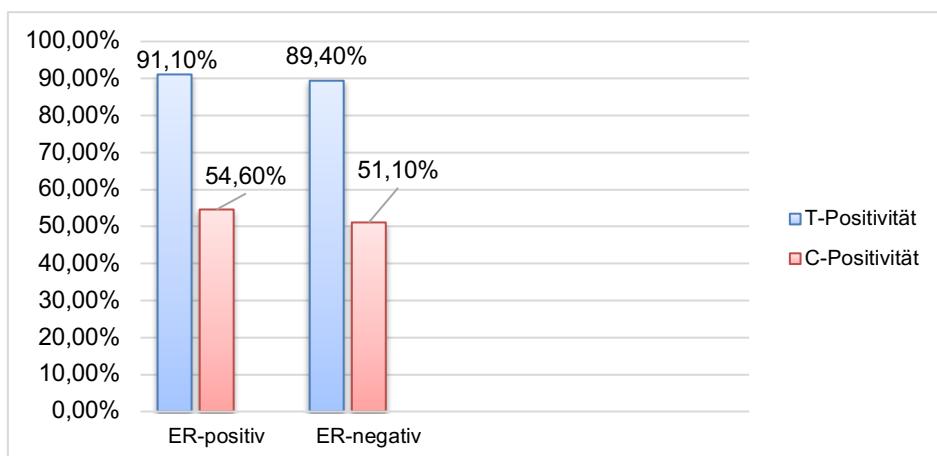


Abbildung 28: Allelpositivitäten der Mammakarzinome nach ER-Status

Ergebnisse

Tabelle 40: Assoziation des SNPs rs72924108 mit dem PR-Status

	Allelfrequenz		Genotypfrequenz			Allelpositivität	
	T	C	CT	TT	CC	TT+CT	CC+CT
PR-positiv							
Erhobene	388	174	128	130	23	258	151
Werte	(69,0%)	(31,0%)	(45,6%)	(46,3%)	(8,2%)	(91,8%)	(53,7%)
PR-negativ							
Erhobene	102	52	34	34	9	68	43
Werte	(66,2%)	(33,8%)	(44,2%)	(44,2%)	(11,7%)	(88,3%)	(55,8%)
OR	0,880	1,137	CT: 1,016 TT: 0,668 CC: 1,496			0,674	1,089
CI 95%	0,602- 1,285	0,778- 1,660	CT: 0,595-1,733 TT: 0,283-1,577 CC: 0,634-3,529			0,298- 1,523	0,656- 1,808
P-Wert Chi ² - Test	0,507		0,633			0,340	0,742
P-Wert Fisher's Exact Test	0,557		0,619			0,368	0,699

Ergebnisse

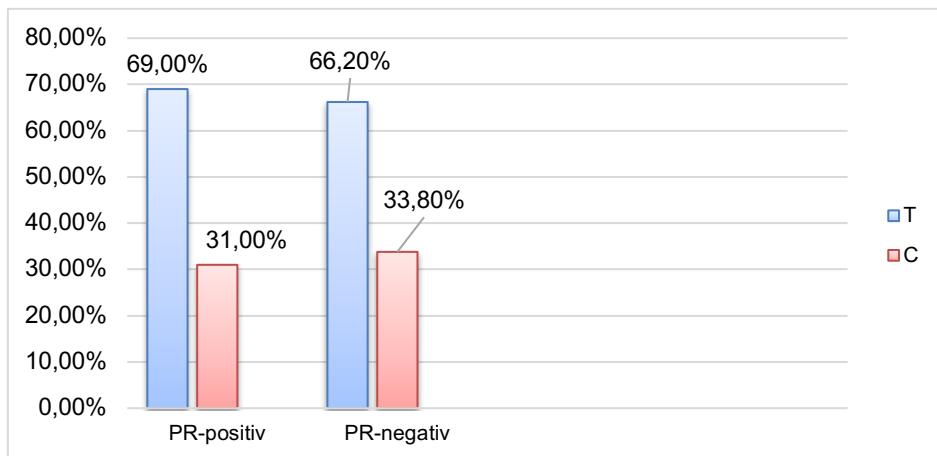


Abbildung 29: Allelfrequenzen der Mammakarzinome nach PR-Status

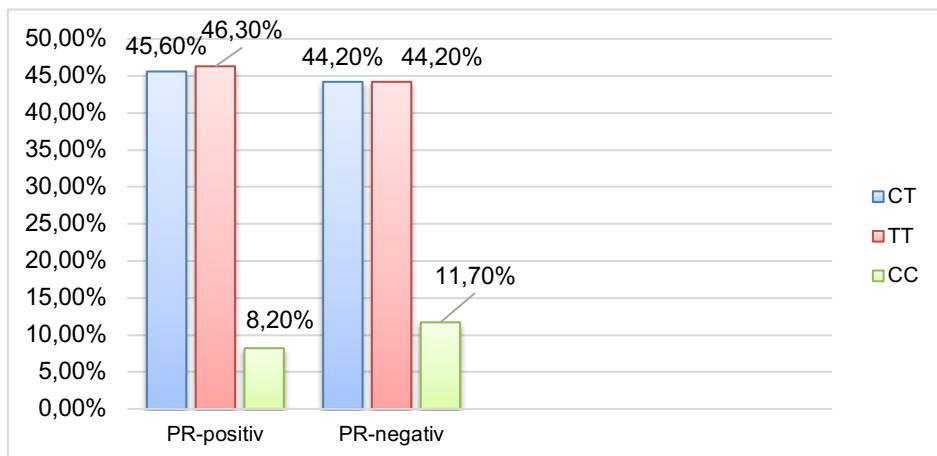


Abbildung 30: Genotypfrequenzen der Mammakarzinome nach PR-Status

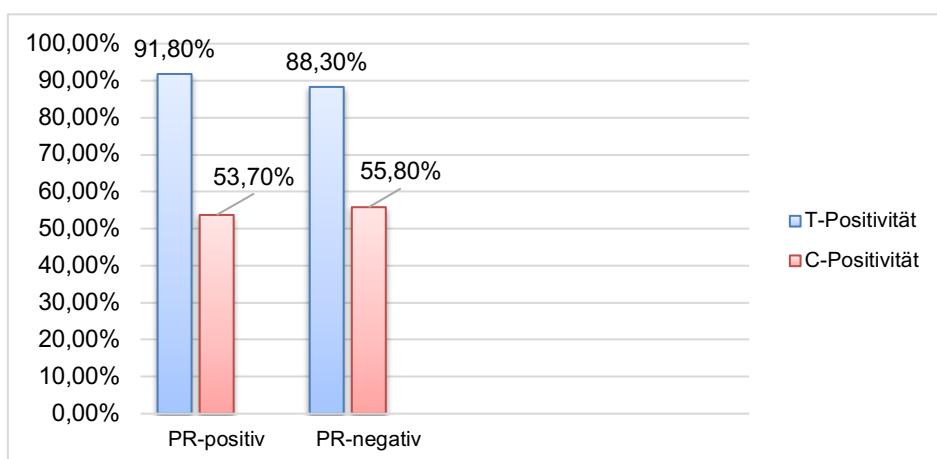


Abbildung 31: Allelpositivitäten der Mammakarzinome nach PR-Status

Ergebnisse

3.3 Ergebnisse zum Ovarialkarzinom

Bei der zweiten Gruppe, die untersucht wurde, handelte es sich um Patientinnen, bei denen ein Ovarialkarzinom diagnostiziert wurde. Bei dieser Karzinomgruppe ergab sich folgende Genotypverteilung (Tabelle 41). Auch bei dieser Gruppe konnte keine Abweichung vom HWE festgestellt werden ($p=0,363$).

Tabelle 41: Genotypverteilung bei der Ovarialkarzinomgruppe

Genotyp	Patientinnenanzahl n
CT	69
TT	45
CC	19
Gesamt	133

3.3.1 Assoziation des SNPs rs72924108 mit dem Ovarialkarzinom

Als die Kontrollgruppe mit der Gruppe der Ovarialkarzinomen verglichen wurde, konnte kein signifikantes Ergebnis bezüglich der Verteilung der Allel- und Genotypfrequenz sowie der Allelpositivität festgestellt werden (Tabelle 42).

Ergebnisse

Tabelle 42: Assoziation des SNPs rs72924108 mit dem Ovarialkarzinom

	Allelfrequenz		Genotypfrequenz			Allelpositivität	
Kontroll-gruppe	T 534 (63,7%)	C 304 (36,3%)	CT 192 (45,8%)	TT 171 (40,8%)	CC 56 (13,4%)	TT+CT 363 (86,6%)	CC+CT 248 (59,2%)
Karzinom-gruppe	T 159 (59,8%)	C 107 (40,2%)	CT 69 (51,9%)	TT 45 (33,8%)	CC 19 (14,3%)	TT+CT 114 (85,7%)	CC+CT 88 (66,2%)
OR	0,846	1,182	CT: 1,366 TT: 0,776 CC: 1,289			0,926	1,348
CI 95%	0,638- 1,122	0,891- 1,568	CT: 0,890-2,096 TT: 0,419-1,435 CC: 0,697-2,385			0,528- 1,623	0,896- 2,029
P-Wert Chi ² -Test	0,246		0,350			0,787	0,151
P-Wert Fisher's Exact Test	0,245		0,344			0,773	0,155

Ergebnisse

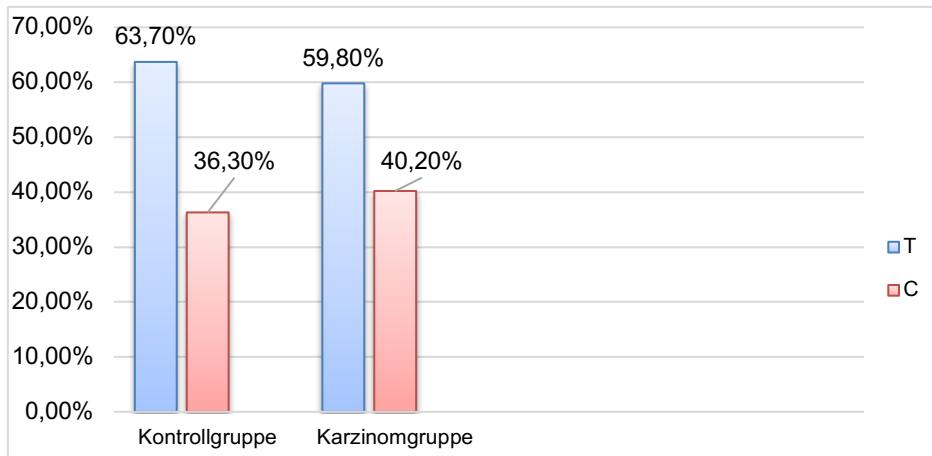


Abbildung 32: Allelfrequenzen der Kontroll- und Ovarialkarzinomgruppe

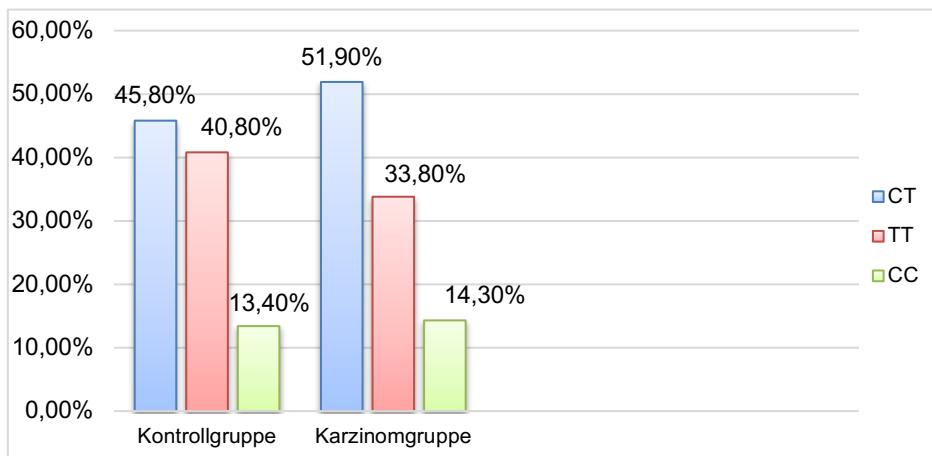


Abbildung 33: Genotypfrequenzen der Kontroll- und Ovarialkarzinomgruppe

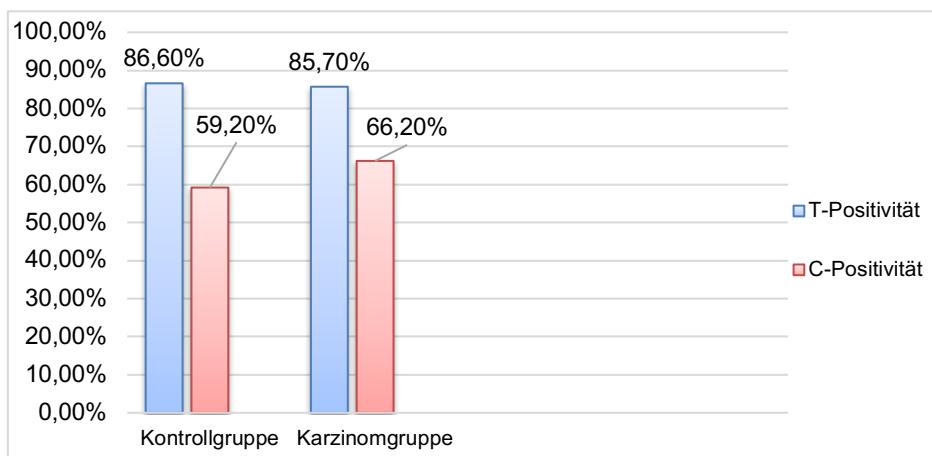


Abbildung 34: Allelpositivitäten der Kontroll- und Ovarialkarzinomgruppe

Ergebnisse

3.3.2 Assoziation des SNPs rs72924108 mit dem Ovarialkarzinom nach Alterskorrektur

Bei der Ovarialkarzinomgruppe wurde ebenso eine Alterskorrektur durchgeführt, indem ausschließlich Patientinnen mit einem Alter von mindestens 45 Jahren in die Kontrollgruppe aufgenommen wurden. Dadurch konnte das durchschnittliche Alter an das der Ovarialkarzinomgruppe angepasst werden (ca. 59 Jahre). Nach dieser Alterskorrektur konnten keine signifikanten Ergebnisse festgestellt werden (Tabelle 43). Ebenso fiel durch diese Maßnahme keine Abweichung vom HWE weder der Ovarialkarzinomgruppe ($p=0,332$) noch der Kontrollgruppe ($p=0,513$) auf.

Tabelle 43: Assoziation des SNPs rs72924108 mit dem Ovarialkarzinom nach Alterskorrektur

	Allelfrequenz		Genotypfrequenz			Allelpositivität	
Kontroll-gruppe	T 337 (63,8%)	C 191 (36,2%)	CT 117 (44,3%)	TT 110 (41,7%)	CC 37 (14,0%)	TT+CT 227 (86,0%)	CC+CT 154 (58,3%)
Karzinom-gruppe	T 157 (59,5%)	C 107 (40,5%)	CT 69 (52,3%)	TT 44 (33,3%)	CC 19 (14,4%)	TT+CT 113 (85,6%)	CC+CT 88 (66,7%)
OR	0,832	1,202	CT: 1,474 TT: 0,779 CC: 1,284			0,969	1,429
CI 95%	0,614- 1,126	0,888- 1,628	CT: 0,932-2,333 TT: 0,405-1,499 CC: 0,667-2,470			0,533- 1,762	0,923- 2,211
P-Wert Chi ² -Test	0,233		0,251			0,919	0,109
P-Wert Fisher's Exact Test	0,244		0,255			1	0,102

Ergebnisse

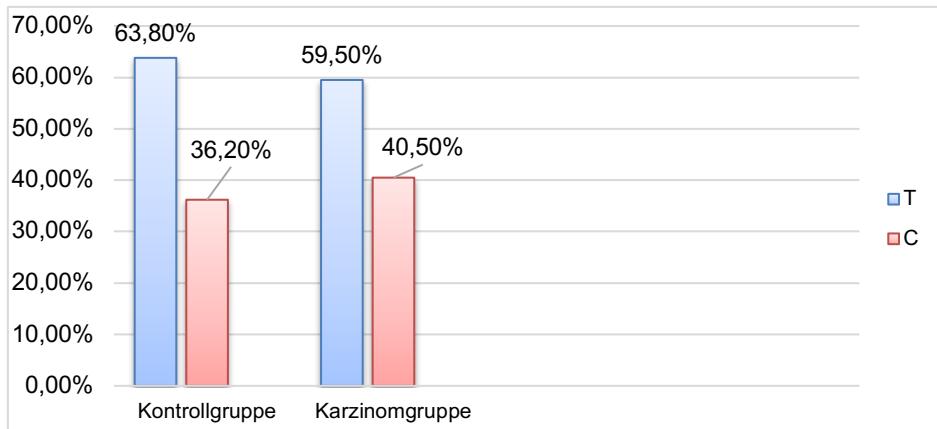


Abbildung 35: Allelfrequenzen der Kontroll- und Ovarialkarzinomgruppe nach Alterskorrektur

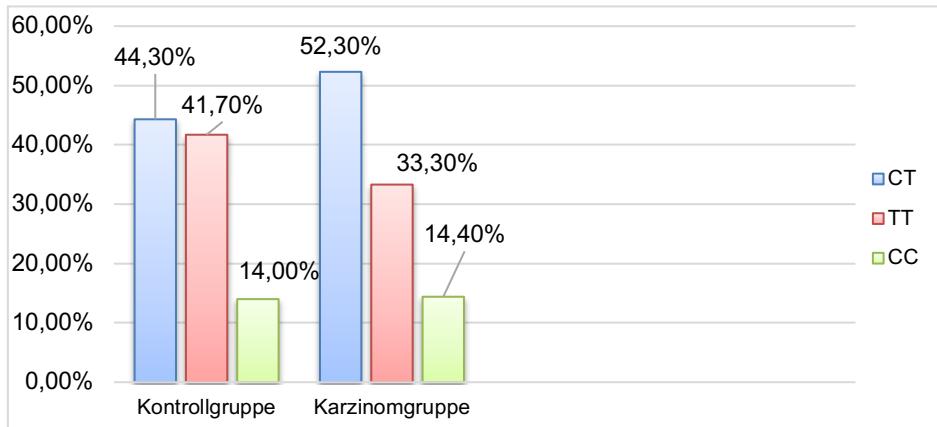


Abbildung 36: Genotypfrequenzen der Kontroll- und Ovarialkarzinomgruppe nach Alterskorrektur

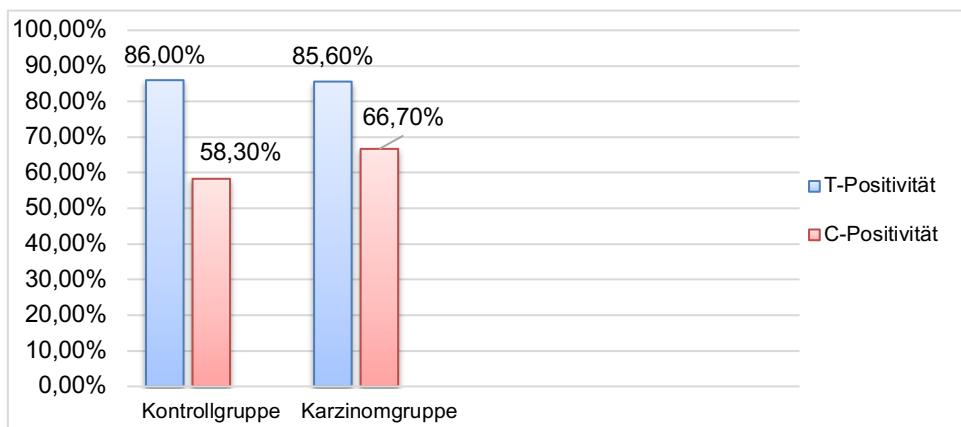


Abbildung 37: Allelpositivitäten der Kontroll- und Ovarialkarzinomgruppe nach Alterskorrektur

Ergebnisse

3.3.3 Assoziation des SNPs rs72924108 mit dem Grading

Auch bei den Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom stellte sich die Frage, ob das Grading als wichtiges klinisch-pathologisches Merkmal mit dem SNP rs72924108 im Zusammenhang steht. Tabelle 44 gibt Informationen über die Datenverteilung.

Tabelle 44: Grading der Ovarialkarzinomgruppe

Grading	Patientinnenanzahl n
G1	18
G2	44
G3	58
G unbekannt	13

Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Grading des Ovarialkarzinoms und dem SNP rs72924108 festgestellt werden (Tabelle 45).

Ergebnisse

Tabelle 45: Assoziation SNPs rs72924108 mit dem Grading

	Allelfrequenz		Genotypfrequenz			Allelpositivität	
G1+2	T	C	CT	TT	CC	TT+CT	CC+CT
Erhobene	75	49	31	22	9	53	40
Werte	(60,5%)	(39,5%)	(50%)	(35,5%)	(14,5%)	(85,5%)	(64,5%)
G3	T	C	CT	TT	CC	TT+CT	CC+CT
Erhobene	71	45	31	20	7	51	38
Werte	(61,2%)	(38,8%)	(53,4%)	(34,5%)	(12,1%)	(87,9%)	(65,5%)
OR	1,031	0,970	CT: 1,100 TT: 1,169 CC: 0,856			1,237	1,045
CI 95%	0,614- 1,732	0,577- 1,630	CT: 0,502-2,409 TT: 0,367-3,723 CC: 0,269-2,725			0,429- 3,571	0,493- 2,214
P-Wert Chi ² - Test	0,909		0,899			0,694	0,909
P-Wert Fisher's Exact Test	1		0,905			0,791	1

Ergebnisse

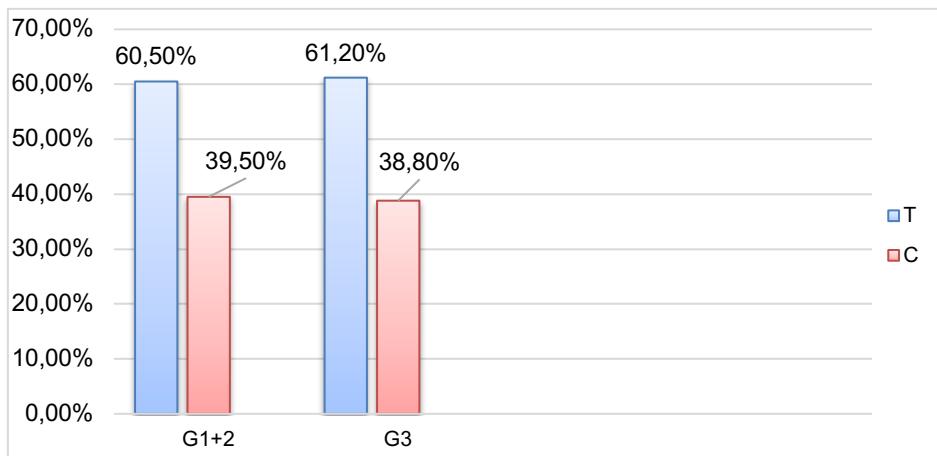


Abbildung 38: Allelfrequenzen der Ovarialkarzinome nach Grading

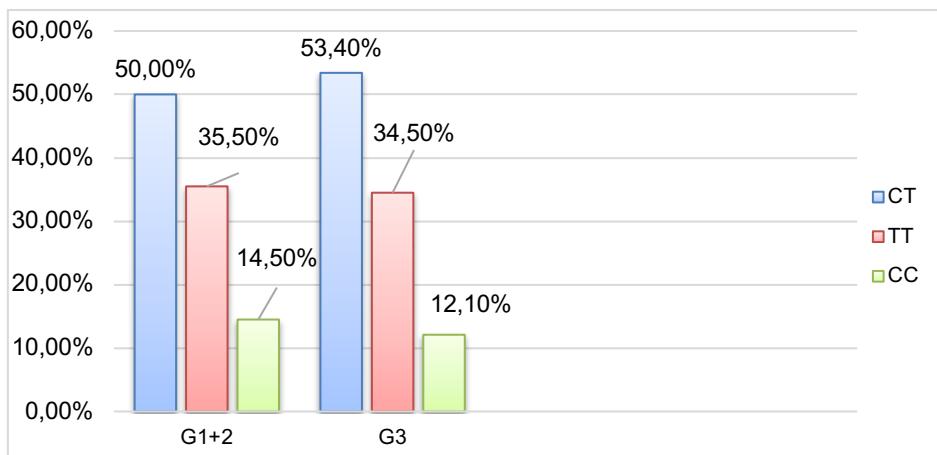


Abbildung 39: Genotypfrequenzen der Ovarialkarzinome nach Grading

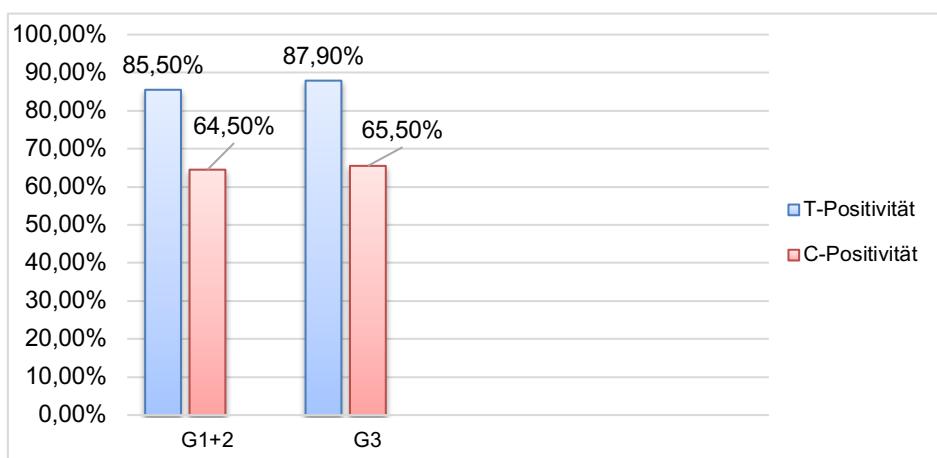


Abbildung 40: Allelpositivitäten der Ovarialkarzinome nach Grading

Ergebnisse

3.4 Ergebnisse zum Endometriumkarzinom

Als letzte Karzinomgruppe wurden Patientinnen mit einem Endometriumkarzinom betrachtet. Dabei kam es zu folgender Genotypverteilung (Tabelle 46). Im Hinblick auf das HWE lag keine Abweichung vor ($p=0,096$).

Tabelle 46: Genotypverteilung bei der Endometriumkarzinomgruppe

Genotyp	Patientinnenanzahl n
CT	68
TT	84
CC	24
Gesamt	176

3.4.1 Assoziation des SNPs rs72924108 mit dem Endometriumkarzinom

Beim Vergleich mit der Kontrollgruppe konnte keine signifikante Assoziation bezüglich der Verteilung der Allel- und Genotypfrequenz sowie der Allelpositivität gezeigt werden (Tabelle 47).

Ergebnisse

Tabelle 47: Assoziation des SNPs rs72924108 mit dem Endometriumkarzinom

	Allelfrequenz		Genotypfrequenz			Allelpositivität	
Kontroll- gruppe	T 534 (63,7%)	C 304 (36,3%)	CT 192 (45,8%)	TT 171 (40,8%)	CC 56 (13,4%)	TT+CT 363 (86,6%)	CC+CT 248 (59,2%)
Karzinom- gruppe	T 236 (67,0%)	C 116 (33,0%)	CT 68 (38,6%)	TT 84 (47,7%)	CC 24 (13,6%)	TT+CT 152 (86,4%)	CC+CT 92 (52,3%)
OR	1,158	0,863	CT: 0,721 TT: 1,146 CC: 0,872			0,977	0,755
CI 95%	0,890- 1,507	0,664- 1,123	CT: 0,493-1,055 TT: 0,665-1,976 CC: 0,506-1,504			0,584- 1,634	0,530- 1,076
P-Wert Chi ² -Test	0,274		0,240			0,929	0,120
P-Wert Fisher's Exact Test	0,288		0,240			1	0,124

Ergebnisse

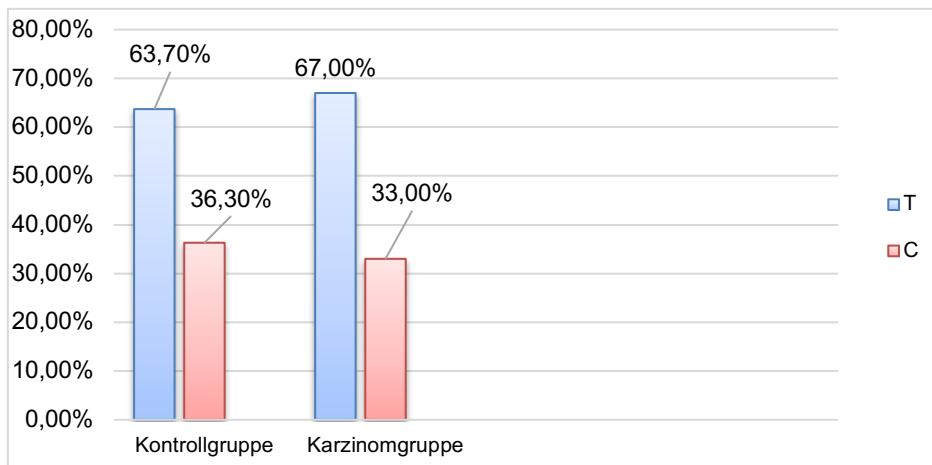


Abbildung 41: Allelfrequenzen der Kontroll- und Endometriumkarzinomgruppe

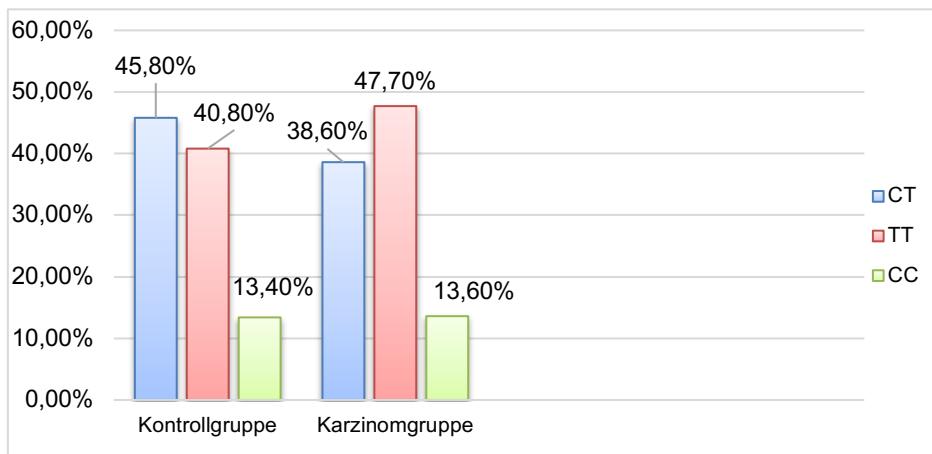


Abbildung 42: Genotypfrequenzen der Kontroll- und Endometriumkarzinomgruppe

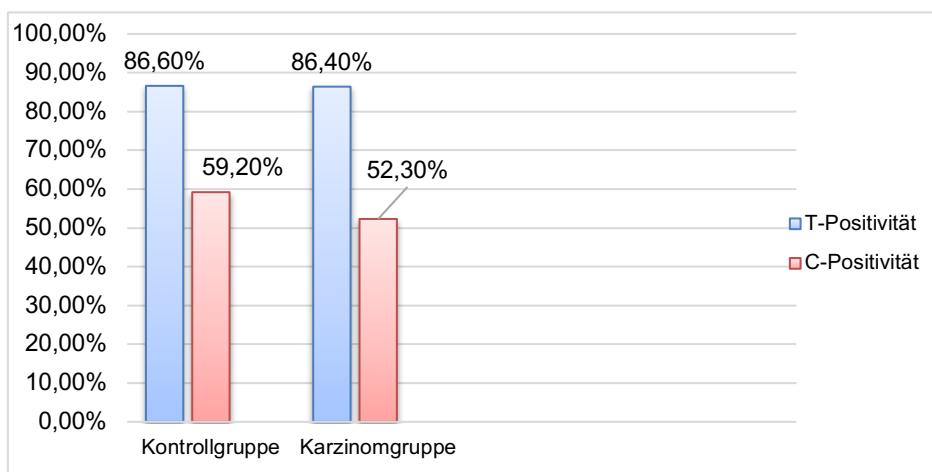


Abbildung 43: Allelpositivitäten der Kontroll- und Endometriumkarzinomgruppe

Ergebnisse

3.4.2 Assoziation des SNPs rs72924108 mit dem Endometriumkarzinom nach Alterskorrektur

Da das durchschnittliche Alter der Patientinnen der Karzinomgruppe (63 Jahre) deutlich größer war als das der Kontrollgruppe, wurde das durchschnittliche Alter der Kontrollgruppe angepasst, indem ausschließlich Patientinnen, die älter als 50 Jahre alt waren, in die Gruppe aufgenommen wurden. Nach Alterskorrektur kam es nicht zu einem signifikanten Ergebnis (Tabelle 48). Es konnte weder bei der Kontroll- ($p=0,949$) noch bei der Endometriumkarzinomgruppe ($p=0,127$) eine Abweichung vom HWE festgestellt werden.

Tabelle 48: Assoziation des SNPs rs72924108 mit dem Endometriumkarzinom nach Alterskorrektur

	Allelfrequenz		Genotypfrequenz			Allelpositivität	
Kontroll-gruppe Erhobene Werte	T (64,1%)	C (35,9%)	CT (45,8%)	TT (41,1%)	CC (13,0%)	TT+CT (87,0%)	CC+CT (58,9%)
Karzinom-gruppe Erhobene Werte	T (67,4%)	C (32,6%)	CT (38,9%)	TT (48,0%)	CC (13,1%)	TT+CT (86,9%)	CC+CT (52,0%)
OR	1,161	0,861	CT: 0,727 TT: 1,156 CC: 0,865			0,989	0,757
CI 95%	0,855- 1,577	0,634- 1,169	CT: 0,468-1,130 TT: 0,607-2,201 CC: 0,454-1,648			0,539- 1,816	0,501- 1,145
P-Wert Chi ² -Test	0,337		0,365			0,972	0,187
P-Wert Fisher's Exact Test	0,351		0,363			1	0,207

Ergebnisse

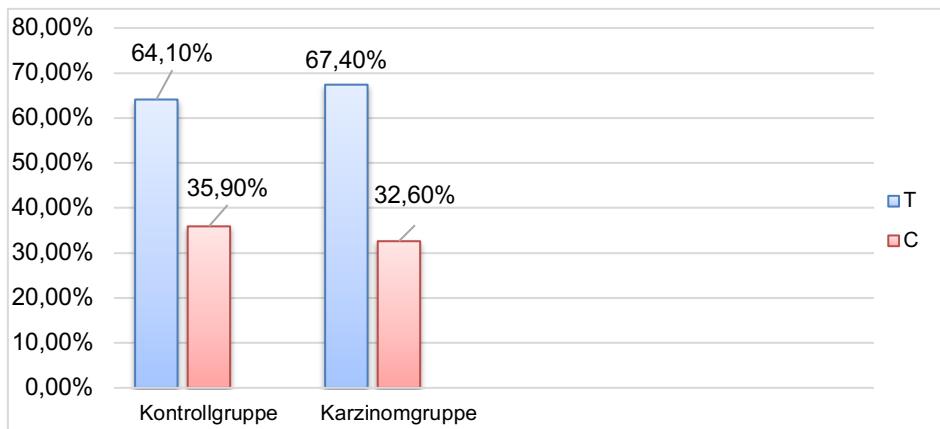


Abbildung 44: Allelfrequenzen der Kontroll- und Endometriumkarzinomgruppe nach Alterskorrektur

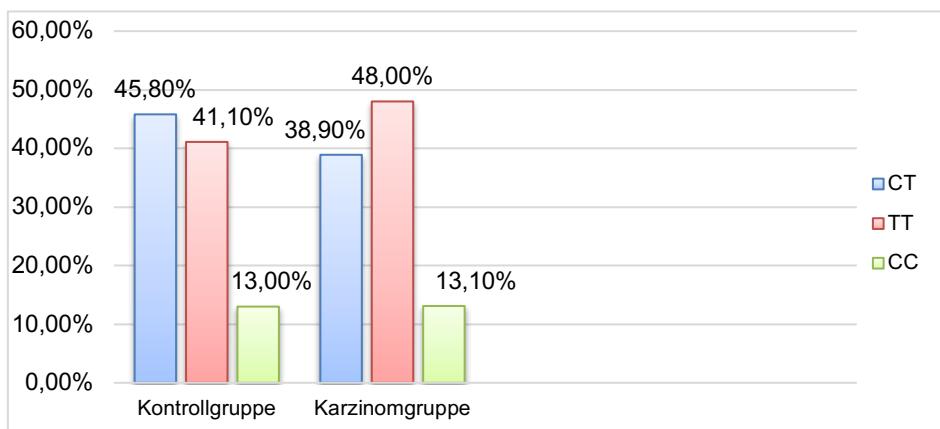


Abbildung 45: Genotypfrequenzen der Kontroll- und Endometriumkarzinomgruppe nach Alterskorrektur

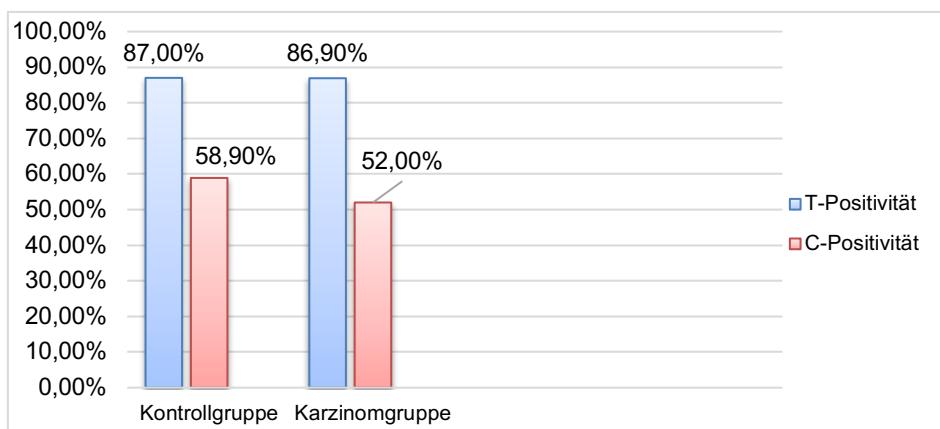


Abbildung 46: Allelpositivitäten der Kontroll- und Endometriumkarzinomgruppe nach Alterskorrektur

Ergebnisse

3.4.3 Assoziation des SNPs rs72924108 mit dem Grading

Es wurde wieder untersucht, ob das Grading in Zusammenhang mit einem Allel des SNP rs72924108 steht. Tabelle 49 zeigt wie die Daten verteilt waren.

Tabelle 49: Grading der Endometriumkarzinomgruppe

Grading	Patientinnenanzahl n
G1	40
G2	89
G3	28
G unbekannt	19

Im Hinblick auf das Grading lagen signifikante Ergebnisse vor (Tabelle 50). Es konnte nachgewiesen werden, dass das T-Allel häufiger bei den gut und mittelgradig differenzierten (72,9%) Karzinomen als bei den schlecht differenzierten Karzinomen (50%) vorkommt ($OR=0,372$; $CI\ 95\% = 0,206-0,673$). Gegensätzlich verhielt es sich mit dem C-Allel (27,1% bei den G1 und G2 Karzinomen und 50% bei den G3 Karzinomen, p-Werte Chi²- und Fisher's Exact-Test=0,001; $OR=2,686$; $CI\ 95\% = 1,487-4,852$). Auch im Bereich der Genotypfrequenz wurden signifikante Ergebnisse festgestellt (p-Wert Chi²-Test=0,004 und p-Wert Fisher's Exact-Test=0,002). Zunächst lag der Genotyp TT bei den Karzinomen mit einem Grading von 1 und 2 (55,8%) häufiger vor als bei denen mit einem Grading von 3 (10,1%). Die Genotype CT und CC wurden häufiger bei schlecht differenzierten Karzinomen gefunden (57,1% und 21,4%) als bei den besser differenzierten Karzinomen (34,1% und 10,1%). In Übereinstimmung dazu weisen G3 Karzinome häufiger Positivität für das C-Allel auf (78,6%) als G1 und G2 Karzinome (44,2%) (p-Werte Chi²- und Fisher's Exact-Test: 0,001; $OR: 4,632$; $CI\ 95\%: 1,761-12,184$). Dagegen wurde bezüglich der T-Positivität lediglich ein Trend im Chi²-Test gefunden: bei den Karzinomen mit einer guten oder mittelgradigen Differenzierung war häufiger (89,9%) ein CT- oder TT-Genotyp vorhanden als bei der anderen Gruppe (78,6%) (p-Wert Chi²-Test=0,095; $OR=0,411$; $CI\ 95\% = 0,141-1,197$).

Ergebnisse

Tabelle 50: Assoziation des SNPs rs72924108 mit dem Grading

	Allelfrequenz		Genotypfrequenz			Allelpositivität	
G1+2	T	C	CT	TT	CC	TT+CT	CC+CT
Erhobene	188	70	44	72	13	116	57
Werte	(72,9%)	(27,1%)	(34,1%)	(55,8%)	(10,1%)	(89,9%)	(44,2%)
G3	T	C	CT	TT	CC	TT+CT	CC+CT
Erhobene	28	28	16	6	6	22	22
Werte	(50,0%)	(50,0%)	(57,1%)	(21,4%)	(21,4%)	(78,6%)	(78,6%)
OR	0,372	2,686	CT: 4,364 TT: 0,181 CC: 5,538			0,411	4,632
CI 95%	0,206- 0,673	1,487- 4,852	CT: 1,589-11,986 TT: 0,050-0,647 CC: 1,545-10,849			0,141- 1,197	1,761- 12,184
P-Wert Chi ² -Test	0,001		0,004			0,095	0,001
P-Wert Fisher's Exact Test	0,001		0,002			0,112	0,001

Ergebnisse

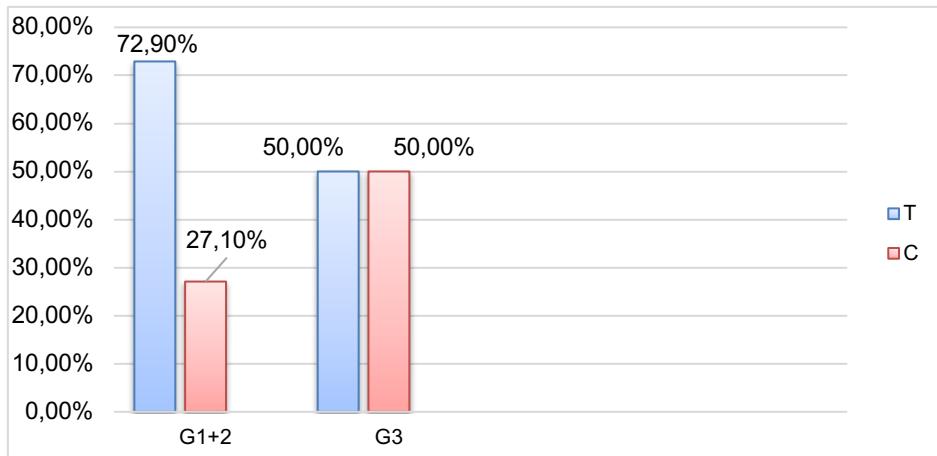


Abbildung 47: Allelfrequenzen der Endometriumkarzinome nach Grading

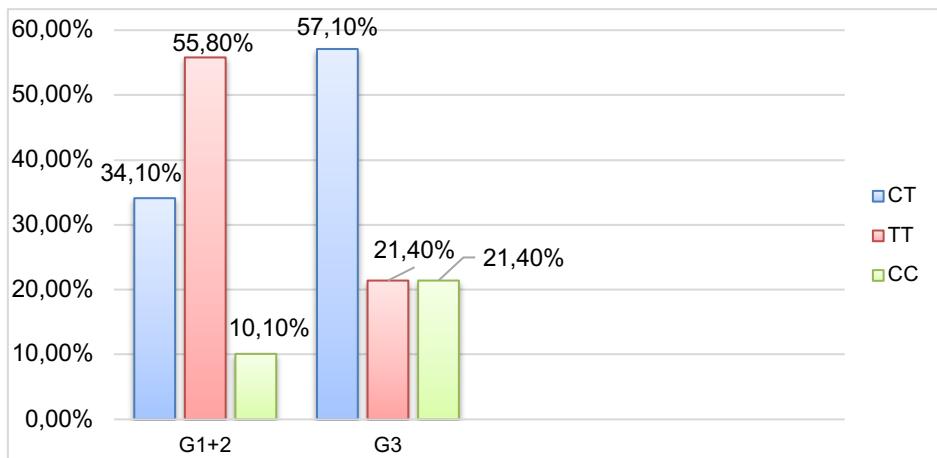


Abbildung 48: Genotypfrequenzen der Endometriumkarzinome nach Grading

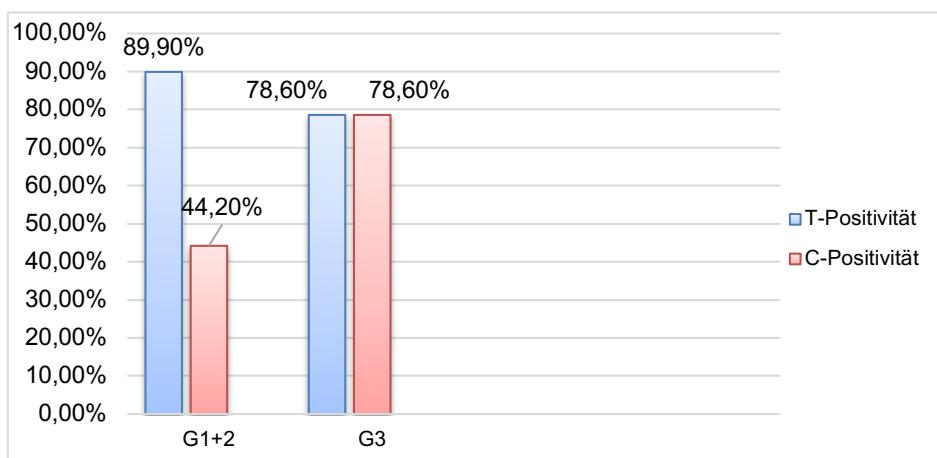


Abbildung 49: Allelpositivitäten der Endometriumkarzinome nach Grading

Diskussion

4 Diskussion

4.1 Methoden zur Genotypisierung von SNPs

In dieser Arbeit wurden zur Genotypisierung des SNPs rs72924108 unter anderem zwei PCR basierte Methoden verwendet, hauptsächlich jedoch die Tetra-Primer ARMS-PCR. Diese Methode ist relativ einfach und kostengünstig in der Anwendung. Die Entwicklung der Primer ist jedoch aufwendig, weshalb ein Computerprogramm hierzu entwickelt wurde (125). Unserer Erfahrung nach gelangt man bei einem Patientenkollektiv mittlerer Größe schnell zu Ergebnissen mit der Labormethode. Bis zu 56 Proben konnten mit der anschließend in dieser Arbeit verwendeten Agarosegelektrophorese auf einmal genotypisiert werden. Ye et al. schlagen jedoch auch die Kombination der Tetra-Primer ARMS-PCR mit der microplate array diagonal gel electrophoresis Technik vor, um einen höheren Umsatz an genotypisierten Proben zu erreichen (125). Weiterentwicklungen der Tetra-Primer ARMS-PCR lassen die Genotypisierung mehrerer SNPs auf einmal zu. Als Beispiel soll eine Multiplex Tetra-Primer ARMS-PCR genannt werden, mit der sechs SNPs in einer chemischen Reaktion genotypisiert wurden (129). Die Tatsache, dass es in der Methodenvalidierung zur Genotypisierung eines abweichenden, wenn auch nicht eindeutigen, Genotyps kam, deutet auf einen Schwachpunkt dieser Arbeit hin. Dies kann selbstverständlich einem menschlichen Fehler, wie falsches Pipettieren oder das Verwechseln einer Probe, verschuldet sein oder ebenso auf eine schlechte Qualität der verwendeten DNA hinweisen (130). Allein aus diesem Grund sind weiterführende Arbeiten zu diesem SNP nötig.

Die in dieser Arbeit weniger häufig eingesetzte Methode der qPCR mittels LightCycler® erlaubt im Gegensatz zu der Tetra-Primer ARMS-PCR Technik die Zuordnung der Genotype in Echtzeit. Ein Verzicht auf die nachfolgende Agarosegelektrophorese wäre zwar möglich gelesen. Dies wurde jedoch unterlassen, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Die qPCR basierte Methode wird ebenso in der Forschung durchgeführt. Mit einer allel-spezifischen Variante wurde die Assoziation von SNPs mit dem polyzystischen Ovariensyndrom untersucht, die sich als schnell, kostengünstig und effizient erwies (131).

Es existiert dennoch ein breites Spektrum an alternativen Methoden, die die Genotypisierung von SNPs ermöglichen, als die hier eingesetzten. Diese sind natürlich

Diskussion

alle mit ihren eigenen Vor- und Nachteilen vergesellschaftet. Nennenswerte Beispiele sind der Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP), bei dem es zum Verdau mittels eines Restriktionsenzymes kommt. Die Produkte, nämlich DNA-Fragmente, werden dann mithilfe einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und anschließend erfolgt mittels Southern Blotting, einem Hybridisierungsverfahren, die Ermittlung der DNA-Sequenz (132). Sehr früh schon wurde erkannt, dass der RFLP angewendet werden kann, um eine Landkarte des menschlichen Genoms zu erstellen (133). Ein Review kritisiert den RFLP aufgrund des Aufwands und der hohen Kosten (134). Bei GWAS besteht das Ziel darin SNPs zu identifizieren, die mit einem Merkmal, z.B. einer Erkrankung, assoziiert sind. Für diesen Zweck ist eine sehr viel effizientere Methode nötig, da eine sehr große Anzahl an SNPs – Hunderte bis Tausende – in sehr vielen Proben von Interesse ist. Microarrays stellen für solche GWAS eine Möglichkeit dar und es existieren schon viele verschiedene auf dem Markt. Diese sind zwar zur Genotypisierung großer Stichproben geeignet, bringen jedoch auch eigene Herausforderungen mit sich, vor allem was die PCR angeht (135). Diese werden nicht nur bereits getestet und liefern auch erfolgversprechende Ergebnisse (136), sondern können auch in der Medizin Anwendung finden (137). Jedoch ist die Ausführung von GWAS mit Problemen verbunden, beispielsweise die nötige in der Realität nicht immer umsetzbare Probenzahl (138).

Die in Rahmen dieser Arbeit genutzte Methode war für diese SNP Studie ausreichend, da sie schnell erlernt und kostengünstig ist. Würde man die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen wollen, indem man das Patientenkollektiv vergrößert, müsste man eventuell auf eine Methode ausweichen, bei der eine höhere Anzahl an Proben schneller genotypisiert werden kann. Eine Validierung unserer Ergebnisse durch eine andere Technik zur SNP-Genotypisierung ist ebenso zu empfehlen.

4.2 Bedeutung von ESRRA und dessen Polymorphismen in der Forschung

Auf die Bedeutung von ESRRA allgemein und speziell für gynäkologische Krebserkrankungen wurde im ersten Kapitel dieser Arbeit schon hingewiesen. Vor dem Hintergrund, dass Östrogene bei der Pathophysiologie der untersuchten Karzinome eine wesentliche Rolle spielen und der ESRRA in das Östrogensystem eingreift, wurde ein SNP im Promotor des ESRRA-Gens auf eine Assoziation zum Mamma-, Ovarial- und Endometriumkarzinom sowie deren klinisch-pathologische Merkmale untersucht.

Diskussion

Es existieren zwar schon verschiedenste Forschungsarbeiten zur Bedeutung von genetischen Variationen des ER α s bei gynäkologischen Krebserkrankungen, im Hinblick auf ESRRA besteht jedoch noch erheblicher Forschungsbedarf. In der Vergangenheit konnten bestimmte Allele in SNPs des ER α s als Risikoallele identifiziert werden (139–143). Gynäkologische Karzinome stellen jedoch eine sehr heterogene Gruppe an Erkrankungen dar mit verschiedenen möglichen Phänotypen. Auch diesen Aspekt berücksichtigten vergangene SNP-Studien und untersuchten, wie diese Arbeit, ob klinisch-pathologische Merkmale z.B. des Mammakarzinoms auf SNPs basieren (144–146). Dennoch ist belegt, dass nicht nur genetische Variationen der Hormonrezeptoren selbst für eine erhöhte Suszeptibilität für die Erkrankung verantwortlich sein können, sondern auch solche in Genen, die am Hormonstoffwechsel beteiligt sind. Dies gilt z.B. für die Familie der Cytochrom P 450 Enzyme (147,148). Die Frage, welche Auswirkungen SNPs im ESRRA, der an östrogenabhängigen Signalwegen beteiligt ist, haben könnten, ist also durchaus berechtigt.

Vor dem Hintergrund, dass Promotoren eine regulatorische Funktion haben, wurde der in der vorliegenden Arbeit untersuchte SNP rs72924108, der im Promotor des ESRAA-Gens lokalisiert ist, ausgewählt. Seine Funktionen bzw. molekulare Auswirkungen auf den Rezeptor sind aktuell noch unklar und müssen in weiterführenden Untersuchungen genau beleuchtet werden. Jedoch gibt es in der Literatur schon einige Beispiele für Arbeiten, die signifikante Zusammenhänge mit SNPs in den Promotorenregionen von Genen und gynäkologischen Karzinomen herstellen konnten (149–151).

Andere Arbeiten zu diesem SNP lagen zum Zeitpunkt der Recherche nicht vor. Jedoch wurden andere Polymorphismen im ESRRA untersucht. Ein in der Literatur wiederkehrender SNP des ESRRA liegt ebenso im Promotorbereich des Gens und beinhaltet einen ERRE. Der beschriebene Polymorphismus wurde in der NCBI SNP Datenbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) als rs3217060 gekennzeichnet und beeinflusst über komplexe Mechanismen die peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha induzierte Expression von ESRRA (152). Im Rahmen einer SNP Assoziationsstudie wurde nachfolgend überprüft, ob eine statistisch signifikante Assoziation zwischen Osteoporose und dem Polymorphismus vorliegt. Dies konnte einerseits bestätigt werden (153), andererseits widerlegte eine andere Studie dieselbe Hypothese (154).

Diskussion

Im Rahmen der Recherche konnte eine weitere Arbeit gefunden werden, dessen Fokus Intron SNPs im ESRRA waren. Es wurde untersucht, ob diese Tag SNPs zusammen mit anderen im Mitofusin-2 Gen mit Diabetes Mellitus 2 in Zusammenhang stehen. Eine Assoziation mit den SNPs im ESRRA konnte nicht gefunden werden. Die Autoren konnten jedoch zeigen, dass Interaktionen zwischen den SNPs im Mitofusin-2 und ESRRA möglich sind (155).

Schließlich liegt eine Arbeit vor, die einen SNP im Gen des ESRRAs und seine Suszeptibilität für ein gynäkologisches Karzinom untersuchte (156). Diese soll jedoch im Zusammenhang mit den Ergebnissen zum Ovarialkarzinom näher diskutiert werden.

Nachfolgend werden die Ergebnisse je nach Tumorentität erörtert.

4.3 Mammakarzinom

4.3.1 Der SNP rs72924108 als Risikofaktor für das Mammakarzinom

Nach Genotypisierung konnte keine signifikante Assoziation zwischen dem SNP rs72924108 und der Mammakarzinomgruppe gezeigt werden. Dennoch zeigte sich bezüglich der Allelfrequenz und -positivität, dass das T-Allel und die T-Positivität tendenziell häufiger bei der Karzinom- als bei der Kontrollgruppe vorkommen. Gegensätzlich verhielt es sich mit dem C-Allel bezüglich der Allelfrequenz. Es ist anzuraten, diese Trends in weiteren Studien mit größeren Stichproben zu überprüfen. Um ein Selektionsbias zu vermeiden, wurde eine Alterskorrektur durchgeführt, die die eben genannten Tendenzen nicht bestätigen konnte. Allerdings konnte diese Maßnahme nicht vollständig angewendet werden, da bei 39 Patientinnen der Kontrollgruppe und 14 Patientinnen der Karzinomgruppe Angaben zum Alter fehlten. In der Literatur existieren noch keine anderen Studien zu diesem SNP bzw. ob seine Allele wohl Risikofaktoren für die Entwicklung eines Mammakarzinoms darstellen. Eine direkte Gegenüberstellung der Ergebnisse ist also nicht möglich. Dennoch wird wie bereits im ersten Kapitel beschrieben die Rolle des ESRRAs, z.B. als negativer Prognosefaktor und als mögliches Ziel einer Therapie beim Mammakarzinom oft thematisiert (90,95,96). Die Studienlage bestätigt, dass der Rezeptor sowohl an ER-abhängigen Signalwegen in Mammakarzinomen beteiligt ist und diese beeinflussen kann, als auch, dass der ESRRA unabhängig von Östrogen in diesen Karzinomen agieren kann (89,93). Es ist sicher, dass der Rezeptor eine entscheidende Rolle bei der Entstehung des Mammakarzinoms spielt. Ob dies durch einen SNP

Diskussion

möglicherweise verursacht wird, ist noch ungeklärt und muss in weiteren Forschungsarbeiten überprüft werden.

4.3.2 Der SNP rs72924108 in Verbindung mit klinisch-pathologischen Merkmalen des Mammakarzinoms

Im Anschluss wurde eine Statistik zur Assoziation des SNPs rs72924108 mit klinisch-pathologischen Merkmalen des Mammakarzinoms erstellt, wobei nur die Einteilung anhand des Nodalstatus signifikante Ergebnisse lieferte. In allen Bereichen bis auf die C-Positivität konnte statistische Signifikanz erreicht werden. Eine Positivität für das T-Allel wurde häufiger bei Patientinnen mit negativem Lymphknotenstatus gefunden. In Übereinstimmung dazu sind die Ergebnisse zur Genotypfrequenz: der TT-Genotyp ist häufiger bei nodal-negativen Patientinnen vorhanden gewesen, der CC-Genotyp dagegen öfter bei Patientinnen mit positivem Lymphknotenstatus. Schließlich waren die Ergebnisse zur Allelfrequenz ebenso signifikant: in der Gruppe mit positivem Nodalstatus war häufiger das C-Allel vorhanden, in der mit negativem Status das T-Allel. Bisher wurden noch keine anderen Assoziationsstudien zu diesem oder anderen Polymorphismen des ESRRAs und den klinisch-pathologischen Merkmalen dieser Tumorentität durchgeführt. Allgemein konnte aber im Hinblick auf den Lymphknotenstatus kein Zusammenhang zwischen der Immunreaktivität des ESRRAs und diesem Merkmal festgestellt werden (90). Hinsichtlich anderer Parameter konnte schon im ersten Kapitel dargelegt werden, dass die Untersuchungen sehr interessante, wenn auch teils widersprüchliche Ergebnisse und beispielsweise zur Tumorgröße und zum Grading keinen Zusammenhang zeigen konnten (90,91).

Bei der Erhebung des Hormonrezeptorstatus soll zunächst der Prozentsatz positiver Hormonrezeptoren und die Farbintensität angegeben werden, daraus können dann verschiedene Scores gebildet werden. In dieser Arbeit wurde der IRS verwendet, der Werte von null bis zwölf annehmen kann (19). Ein anderer gebräuchlicher Score ist der Allred-Score, der eine Skala von null bis acht einnimmt (20). In der vorliegenden Arbeit wurden Karzinome schon ab einem IRS >0 als ER- und PR-positiv gewertet. Diese Grenze ist mit dem älteren Konsensus vereinbar, die besagt, dass eine antihormonelle Therapie bis auf wenige Ausnahmen bei jeder immunhistochemischen Reaktion indiziert ist (157). Dennoch existiert auch eine Art Grauzone, wenn es um die Entscheidung zur Therapie von Patientinnen mit einer Reaktion von 1-10% geht. In diesem Fall ist nämlich eine individuelle Abwägung notwendig (18). Man käme

Diskussion

allerdings ebenso nicht zu statistisch signifikanten Ergebnissen, wenn man erst ab einer IRS >2 von einem positiven Hormonrezeptorstatus ausgehen würde.

Ob das T-Allel des SNPs rs72924108 tatsächlich vor einer Entwicklung von Lymphknotenmetastasen schützt und das C-Allel einen Risikofaktor für Lymphknotenmetastasen darstellt, kann nicht anhand dieser Arbeit entschieden werden. Statistische Signifikanz konnte in fast allen Bereichen erreicht werden, dennoch ist zu bedenken, dass es bei 19 Patientinnen keine Angabe zu diesem Kriterium gab und diese somit nicht mit einbezogen wurden. Dies regt zur Durchführung weiterer Studien mit größeren Stichproben und vollständigen Daten an. Auch bezüglich der anderen Merkmale gab es eine beträchtliche Anzahl an Patientinnen, bei denen keine Angaben gemacht werden konnten. Im Bereich der Tumogröße war es bei 13 Patientinnen nicht möglich das Kriterium klar zu definieren, im Hinblick auf das Grading waren es 14 fehlende Angaben. Als die Klassifikation anhand der Rezeptoren vorgenommen wurden, fiel auf, dass bei der Bewertung des Her2-Status zu 22 Patientinnen und bei der Bewertung des Steroidhormonrezeptorstatus zu 13 (ER) bzw. 15 (PR) Patientinnen keine Informationen vorhanden waren. Auch diese Tatsache sollte bei der Bewertung der Daten berücksichtigt werden, da bei vollständigen Informationen die Ergebnisse eine völlig andere Tendenz anzeigen können. Anhand der vorliegenden Daten kann also kein allgemeingültiger Schluss gezogen werden, dass dieser SNP im Promotor des ESRRA-Gens und seine Allele ein Risikofaktor für das Mammakarzinom darstellen und für das Entstehen bestimmter Phänotypen des Mammakarzinoms verantwortlich gemacht werden können. Hierzu wären weitaus größere Stichproben notwendig. Jedoch ist die Bedeutung des ESRRAs beim Mammakarzinom wissenschaftlich belegt und schließt nicht aus, dass der untersuchte SNP bzw. andere genetische Variationen im ESRRA-Gen ebenso bedeutend bzw. dafür verantwortlich sind.

4.4 Ovarialkarzinom

4.4.1 Der SNP rs72924108 als Risikofaktor für das Ovarialkarzinom

Die zweite maligne Tumorerkrankung, dessen Assoziation zum SNP rs72924108 in dieser Arbeit untersucht wurde, war das Ovarialkarzinom. Beim Vergleich der Karzinom- mit der Kontrollgruppe konnten weder Trends noch signifikante Ergebnisse festgestellt werden. Auch nach einer Alterskorrektur lagen keine statistisch signifikanten Ergebnisse vor. Es lag zwar zu fast allen Karzinompatientinnen

Diskussion

Informationen bezüglich des Alters vor, dennoch fehlten wie bereits erwähnt bei einer größeren Anzahl der Kontrollgruppe Daten dazu. Dies gilt es bei Betrachtung der Ergebnisse zu beachten. Da bei dieser Studie die Stichprobe der erkrankten Gruppe ($n=133$) deutlich kleiner war als die der Kontrollgruppe ($n=419$), sollte bei weiteren Untersuchungen zu diesem Thema auf eine größere Stichprobe der Karzinomgruppe geachtet werden, um statistische Fehler zu vermeiden.

Die aktuelle Literatur erlaubt zwar nicht den direkten Vergleich unserer Ergebnisse, da der vorliegende SNP noch nicht in Zusammenhang mit dem Ovarialkarzinom untersucht wurde. Dennoch soll eine Studie, die eine Assoziation zwischen SNPs in mitochondrial und nukleär kodierten Genen, die an der mitochondrialen Biogenese, am Steroidhormonstoffwechsel und an der oxidativen Phosphorylierung beteiligt sind, und dem Ovarialkarzinom untersuchte, erläutert werden. Diese Analysen erfolgten auf Pathway-, Gen-, und SNP-Ebene. Dabei kam die Arbeitsgruppe zu dem Ergebnis, dass Gene, die bei der mitochondrialen Biogenese eine Rolle spielen, darunter auch der ESRRA, mit einem erhöhten Risiko für dieses Karzinom assoziiert werden können. Ein in dieser Studie untersuchter SNP rs11600990 befand sich in einem Intron des ESRRAs und war im dominanten Modell mit einem erniedrigten Ovarialkarzinomrisiko verbunden. Das Patientenkollektiv umfasste jedoch eine, im Vergleich zu dieser Arbeit deutlich größere Stichprobe von 3715 Personen, von denen 1815 an einem Ovarialkarzinom erkrankt waren und 1900 als Kontrolle dienten (156).

4.4.2 Der SNP rs72924108 in Verbindung mit klinisch-pathologischen Merkmalen des Ovarialkarzinoms

In der im Anschluss erstellten Statistik zur Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen der Tumordifferenzierung und dem SNP rs72924108 konnten auch keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Auffällig ist, dass der CT-Genotyp in der Gruppe der G1 und G2 Karzinome genauso oft verteilt ist, wie in der Gruppe der G3 Karzinome (31 Fälle). Auch in der Verteilung der TT- und CC-Genotype sind die Unterschiede sehr gering (22 und 20 bzw. 9 und 7 Fälle). Allerdings muss beachtet werden, dass bei 13 der 133 Ovarialkarzinompatientinnen keine Angaben zum Grading gemacht wurde und diese daher nicht in diesen Teil der Studie miteinbezogen werden konnten. Dies sollte berücksichtigt werden, da die aktuelle Datenlage besagt, dass die Expression des ESRRAs mit schlechter differenzierten Karzinomen assoziiert ist (106). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass bestimmte Allele von

Diskussion

Polymorphismen dafür verantwortlich sind. In der Vergangenheit wurden zum FIGO Stadium des Ovarialkarzinoms im Zusammenhang mit Polymorphismen in anderen Genen bereits interessante Ergebnisse publiziert. Der AA Genotyp des SNPs rs3020449 im ER β wurde beispielsweise mit den FIGO-Stadien III und IV in Zusammenhang gebracht, während das G-Allel dieses SNPs häufiger in den Stadien III und IV als in den Stadien I und II vorhanden war (158). Diese Ergebnisse zeigen, dass in Zukunft bei Assoziationsstudien zu SNPs im ESRRA-Gen das FIGO-Stadium bei der Klassifikation anhand klinisch-pathologischer Merkmale ebenfalls aufgenommen werden sollte. Vor allem, wenn man bedenkt, dass die mRNA-Expression des Rezeptors allgemein mit dem FIGO-Stadium korreliert und zwar in dem Sinne, dass erhöhte mRNA-Spiegel bei fortgeschrittenen Karzinomen gefunden werden (106,107).

Auch wenn diese Studie keinen Zusammenhang zwischen dem untersuchten SNP und dem Ovarialkarzinom und seinen klinisch-pathologischen Merkmalen hervorbringen konnte, zeigt die Literatur, dass weitere Studien zu diesem Thema ermutigt werden sollen. Im Vergleich zum Mammakarzinom liegen längst nicht so viele Arbeiten zum Ovarialkarzinom und dem ESRRA vor. Es ist anzustreben in weiteren Arbeiten, die genauen pathophysiologischen Zusammenhänge des ESRRA mit dem Ovarialkarzinom darzustellen, um die bisherigen Daten zu untermauern, z.B. das Potential des ESRRA als neuen Prognosefaktor bei dieser Erkrankung (106,107).

4.5 Endometriumkarzinom

4.5.1 Der SNP rs72924108 als Risikofaktor für das Endometriumkarzinom

Schließlich wurde eine Assoziation zwischen dem SNP rs72924108 und dem Endometriumkarzinom überprüft. Als die Genotypverteilung der Kontroll- mit der Karzinomgruppe verglichen wurde, konnten weder vor noch nach Alterskorrektur signifikante Unterschiede festgestellt werden. Dennoch belegt die aktuelle Datenlage, dass der ESRRA einerseits in Abhängigkeit des ER-Status in Endometriumkarzinomzellen unterschiedliche Funktionen aufweist (111,112), andererseits dass der Rezeptor allgemein als Prognosefaktor für das Endometriumkarzinom eine Rolle spielen könnte. Es wurde nämlich festgestellt, dass die Expression des Rezeptors mit dem krankheitsfreiem Überleben assoziiert ist und zwar in dem Sinne, dass eine hohe Expression mit einer schlechteren Prognose

Diskussion

korreliert (115). Es ist alleine durch diese Arbeit nicht auszuschließen, dass die untersuchten Allele eine Rolle dabei spielen. Eine Wiederholung der Studie mit einem größeren Kollektiv ist anzuraten, da die Stichprobengröße der Fallgruppe ($n=176$) deutlicher kleiner war im Vergleich zur der Kontrollgruppe ($n=419$).

4.5.2 Der SNP rs72924108 in Verbindung mit klinisch-pathologischen Merkmalen Merkmale des Endometriumkarzinoms

Wie beim Mamma- und Ovarialkarzinom wurden die Patientinnen anhand der Tumordifferenzierung klassifiziert, um eine Assoziation des SNPs rs72924108 mit dieser Eigenschaft zu überprüfen. Dabei konnten in allen Bereichen, außer der C-Allel-Positivität, bei der lediglich ein Trend vorlag, statistisch signifikante Ergebnisse dargelegt werden. Es gab dennoch viele Patientinnen ($n=19$) ohne Angabe zum Grading, die deshalb nicht in diesen Aspekt der Studie miteinbezogen werden konnten. Dies muss beim Betrachten der Ergebnisse berücksichtigt werden. Bei den besser differenzierten Karzinomen (G1 und G2) lag signifikant häufiger das T-Allel oder der TT-Genotyp vor. Analog dazu wiesen schlecht differenzierte (G3) Karzinome öfter das C-Allel beziehungsweise ein CT- oder CC-Genotyp auf. In Übereinstimmung dazu waren die G3-Karzinome signifikant häufiger positiv für das C-Allel, während die T-Positivität tendenziell bei den G1- und G2-Karzinomen vorlag. Zusammenfassend lässt sich also anhand dieser Ergebnisse das C-Allel als Risikofaktor für die Entwicklung schlecht differenzierter Karzinome bezeichnen. Im Vergleich dazu kann man das T-Allel als Schutz vor der Entstehung eines G3-Karzinoms sehen. Ähnliche Studien, die einen direkten Vergleich von Ergebnissen zulassen, liegen noch nicht vor. Zwar kann allgemein dem ESRRA aktuell keine Verbindung zur Tumordifferenzierung nachgesagt werden (114–116), jedoch haben die Ergebnisse in dieser Arbeit zu diesem Tumormerkmal einen Wert für die Forschung und regen zur Durchführung von Studien mit größeren Stichproben an. Mehr als doppelt so viele Patientinnen mit einem schlecht differenzierten Karzinom (21,4%) hatten einen CC-Genotyp als Patientinnen der Vergleichsgruppe (10,1%). Dasselbe Phänomen konnte bei dem TT-Genotyp bei den G1 und G2-Karzinomen (55,8%) im Vergleich zu den G3-Karzinomen (21,4%) beobachtet werden. Auch die OR von 5,538 war beeindruckend, welche besagt, dass die Chance ein G3-Karzinom zu entwickeln bei einem CC-Genotyp über fünf Mal so hoch ist, wie bei einem TT-Genotyp. Das CI 95% dieser OR ist dennoch relativ groß

Diskussion

gewesen (CI 95% = 1,545-10,849). Ähnlich verhielt es sich mit dem CT-Genotyp (OR=4,364, CI 95% = 1,589-11,986).

Schließlich ist es bei künftigen Assoziationsstudien erstrebenswert das FIGO-Stadium und die myometriale Invasionstiefe als weitere Tumormerkmale aufzunehmen und einen Vergleich der Allel- und Genotypverteilung durchzuführen, da manche Autoren von einem Zusammenhang mit dem ESRRA berichten, in der Hinsicht, dass die Expression des ESRRAs mit fortgeschrittenen Karzinomen und einer tieferen myometrialen Invasion vergesellschaftet ist (114–116).

Zusammenfassung und Ausblick

5 Zusammenfassung und Ausblick

Der ESRRA beeinflusst die ERE-abhängige Transkription in östrogenabhängigen, gynäkologischen Karzinomen und wird oft als möglicher Prognosefaktor und Therapiezielpunkt dieser vorgeschlagen (89,91,106,112,115). Um seine Bedeutung beim Mamma-, Ovarial- und Endometriumkarzinom näher zu charakterisieren, überprüften wir die Assoziation eines SNPs im Promotor des ESRRA-Gens mit diesen Karzinomen und ihren klinisch-pathologischen Merkmalen.

Das untersuchte Patientenkollektiv umfasste 1101 Patientinnen, von denen 419 der Kontroll-, 373 der Mammakarzinom-, 133 der Ovarialkarzinom- und 176 der Endometriumkarzinomgruppe zugewiesen werden konnten. Die Genotypisierung des SNPs rs72924108 erfolgte zum Großteil mittels der Tetra-Primer ARMS-PCR. Eine Zuordnung des Genotyps war nach Agarosegelektrophorese möglich. Im Anschluss erfolgte eine statistische Auswertung der Daten, wobei ein Signifikanzniveau von $p<0,05$ gewählt wurden. Die Unabhängigkeit der Charakteristika wurde mit dem Chi²- und Fisher's-Exact-Test überprüft. Die OR, das CI 95% und das HWE wurden auch angegeben.

Unsere Auswertung lieferte keine statistisch signifikanten Ergebnisse, als wir eine Assoziation des SNPs rs72924108 mit den drei Tumorentitäten untersuchten. Im Bereich der Mammakarzinome zeichnete sich zwar eine Tendenz ab, diese muss jedoch in nachfolgenden Studien überprüft werden.

Bezüglich des Nodalstatus beim Mammakarzinom konnten wir zeigen, dass das T-Allel, der TT-Genotyp und ebenso die T-Positivität signifikant häufiger bei Patientinnen ohne Lymphknotenmetastasen beobachtet werden, wohingegen das C-Allel und der CC-Genotyp signifikant häufiger bei Patientinnen mit Lymphknotenmetastasen vorkommen. Im Hinblick auf das Endometriumkarzinom lagen das T-Allel und der TT-Genotyp signifikant häufiger bei gut und mittelgradig differenzierten Endometriumkarzinomen vor, wohingegen schlecht differenzierte Endometriumkarzinome signifikant häufiger mit dem C-Allel, der C-Positivität, dem CT- sowie dem CC-Genotyp vergesellschaftet waren. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass der SNP rs72924108 womöglich ein Risikofaktor für die Entwicklung bestimmter Tumormerkmale darstellt.

Zusammenfassung und Ausblick

Die in dieser Arbeit erarbeiteten Ergebnisse ermutigen dazu, weitere Studien zur Rolle des ESRRA-Gens in diesen Tumorentitäten durchzuführen.

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

17-OHPC	17-alpha-hydroxyprogesteron caproat
A	Adenin
AF-1/-2	activating function-1/-2
AJCC	American Joint Committee on Cancer
APC-Resistenz	aktivierte Protein C Resistenz
ARMS	Amplification Refractory Mutation System
ARID1A	AT-rich interactive domain-containing protein 1A
Bp	base pairs
BRCA1	BReast CAncer 1
BRCA2	BReast CAncer 2
C	Cytosin
cDNA	complementary DNA
cm	Zentimeter
CHEK2	checkpoint kinase 2
CI 95%	Konfidenzintervall 95%
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DBD	DNA-Bindungsdomäne
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
cGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER(α)	Östrogenrezeptor (alpha)
ERE	estrogen response element
ESRRA	estrogen related receptor alpha
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
g	Gram
G	Guanin
G	Grading

Anhang

GWAS	Genomweite Assoziationsstudien
Her2	human epidermal growth factor receptor 2
HFN-1	Hepatocyte nuclear factor-1
HNPPC	hereditary non-polyposis colorectal cancer
HWE	Hardy Weinberg Equilibrium
IPC	inner primer C
IPT	inner primer T
IRS	Immunreaktiver Score
Kb	Kilobase
LBD	Ligandenbindungsdomäne
M	Metastasierung
M	Molar
mA	Milliamper
mAU	milli Absorption Units
Min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA
mTOR	mechanistic target of rapamycin
N	Lymphknotenbefall
ng	Nanogram
NST	invasive breast carcinoma of no special type
OP1	outer primer 1
OP2	outer primer 2
OR	odds ratio
PALB2	partner and localizer of BRCA2
PCR	polymerase chain reaction
PIK3CA	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
PTEN	phosphatase and tensin homolog
PR	Progesteronrezeptor
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
qPCR	Real Time Quantitative PCR

Anhang

rpm	revolutions per minute
s	Sekunde(n)
SNP	single nucleotide polymorphism
T	Tumogröße
T	Thymin
TBE	Tris-Borat-EDTA
U	Enzymeinheiten
UICC	Union International Contre le Cancer
VEGF	vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organization
(17-β-)E2	17-Beta-Östradiol
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
°C	Grad Celsius
% v/v	Volumenprozent
% w/v	Massenprozent

Anhang

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM-Klassifikation und Union Internationale Contre le Cancer (UICC)-Stadien des Mammakarzinoms (in Anlehnung an Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) 2018) (5).....	7
Tabelle 2: Kriterien zur Festlegung des Differenzierungsgrades des Mammakarzinoms (in Anlehnung an Elston C & Ellis I 1991) (14).....	9
Tabelle 3: Immunhistochemische Scores zur Hormonrezeptorbewertung des Mammakarzinoms (in Anlehnung an das Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) 2018) (5)	11
Tabelle 4: Einteilung der Mammakarzinome anhand des Hormon-, Her2- und Ki-67-Status und Indikation zur endokrinen bzw. Chemotherapie (in Anlehnung an Goldhirsch A et al. 2011) (21)	12
Tabelle 5: St. Gallener Risikoeinteilung für operierte Mammakarzinome von 2007 (in Anlehnung an Goldhirsch A et al. 2007) (22)	13
Tabelle 6: TNM-Klassifikation und FIGO-Stadien der Tumoren des Ovars, der Tube und des primären peritonealen Karzinoms (in Anlehnung an Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) 2019) (28)..	15
Tabelle 7: Graduierung der Ovarialkarzinome (in Anlehnung an Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) 2019) (28)..	17
Tabelle 8: Ovarialkarzinome nach Histologie (in Anlehnung an Prat J 2012) (33) ..	18
Tabelle 9: FIGO-Stadien und TNM-Klassifikation des Endometriumkarzinoms (in Anlehnung an Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) 2018) (43)	22
Tabelle 10: Grading des Endometriumkarzinoms (52)	23
Tabelle 11: Überblick über die Unterschiede der Typ I und Typ II Karzinome (1, 43, 44, 53, 54).....	24
Tabelle 12: Der ESRRA beim Mamma-, Ovarial- und Endometriumkarzinom	35
Tabelle 13: Klinisch-pathologische Kriterien, nach denen die Karzinome jeweils untersucht wurden	39
Tabelle 14: Reagenzien	40
Tabelle 15: Hilfsmittel	42
Tabelle 16: Geräte	42

Anhang

Tabelle 17: Primer zur Analyse des SNP rs72924108	46
Tabelle 18: Standard 10 µl PCR-Ansatz	47
Tabelle 19: PCR-Protokoll.....	47
Tabelle 20: 10 µl PCR-Ansatz zur Analyse des SNPs rs72924108.....	48
Tabelle 21: Doppelter 20 µl Ansatz zur Analyse des SNP rs72924108.....	50
Tabelle 22: Modifizierter 10 µl PCR-Ansatz zur Analyse des SNP rs72924108.....	51
Tabelle 23: Light Cycler Ansatz.....	52
Tabelle 24: qPCR Protokoll	53
Tabelle 25: Vierfeldertafel zur Veranschaulichung der beobachteten Häufigkeiten (126)	55
Tabelle 26: Vierfeldertafel zur Veranschaulichung der zu erwartenden Häufigkeiten (126)	56
Tabelle 27: Vierfeldertafel zur Berechnung der OR (128)	57
Tabelle 28: Verteilung der Patientinnen auf die Subgruppen	59
Tabelle 29: Genotypverteilung der Kontrollgruppe	59
Tabelle 30: Genotypverteilung der Kontrollgruppe nach Ausschluss aller Patientinnen ohne Altersangabe	60
Tabelle 31: Genotypverteilung der Mammakarzinomgruppe.....	60
Tabelle 32: Assoziation des SNPs rs72924108 mit dem Mammakarzinom	61
Tabelle 33: Assoziation des SNPs rs72924108 mit dem Mammakarzinom nach Alterskorrektur.....	63
Tabelle 34: Patientinnen der Mammakarzinomgruppe nach Tumogröße, Nodalstatus, Grading, Hormon- und Her2-Rezeptorstatus.....	66
Tabelle 35: Assoziation des SNPs rs72924108 mit der Tumogröße (Tis=Carcinoma in Situ).....	67
Tabelle 36: Assoziation des SNPs rs72924108 mit dem Nodalstatus	70
Tabelle 37: Assoziation des SNPs rs72924108 mit dem Grading	72
Tabelle 38: Assoziation des SNPs rs72924108 mit dem Her2-Rezeptorstatus.....	74
Tabelle 39: Assoziation des SNPs rs72924108 mit dem ER-Status	76
Tabelle 40: Assoziation des SNPs rs72924108 mit dem PR-Status	78
Tabelle 41: Genotypverteilung bei der Ovarialkarzinomgruppe.....	80
Tabelle 42: Assoziation des SNPs rs72924108 mit dem Ovarialkarzinom	81

Anhang

Tabelle 43: Assoziation des SNPs rs72924108 mit dem Ovarialkarzinom nach Alterskorrektur.....	83
Tabelle 44: Grading der Ovarialkarzinomgruppe.....	85
Tabelle 45: Assoziation SNPs rs72924108 mit dem Grading.....	86
Tabelle 46: Genotypverteilung bei der Endometriumkarzinomgruppe.....	88
Tabelle 47: Assoziation des SNPs rs72924108 mit dem Endometriumkarzinom.....	89
Tabelle 48: Assoziation des SNPs rs72924108 mit dem Endometriumkarzinom nach Alterskorrektur.....	91
Tabelle 49: Grading der Endometriumkarzinomgruppe.....	93
Tabelle 50: Assoziation des SNPs rs72924108 mit dem Grading	94

Anhang

6.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Grundlegende Struktur eukaryotischer Gene (nach https://www.magazinescience.com/en/biology/eukaryotic-gene-structure/ , abgerufen am 28.08.2019. Basic eukaryotic gene structure)	26
Abbildung 2: Struktur der ERRs im Vergleich zu den ERs nach Misawa A & Inoue S 2015 (78).....	29
Abbildung 3: Chemische Strukturen von 17- β -E2 und Phytoöstrogenen nach Suetsugi M et al. 2003 (122)	36
Abbildung 4: Polymerase Ketten Reaktion als Schema (nach https://www.xxpresspcr.com/all-news/polymerase-chain-reaction-the-past-present-and-future/ , abgerufen am 13.08.2019)	44
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Tetra-Primer ARMS-PCR (nach Ye S et al. 2001 (125)).....	45
Abbildung 6: Beispiel eines Gelelektrophoresebildes des SNPs rs72924108. Auswertung der ersten vier oberen Bahnen: 1.Bahn: 10 kb Ladder, 2. Bahn: CT (heterozygot), 3. Bahn: TT (homozygot), 4. Bahn: CC (homozygot)	49
Abbildung 7: Das abgeleitete Hochauflösungsschmelzkurvendiagramm erlaubt die Darstellung der Genotype der Wildtyp-, der heterozygoten und der mutierten homozygoten Proben (nach https://www.jax.org/news-and-insights/jax-blog/2015/september/hold-theagarose-advanced-pcr-methods-for-genotyping-mice , abgerufen am 22.08.2019).....	53
Abbildung 8: Allelfrequenzen der Kontroll- und Mammakarzinomgruppe	62
Abbildung 9: Genotypfrequenzen der Kontroll- und Mammakarzinomgruppe.....	62
Abbildung 10: Allelpositivitäten der Kontroll- und Mammakarzinomgruppe.....	62
Abbildung 11: Allelfrequenzen der Kontroll- und Mammakarzinomgruppe nach Alterskorrektur.....	64
Abbildung 12: Genotypfrequenzen der Kontroll- und Mammakarzinomgruppe nach Alterskorrektur.....	64
Abbildung 13: Allelpositivitäten der Kontroll- und Mammakarzinomgruppe nach Alterskorrektur.....	64
Abbildung 14: Allelfrequenzen der Mammakarzinome nach Tumorgröße.....	68
Abbildung 15: Genotypfrequenzen der Mammakarzinome nach Tumorgröße.....	68

Anhang

Abbildung 16: Allelpositivitäten Mammakarzinome nach Tumorgröße.....	68
Abbildung 17: Allelfrequenzen der Mammakarzinome nach Nodalstatus	71
Abbildung 18: Genotypfrequenzen der Mammakarzinome nach Nodalstatus.....	71
Abbildung 19: Allelpositivitäten der Mammakarzinome nach Nodalstatus	71
Abbildung 20: Allelfrequenzen der Mammakarzinome nach Grading	73
Abbildung 21: Genotypfrequenzen der Mammakarzinome nach Grading.....	73
Abbildung 22: Allelpositivitäten der Mammakarzinome nach Grading	73
Abbildung 23: Allelfrequenzen der Mammakarzinome nach Her2-Status	75
Abbildung 24: Genotypfrequenzen der Mammakarzinome nach Her2-Status	75
Abbildung 25: Allelpositivitäten der Mammakarzinome nach Her2-Status	75
Abbildung 26: Allelfrequenzen der Mammakarzinome nach ER-Status.....	77
Abbildung 27: Genotypfrequenzen der Mammakarzinome nach ER-Status	77
Abbildung 28: Allelpositivitäten der Mammakarzinome nach ER-Status.....	77
Abbildung 29: Allelfrequenzen der Mammakarzinome nach PR-Status.....	79
Abbildung 30: Genotypfrequenzen der Mammakarzinome nach PR-Status	79
Abbildung 31: Allelpositivitäten der Mammakarzinome nach PR-Status	79
Abbildung 32: Allelfrequenzen der Kontroll- und Ovarialkarzinomgruppe	82
Abbildung 33: Genotypfrequenzen der Kontroll- und Ovarialkarzinomgruppe	82
Abbildung 34: Allelpositivitäten der Kontroll- und Ovarialkarzinomgruppe	82
Abbildung 35: Allelfrequenzen der Kontroll- und Ovarialkarzinomgruppe nach Alterskorrektur.....	84
Abbildung 36: Genotypfrequenzen der Kontroll- und Ovarialkarzinomgruppe nach Alterskorrektur.....	84
Abbildung 37: Allelpositivitäten der Kontroll- und Ovarialkarzinomgruppe nach Alterskorrektur.....	84
Abbildung 38: Allelfrequenzen der Ovarialkarzinome nach Grading	87
Abbildung 39: Genotypfrequenzen der Ovarialkarzinome nach Grading	87
Abbildung 40: Allelpositivitäten der Ovarialkarzinome nach Grading	87
Abbildung 41: Allelfrequenzen der Kontroll- und Endometriumkarzinomgruppe	90
Abbildung 42: Genotypfrequenzen der Kontroll- und Endometriumkarzinomgruppe	90
Abbildung 43: Allelpositivitäten der Kontroll- und Endometriumkarzinomgruppe ...	90

Anhang

Abbildung 44: Allelfrequenzen der Kontroll- und Endometriumkarzinomgruppe nach Alterskorrektur.....	92
Abbildung 45: Genotypfrequenzen der Kontroll- und Endometriumkarzinomgruppe nach Alterskorrektur.....	92
Abbildung 46: Allelpositivitäten der Kontroll- und Endometriumkarzinomgruppe nach Alterskorrektur.....	92
Abbildung 47: Allelfrequenzen der Endometriumkarzinome nach Grading	95
Abbildung 48: Genotypfrequenzen der Endometriumkarzinome nach Grading	95
Abbildung 49: Allelpositivitäten der Endometriumkarzinome nach Grading	95

7 Literatur

1. Stewart BW, Wild C. World cancer report 2014. Lyon; 2014.
2. Robert Koch-Institut. Krebs in Deutschland für 2013/2014. Berlin; 2017.
3. Antoniou A, Pharoah P, Narod S, Risch H, Eyfjord J, Hopper JL, et al. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history : a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet.* 2003;72(5):1117–30.
4. Gerhardus A, Schleberger H, Schlegelberger B. BRCA - Erblicher Brust- und Eierstockkrebs. Beratung - Testverfahren - Kosten. Schwartz FW, editor. Heidelberg, Deutschland: Springer Medizin Verlag; 2005.
5. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF). S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Version 4.1. 2018.
6. McPherson K, Steel CM, Dixon JM. Breast cancer — epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ.* 2000;321(7261):624–8.
7. Haag P, Hanhart N, Müller M. Gynäkologie und Urologie Für Studium und Praxis. 8. Auflage. Breisach, Deutschland: Medizinische Verlags- und Informationsdienste; 2016.
8. Colditz GA, Hankinson SE, Hunter DJ, Willett WC, Manson JE, Stampfer MJ, et al. The use of estrogens and progestins and the risk of breast cancer in postmenopausal women. *N Engl J Med.* 1995;332(24):1589–93.
9. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormone replacement therapy : collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52 705 women with breast cancer and 108 411 women without breast cancer. *Lancet.* 1997;350(9084):1047–59.
10. Sattin RW, Rubin GL, Wingo PA, Webster LA, Ory HW. Oral contraceptive use and the risk of breast cancer. *N Engl J Med.* 1986 Aug 14;315(7):405–11.
11. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. *Lancet.* 1996;347(9017):1713–27.
12. Marchbanks PA, McDonald JA, Wilson HG, Folger SG, Mandel MG, Daling JR,

Literatur

- et al. Oral contraceptives and the risk of breast cancer. *N Engl J Med.* 2002;346(26):2025–32.
13. Sinn HP, Kreipe H. A brief overview of the WHO classification of breast tumors, 4th edition, focusing on issues and updates from the 3rd edition. *Breast Care.* 2013;8(2):149–54.
 14. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology.* 1991;19(5):403–10.
 15. Giuliano AE, Connolly JL, Edge SB, Mittendorf EA, Rugo HS, Solin LJ, et al. Breast cancer — major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin.* 2017;67(4):290–303.
 16. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer.* 1989;63(1):181–7.
 17. Haybittle JL, Blamey RW, Elston CW, Johnson J, Doyle PJ, Campbell FC, et al. A prognostic index in primary breast cancer. *Br J Cancer.* 1982;45(3):361–6.
 18. Hammond MEH, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28(16):2784–95.
 19. Remmele W, Stegner HE. [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe.* 1987;8(3):138–40.
 20. Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol.* 1999;17(5):1474–81.
 21. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thurlimann B, Senn H-J, et al. Strategies for subtypes — dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2011. *Ann Oncol.* 2011;22(8):1736–47.
 22. Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn H-J, et al. Progress and promise: highlights of the international expert consensus on

Literatur

- the primary therapy of early breast cancer 2007. Ann Oncol. 2007;18(7):1133–44.
23. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. N Engl J Med. 2004;351(27):2817–26.
 24. Paik S, Tang G, Shak S, Kim C, Baker J, Kim W, et al. Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. J Clin Oncol. 2006;24(23):3726–34.
 25. Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, Pritchard KI, Albain KS, Hayes DF, et al. Adjuvant chemotherapy guided by a 21-gene expression assay in breast cancer. N Engl J Med. 2018;379(2):111–21.
 26. Walsh T, Casadei S, Lee MK, Pennil CC, Nord AS, Thornton AM, et al. Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing. Proc Natl Acad Sci USA. 2011;108(44):18032–7.
 27. Harter P, Hauke J, Heitz F, Reuss A, Kommoß S, Marme F, et al. Prevalence of deleterious germline variants in risk genes including BRCA1/2 in consecutive ovarian cancer patients (AGO-TR-1). PLoS One. 2017;12(10):e0186043.
 28. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF). S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren, Langversion 3.0. 2019.
 29. Cibula D, Widschwendter M, Majek O, Dusek L. Tubal ligation and the risk of ovarian cancer: review and meta-analysis. Hum Reprod Update. 2011;17(1):55–67.
 30. Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian Cancer. Menopausal hormone use and ovarian cancer risk : individual participant meta-analysis of 52 epidemiological studies. Lancet. 2015;385(9980):1835–42.
 31. Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian Cancer. Ovarian cancer and oral contraceptives : collaborative reanalysis of data from 45 epidemiological studies including 23 257 women with ovarian cancer and 87 303 controls. Lancet. 2008;371(9609):303–14.
 32. Shih I-M, Kurman RJ. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. Am J Pathol.

Literatur

- 2004;164(5):1511–8.
33. Prat J. Ovarian carcinomas: five distinct diseases with different origins, genetic alterations, and clinicopathological features. *Virchows Arch.* 2012;460(3):237–49.
 34. Malamou-mitsi V, Crikoni O, Timotheadou E, Aravantinos G, Vrettou E, Agnantis N, et al. Prognostic significance of HER-2 , p53 and Bcl-2 in patients with epithelial ovarian cancer. *Anticancer Res.* 2007;27(2):1157–65.
 35. Felip E, Del Campo JM, Rubio D, Vidal MT, Colomer R, Bermejo B. Overexpression of c-erbB-2 in epithelial ovarian cancer. Prognostic value and relationship with response to chemotherapy. *Cancer.* 1995;75(8):2147–52.
 36. Camilleri-Broët S, Hardy-Bessard A, Tourneau A Le, Paraiso D, Levrel O, Leduc B, et al. HER-2 overexpression is an independent marker of poor prognosis of advanced primary ovarian carcinoma : a multicenter study of the GINECO group. *Ann Oncol.* 2004;15(1):104–12.
 37. Wang K, Guan C, Yu J, Jin X, Sun L, Zheng L, et al. Prognostic value of HER-2/neu expression in epithelial ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget.* 2017;8(43):75528–43.
 38. Herod JJO, Eliopoulos AG, Kerr DJ, Warwick J, Niedobitek G, Young LS, et al. The prognostic significance of Bcl-2 and p53 expression in ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 1996;56(9):2178–85.
 39. Ferrandina G, Fagotti A, Salerno MG, Natali PG, Mottolese M, Maneschi F, et al. p53 overexpression is associated with cytoreduction and response to chemotherapy in ovarian cancer. *Br J Cancer.* 1999;81(4):733–40.
 40. Meden H, Kuhn W. Overexpression of the oncogene c-erbB-2 (HER2/neu) in ovarian cancer: a new prognostic factor. *Eur J Obs Gynecol Reprod Biol.* 1997;71(2):173–9.
 41. Welsh JB, Zarrinkar PP, Sapino LM, Kern SG, Behling CA, Monk BJ, et al. Analysis of gene expression profiles in normal and neoplastic ovarian tissue samples identifies candidate molecular markers of epithelial ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98(3):1176–81.
 42. Spentzos D, Levine DA, Ramoni MF, Joseph M, Gu X, Boyd J, et al. Gene expression signature with independent prognostic significance in epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol.* 2004;22(23):4700–10.

Literatur

43. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF). Diagnostik, Therapie und Nachsorge der Patientinnen mit Endometriumkarzinom, Langversion 1.0. 2018.
44. Bokhman J V. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*. 1983 Feb;15(1):10–7.
45. Grady D, Gebretsadik T, Kerlikowske K, Ernster V, Petitti D. Hormone replacement therapy and endometrial cancer risk: a meta-analysis. *Obs Gynecol*. 1995;85(2):304–13.
46. Million Women Study Collaborators. Endometrial cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet*. 2005;365(9470):1543–51.
47. Hulka BS, Chambless LE, Kaufman DG, Fowler WCJ, Greenberg BG. Protection against endometrial carcinoma by combination-product oral contraceptives. *JAMA*: 1982 Jan 22;247(4):475.
48. Combination oral contraceptive use and the risk of endometrial cancer. The Cancer and Steroid Hormone Study of the Centers for Disease Control and the National Institute of Child Health and Human Development. *JAMA*. 1987;257(6):796–800.
49. Collaborative Group on Epidemiological Studies on Endometrial Cancer. Endometrial cancer and oral contraceptives : an individual participant meta-analysis of 27 276 women with endometrial cancer from 36 epidemiological studies. *Lancet Oncol*. 2015;16(9):1061–70.
50. Fornander T, Rutqvist LE, Cedermark B, Glas U, Mattsson A, Silfversward C, et al. Adjuvant tamoxifen in early breast cancer: occurrence of new primary cancers. *Lancet*. 1989;1(8630):117–20.
51. Kaaks R, Lukanova A, Kurzer MS. Obesity, endogenous hormones, and endometrial cancer risk: a synthetic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2002;11(12):1531–43.
52. Soslow RA, Tornos C, Park KJ, Malpica A, Matias-Guiu X, Oliva E, et al. Endometrial carcinoma diagnosis: use of FIGO grading and genomic subcategories in clinical practice: recommendations of the international society of gynecological pathologists. *Int J Gynecol Pathol*. 2019;38 Suppl 1:S64–74.
53. Yeramian A, Dolcet X, Catasus L, Abal M, Colas E, Reventos J, et al.

Literatur

- Endometrial carcinoma: molecular alterations involved in tumor development and progression. *Oncogene*. 2013;32(4):403–13.
54. Cancer Genome Atlas Research Network, Kandoth C, Schultz N, Cherniack AD, Akbani R, Liu Y, et al. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature*. 2013;497(7447):67–73.
55. Prat J. Prognostic parameters of endometrial carcinoma. *Hum Pathol*. 2004;35(6):649–62.
56. Tejerizo-Garcia A, Jimenez-Lopez JS, Munoz-Gonzalez JL, Bartolome-Sotillos S, Marqueta-Marques L, Lopez-Gonzalez G, et al. Overall survival and disease-free survival in endometrial cancer: prognostic factors in 276 patients. *Onco Targets Ther*. 2013;16(9):1305–13.
57. Bendifallah S, Canlorbe G, Huguet F, Coutant C, Hudry D, Graesslin O, et al. A risk scoring system to determine recurrence in early-stage type 1 endometrial cancer: a french multicentre study. *Ann Surg Oncol*. 2014;21(13):4239–45.
58. Slomovitz BM, Coleman RL. The PI3K/AKT/mTOR Pathway as a Therapeutic Target in Endometrial Cancer. *Clin Cancer Res*. 2012;18(21):5856–65.
59. Slomovitz BM, Lu KH, Johnston T, Coleman RL, Munsell M, Broaddus R, et al. A phase 2 study of the oral mammalian target of rapamycin inhibitor, everolimus, in patients with recurrent endometrial carcinoma. *Cancer*. 2010;116(23):5415–9.
60. Chresta CM, Davies BR, Hickson I, Harding T, Cosulich S, Critchlow SE, et al. AZD8055 is a potent, selective, and orally bioavailable ATP-competitive Mammalian Target of Rapamycin Kinase Inhibitor with in vitro and in vivo antitumor activity. *Cancer Res*. 2010;70(1):288–98.
61. Creasman WT. Prognostic significance of hormone receptors in endometrial cancer. *Cancer*. 1993;71(4 Suppl):1467–70.
62. Jongen V, Briët J, de Jong R, ten Hoor K, Boezen M, van der Zee A, et al. Expression of estrogen receptor-alpha and -beta and progesterone receptor-A and -B in a large cohort of patients with endometrioid endometrial cancer. *Gynecol Oncol*. 2009;112(3):537–42.
63. Backes F, Walker C, Goodfellow P, Hade E, Agarwal G, Mutch D, et al. Estrogen receptor-alpha as a predictive biomarker in endometrioid endometrial cancer. *Gynecol Oncol*. 2016;141(2):312–7.

Literatur

64. Krebs JE, Kilpatrick ST, Goldstein ES. Lewin's genes XI. 11th ed. Burlington, USA: Jones & Bartlett Learning; 2012.
65. Nordheim A, Knippers R, Dröge P, Meister G, Schiebel E, Vingron M, et al. Molekulare Genetik. 10. Auflag. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2015.
66. The International HapMap Consortium. The international HapMap project. *Nature*. 2003;426(6968):789–96.
67. King RA, Rotter JI, Motulsky AG. Approach to Genetic Basis of Common Diseases. In: King RA, Rotter JI, Motulsky AG, editors. The Genetic Basis of Common Disease. 2. Auflage. New York: Oxford University Press; 2002. p. 3–17.
68. Cooper DN. Functional intronic polymorphisms: Buried treasure awaiting discovery within our genes. *Hum Genomics*. 2010;4(5):284–8.
69. Maurano MT, Humbert R, Rynes E, Thurman RE, Haugen E, Wang H, et al. Systematic localization of common disease-associated variation in regulatory DNA. *Science* (80-). 2012;337(6099):1190–5.
70. Zoller B, Dahlbäck B. Linkage between inherited resistance to activated protein C and factor V gene mutation in venous thrombosis. *Lancet*. 1994;343(8912):1536–8.
71. Dahlbäck B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90(3):1004–8.
72. Dahlbäck B, Hildebrand B. Inherited resistance to activated protein C is corrected by anticoagulant cofactor activity found to be a property of factor V. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91(4):1396–400.
73. Manuck TA, Lai Y, Meis PJ, Dombrowski MP, Sibai B, Spong CY, et al. Progesterone receptor polymorphisms and clinical response to 17-alpha-hydroxyprogesterone caproate. *Am J Obs Gynecol*. 2011;205(2):e1-9.
74. Giguère V, Yang N, Segui P, Evans RM. Identification of a new class of steroid hormone receptors. *Nature*. 1988;331(6151):91–4.
75. Giguere V. Orphan nuclear receptors: From gene to function. *Endocr Rev*. 1999;20(5):689–725.
76. Laudet V, Adelman G. Nuclear receptors. Lonesome orphans. *Curr Biol*.

Literatur

- 1995;5(2):124–7.
77. Robinson-Rechavi M, Garcia HE, Laudet V. The nuclear receptor superfamily. *J Cell Sci.* 2003;116(Pt 4):585–6.
78. Misawa A, Inoue S. Estrogen-related receptors in breast cancer and prostate cancer. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2015;6:1–7.
79. Bonnelye E, Vanacker JM, Dittmar T, Begue A, Desbiens X, Denhardt DT, et al. The ERR-1 Orphan Receptor Is a Transcriptional Activator Expressed During Bone Development. *Mol Endocrinol.* 1997;11(7):905–16.
80. Johnston SD, Liu X, Zuo F, Eisenbraun TL, Wiley SR, Kraus RJ, et al. Estrogen-related receptor 1 functionally binds as a monomer to extended half-site sequences including ones contained within estrogen-response elements. *Mol Endocrinol.* 1997;11(3):342–52.
81. Yang N, Shigeta H, Shi H, Teng CT. Estrogen-related receptor, hERR1, modulates estrogen receptor-mediated response of human lactoferrin gene promoter. *J Biol Chem.* 1996;271(10):5795–804.
82. Zhang Z, Teng CT. Estrogen receptor-related receptor α1 interacts with coactivator and constitutively activates the estrogen response elements of the human lactoferrin gene. *J Biol Chem.* 2000;275(27):20837–46.
83. Bookout AL, Jeong Y, Downes M, Yu RT, Evans RM, Mangelsdorf DJ. Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network. *Cell.* 2006;126(4):789–99.
84. Sladek R, Bader J a, Giguère V. The orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha is a transcriptional regulator of the human medium-chain acyl coenzyme A dehydrogenase gene. *Mol Cell Biol.* 1997;17(9):5400–9.
85. Villena JA, Kralli A. ERR α : a metabolic function for the oldest orphan. *Trends Endocrinol Metab.* 2008;19(8):269–76.
86. Villena JA, Hock MB, Chang WY, Barcas JE, Giguere V, Kralli A. Orphan nuclear receptor estrogen-related receptor α is essential for adaptive thermogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104(4):1418–23.
87. Tremblay AM, Giguere V. The NR3B subgroup: an ovERRview. *Nucl Recept Signal.* 2007;5:e009.
88. Chen S. Molecular basis for the constitutive activity of estrogen-related receptor α -1. *J Biol Chem.* 2001;276(30):28465–70.

Literatur

89. Kraus RJ, Ariazi EA, Farrell ML, Mertz JE. Estrogen-related receptor α 1 actively antagonizes estrogen receptor-regulated transcription in MCF-7 mammary cells. *J Biol Chem.* 2002;277(27):24826–34.
90. Suzuki T, Miki Y, Moriya T, Shimada N, Ishida T, Hirakawa H, et al. Estrogen-related receptor α in human breast carcinoma as a potent prognostic factor. *Cancer Res.* 2004;64(13):4670–6.
91. Ariazi EA, Clark GM, Mertz JE. Estrogen-related receptor alpha and estrogen-related receptor gamma associate with unfavorable and favorable biomarkers, respectively, in human breast cancer. *Cancer Res.* 2002;62(22):6510–8.
92. Stein RA, Gaillard S, McDonnell DP. Estrogen-related receptor alpha induces the expression of vascular endothelial growth factor in breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2009;114(1–2):106–12.
93. Deblois G, Hall JA, Perry MC, Laganière J, Ghahremani M, Park M, et al. Genome-wide identification of direct target genes implicates estrogen-related receptor α as a determinant of breast cancer heterogeneity. *Cancer Res.* 2009;69(15):6149–57.
94. Stein RA, Chang C-Y, Kazmin DA, Way J, Schroeder T, Wergin M, et al. Estrogen-related receptor alpha is critical for the growth of estrogen receptor-negative breast cancer. *Cancer Res.* 2008;68(21):8805–12.
95. Wu Y-M, Chen Z-J, Liu H, Wei W-D, Lu L-L, Yang X-L, et al. Inhibition of ERR α suppresses epithelial mesenchymal transition of triple negative breast cancer cells by directly targeting fibronectin. *Oncotarget.* 2015;6(28):25588–601.
96. Wu Y, Chen Z, Jiang G, Zhang K, Liu Q, Liang S-W, et al. Inverse agonist of estrogen-related receptor α suppresses the growth of triple negative breast cancer cells through ROS generation and interaction with multiple cell signaling pathways. *Oncotarget.* 2016;7(11):12568–81.
97. Du Y, Song L, Zhang L, Ling H, Zhang Y, Chen H, et al. The discovery of novel, potent ERR-alpha inverse agonists for the treatment of triple negative breast cancer. *Eur J Med Chem.* 2017;136:457–67.
98. Lanvin O, Bianco S, Kersual N, Chalbos D, Vanacker J-M. Potentiation of ICI182,780 (Fulvestrant)-induced estrogen receptor- α degradation by the estrogen receptor-related receptor- α inverse agonist XCT790. *J Biol Chem.* 2007;282(39):28328–34.

Literatur

99. Chisamore MJ, Wilkinson HA, Flores O, Chen JD. Estrogen-related receptor- α antagonist inhibits both estrogen receptor-positive and estrogen receptor-negative breast tumor growth in mouse xenografts. *Mol Cancer Ther.* 2009;8(3):672–81.
100. Chisamore MJ, Cunningham ME, Flores O, Wilkinson HA, Chen JD. Characterization of a novel small molecule subtype specific estrogen-related receptor α antagonist in MCF-7 breast cancer cells. *PLoS One.* 2009;4(5):e5624.
101. Tribollet V, Barenton B, Kroiss A, Vincent S, Zhang L, Forcet C, et al. miR-135a inhibits the invasion of cancer cells via suppression of ERR α . *PLoS One.* 2016;11(5):e0156445.
102. Zhao Y, Li Y, Lou G, Zhao L, Xu Z, Zhang Y, et al. MiR-137 targets estrogen-related receptor alpha and impairs the proliferative and migratory capacity of breast cancer cells. *PLoS One.* 2012;7(6):e39102.
103. Subrata M, Bostner J, Sun Y, Miller LD, Alayev A, Schwartz NS, et al. ERR α is a marker of tamoxifen response and survival in triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2016;22(6):1421–31.
104. Salzman J, Marinelli RJ, Wang PL, Green AE, Nielsen JS, Nelson BH, et al. ESRRA-C11orf20 is a recurrent gene fusion in serous ovarian carcinoma. *PLoS Biol.* 2011;9(9):e1001156.
105. Micci F, Panagopoulos I, Thorsen J, Davidson B, Tropé CG, Heim S. Low frequency of ESRRA-C11orf20 fusion gene in ovarian carcinomas. *PLoS Biol.* 2014;12(2):e1001784.
106. Sun P, Sehouli J, Denkert C, Mustea A, Könsgen D, Koch I, et al. Expression of estrogen receptor-related receptors, a subfamily of orphan nuclear receptors, as new tumor biomarkers in ovarian cancer cells. *J Mol Med.* 2005;83(6):457–67.
107. Fujimoto J, Alam S, Jahan I, Sato E, Sakaguchi H, Tamaya T. Clinical implication of estrogen-related receptor (ERR) expression in ovarian cancers. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2007;104(3–5):301–4.
108. Luo H, Rankin GO, Liu L, Daddysman MK, Jiang BH, Chen YC. Kaempferol Inhibits Angiogenesis and VEGF Expression Through Both HIF Dependent and Independent Pathways in Human Ovarian Cancer Cells. *Nutr Cancer.*

Literatur

- 2009;61(4):554–63.
109. Wang C-W, Hsu W-H, Tai C-J. Antimetastatic effects of cordycepin mediated by the inhibition of mitochondrial activity and estrogen-related receptor α in human ovarian carcinoma cells. *Oncotarget*. 2017;8(2):3049–58.
 110. Lam SS, Mak AS, Yam JW, Cheung AN, Ngan HY, Wong AS. Targeting estrogen-related receptor alpha inhibits epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell properties of ovarian cancer cells. *Mol Ther*. 2014;22(4):743–51.
 111. Watanabe A, Kinoshita Y, Hosokawa K, Mori T, Yamaguchi T, Honjo H. Function of estrogen-related receptor alpha in human endometrial cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(4):1573–7.
 112. Sun PM, Gao M, Wei LH, Mustea A, Wang JL, Könsgen D, et al. An estrogen receptor α -dependent regulation of estrogen receptor-related receptor α in the proliferation of endometrial carcinoma cells. *Int J Gynecol Cancer*. 2006;16(Suppl. 2):564–8.
 113. Kokabu T, Mori T, Matsushima H, Yoriki K, Kataoka H, Tarumi Y, et al. Antitumor effect of XCT790, an ER α inverse agonist, on ER α -negative endometrial cancer cells. *Cell Oncol*. 2019;42(2):223–35.
 114. Gao M, Sun P, Wang J, Zhao D, Wei L. Expression of estrogen receptor-related receptor isoforms and clinical significance in endometrial adenocarcinoma. *Int J Gynecol Cancer*. 2006;16(2):827–33.
 115. Matsushima H, Mori T, Ito F, Yamamoto T, Akiyama M, Kokabu T, et al. Anti-tumor effect of estrogen-related receptor alpha knockdown on uterine endometrial cancer. *Oncotarget*. 2016;7(23):34131–48.
 116. Fujimoto J, Sato E. Clinical implication of estrogen-related receptor (ERR) expression in uterine endometrial cancers. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2009;116(1–2):71–5.
 117. Yang C, Chen S. Two organochlorine pesticides, toxaphene and chlordane, are antagonists for estrogen-related receptor α -1 orphan receptor. *Cancer Res*. 1999;59(18):4519–24.
 118. Ariazi E, Jordan V. Estrogen-related receptors as emerging targets in cancer and metabolic disorders. *Curr Top Med Chem*. 2006;6(3):203–15.
 119. Horard B, Vanacker JM. Estrogen receptor-related receptors: orphan receptors desperately seeking a ligand. *J Mol Endocr*. 2003;31(3):349–57.

Literatur

120. May FEB. Novel drugs that target the estrogen-related receptor alpha: their therapeutic potential in breast cancer. *Cancer Manag Res.* 2014;6:225–52.
121. Ning Y, Chen H, Du Y, Ling H, Zhang L, Chen L, et al. A novel compound LingH2-10 inhibits the growth of triple negative breast cancer cells in vitro and in vivo as a selective inverse agonist of estrogen-related receptor α. *Biomed Pharmacother.* 2017;93:913–22.
122. Suetsugi M, Su L, Karlsberg K, Yuan Y-C, Chen S. Flavone and isoflavone phytoestrogens are agonists of estrogen-related receptors. *Mol Cancer Res.* 2003;1(13):981–91.
123. Mullis K, Falloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986;51:263–73.
124. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (80-).* 1988;239(4839):487–91.
125. Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins AR, Day INM. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(17):E88-8.
126. Zibran MF. Chi-squared test of independence. University of Calgary, Alberta, Canada; 2007.
127. Kim H-Y. Statistical notes for clinical researchers: Chi-squared test and Fisher's exact test. *Restor Dent Endod.* 2017;42(2):152–5.
128. Szumilas M. Explaining odds ratios. *J Can Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2010;19(3):227–9.
129. Zhang C, Liu Y, Ring BZ, Nie K, Yang M, Wang M, et al. A novel multiplex tetra-primer ARMS-PCR for the simultaneous genotyping of six single nucleotide polymorphisms associated with female cancers. *PLoS One.* 2013;8(4):e62126.
130. Pompanon F, Bonin A, Bellemain E, Taberlet P. Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nat Rev Genet.* 2005;6(11):847–59.
131. Branavan U, Muneeswaran K, Wijesundera S, Jayakody S, Chandrasekharan V, Wijeyaratne C. Identification of selected genetic polymorphisms in polycystic ovary syndrome in Sri Lankan women using low cost genotyping techniques.

Literatur

- PLoS One. 2018;13(12):e0209830.
132. Botstein D, White R, Skolnick M, Davis R. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet.* 1980;32(3):314–31.
 133. Donis-Keller H, Green P, Helms C, Cartinhour S, Weiffenbach B, Stephens K, et al. A genetic linkage map of the human genome. *Cell.* 1987;51(2):319–37.
 134. Kwok PY, Chen X. Detection of single nucleotide polymorphisms. *Curr Issues Mol Biol.* 2003;5(2):43–60.
 135. Syvänen A-C. Toward genome-wide SNP genotyping. *Nat Genet.* 2005;37 Suppl:S5-10.
 136. Gunderson KL, Steemers FJ, Lee G, Mendoza LG, Chee MS. A genome-wide scalable SNP genotyping assay using microarray technology. *Nat Genet.* 2005;37(5):549–54.
 137. Schaid DJ, Guenther JC, Christensen GB, Hebrink S, Rosenow C, Hilker CA, et al. Comparison of microsatellites versus single-nucleotide polymorphisms in a genome linkage screen for prostate cancer-susceptibility loci. *Am Hum Genet.* 2004;75:948–65.
 138. Wang WYS, Barratt BJ, Clayton DG, Todd JA. Genome-wide association studies: theoretical and practical concerns. *Nat Rev Genet.* 2005;6(2):109–18.
 139. Doherty JA, Rossing MA, Cushing-haugen KL, Chen C, Berg J Van Den, Wu AH, et al. ESR1/SYNE1 polymorphism and invasive epithelial ovarian cancer risk: an Ovarian Cancer Association Consortium study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010;19(1):245–50.
 140. Zhou X, Gu Y, Wang D, Ni S, Yan J. Eight functional polymorphisms in the estrogen receptor 1 gene and endometrial cancer risk: a meta-analysis. *PLoS One.* 2013;8(4):e60851.
 141. Li T, Zhao J, Yang J, Ma X, Dai Q, Huang H, et al. A meta-analysis of the association between ESR1 genetic variants and the risk of breast cancer. *PLoS One.* 2016;11(4):e0153314.
 142. O'Mara T, Glubb DM, Painter JN, Cheng T, Dennis J, ANESC, et al. Comprehensive genetic assessment of the ESR1 locus identifies a risk region for endometrial cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2015;22(5):851–61.
 143. Zhang Y, Zhang M, Yuan X, Zhang Z, Zhang P, Chao H, et al. Association

Literatur

- between ESR1 Pvull, XbaI, and P325P polymorphisms and breast cancer susceptibility: a meta-analysis. *Med Sci Monit.* 2015;21:2986–96.
144. Ghali RM, Al-Mutawa MA, Al-Ansari AK, Zaied S, Bhiri H, Mahjoub T, et al. Differential association of ESR1 and ESR2 gene variants with the risk of breast cancer and associated features: A case-control study. *Gene.* 2018;651:194–9.
145. Ding SL, Yu JC, Chen ST, Hsu GC, Hsu HM, Ho JY, et al. Diverse associations between ESR1 polymorphism and breast cancer development and progression. *Clin Cancer Res.* 2010;16(13):3473–84.
146. Purrington KS, Slager S, Eccles D, Yannoukakos D, Fasching PA, Miron P, et al. Genome-wide association study identifies 25 known breast cancer susceptibility loci as risk factors for triple-negative breast cancer. *Carcinogenesis.* 2014;35(5):1012–9.
147. Johnson N, Dudbridge F, Orr N, Gibson L, Jones M, Schoemaker M, et al. Genetic variation at CYP3A is associated with age at menarche and breast cancer risk: a case-control study. *Breast Cancer Res.* 2014;16(3):R51.
148. Thompson DJ, O'Mara TA, Glubb DM, Painter JN, Cheng T, Folkerd E, et al. CYP19A1 fine-mapping and Mendelian randomization: estradiol is causal for endometrial cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2016;23(2):77–91.
149. You D, Wang Y, Zhang Y, Li Q, Yu X, Yuan M, et al. Association of Foxp3 promoter polymorphisms with susceptibility to endometrial cancer in the Chinese Han women. *Medicine (Baltimore).* 2018;97(18):e0582.
150. Miedl H, Lebhard J, Ehart L, Schreiber M. Association of the MDM2 SNP285 and SNP309 genetic variants with the risk, age at onset and prognosis of breast cancer in central european women: A hospital-based case-control study. *Int J Mol Sci.* 2019;20(3):509.
151. Treeck O, Elemenler E, Kriener C, Horn F, Springwald A, Hartmann A, et al. Polymorphisms in the promoter region of ESR2 gene and breast cancer susceptibility. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2009;114(3–5):207–11.
152. Laganiere J, Tremblay GB, Dufour CR, Giroux S, Rousseau F, Giguere V. A polymorphic autoregulatory hormone response element in the human estrogen-related receptor α (ERR α) promoter dictates peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α control of ERR α expression. *J Biol Chem.* 2004;279(18):18504–10.

Literatur

153. Laflamme N, Giroux S, Loredo-Osti JC, Elfassihi L, Dodin S, Blanchet C, et al. A frequent regulatory variant of the estrogen-related receptor α gene associated with BMD in French-Canadian premenopausal women. *J Bone Miner Res.* 2005;20(6):938–44.
154. Giroux S, Elfassihi L, Cole DEC, Rousseau F. Replication of associations between LRP5 and ESRRA variants and bone density in premenopausal women. *Osteoporos Int.* 2008;19(12):1769–75.
155. Li P, Zhu S, Wu X, Zhu X, Li J, Pan L, et al. Association of polymorphisms in mitofusin-2 gene with type 2 diabetes in Han Chinese. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012(20572):1–7.
156. Permuth-Wey J, Chen AY, Tsai Y-Y, Chen Z, Qu X, Lancaster JM, et al. Inherited variants in mitochondrial biogenesis genes may influence epithelial ovarian cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011;20(6):1131–45.
157. Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn H-J, et al. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann Oncol.* 2009;20(8):1319–29.
158. Schüler S, Latrich C, Skrzypczak M, Fehm T, Ortmann O, Treeck O. Polymorphisms in the promoter region of ESR2 gene and susceptibility to ovarian cancer. *Gene.* 2014;546(2):283–7.

Danksagung

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Allen bedanken, die zur Entstehung und zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich möchte mich bei Herrn. Prof. Dr. med. Olaf Ortmann für die Vergabe dieses Themas und die Möglichkeit im Labor seines Institutes die Experimente ausführen zu dürfen, bedanken.

Ein ganz besonderer Dank geht an Prof. Dr. rer. nat. Oliver Treeck, der mich sowohl während der experimentellen Phase als auch während dem Schreiben herausragend betreut hat und bei Fragen und Problemen immer zur Seite stand. Seine jahrelange Erfahrung als Biologe und Doktorvater haben maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Frau Bettina Federhofer möchte ich für die Unterstützung im Labor bedanken. Ihre ruhige, hilfsbereite und freundliche Art im Labor hat zum Gelingen der Arbeit beigetragen und für ein gutes Arbeitsklima gesorgt.

Ich bedanke mich herzlichst bei meinen Eltern, Sue und Paul Keeton, für ihre Unterstützung und Ermutigung sowohl während der Fertigstellung dieser Arbeit als auch während des gesamten Studiums. Schließlich gilt meinem Freund, Matthias, ein ganz besonderer Dank ebenso für seine Unterstützung, vor allem aber für seine Geduld.

Eidesstattliche Erklärung

9 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Eching, den 02.09.2019

Eleanor Keeton