

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR FRAUENHEILKUNDE UND GEBURTSHILFE  
SCHWERPUNKT: FRAUENHEILKUNDE

PROF. DR. OLAF ORTMANN

DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

„Zusammenhang zwischen intratumoraler Genexpression mit menopau-  
salem Status und Adipositas beim invasiven Mammakarzinom“

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Gitte Wenzel

2009



AUS DEM LEHRSTUHL FÜR FRAUENHEILKUNDE UND GEBURTSHILFE  
SCHWERPUNKT: FRAUENHEILKUNDE

PROF. DR. OLAF ORTMANN

DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

„Zusammenhang zwischen intratumoraler Genexpression mit menopau-  
salem Status und Adipositas beim invasiven Mammakarzinom“

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Gitte Wenzel

2009

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Weber

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Olaf Ortmann

2. Berichterstatter: PD Dr. Oliver Treeck

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Februar 2010

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Arbeiten veröffentlicht:

- Pfeiler G, Treeck O, Wenzel G, Goerse R, Hartmann A, Schmitz G, Ortmann O (2009)  
Correlation of body mass index and menopausal status with the intra-tumoral  
estrogen system in invasive breast cancer. *Gynecological endocrinology* **25**:  
183-187.
- Pfeiler G, Treeck O, Wenzel G, Goerse R, Hartmann A, Schmitz G, Ortmann O (2009)  
Influence of insulin resistance on adiponectin receptor expression on breast  
cancer. *Maturitas* **63**: 253-256.

|  |               |
|--|---------------|
| <b>1 Einleitung</b>  | <b>1</b>      |
| 1.1 Risikofaktoren für Brustkrebs  | 1             |
| 1.2 Stand der Forschung  | 3             |
| 1.3 Wirkmechanismus der Östrogenrezeptoren   | 4             |
| 1.4 Karzinogener Effekt von Östrogenen   | 6             |
| 1.5 Struktur der Östrogenrezeptoren  | 7             |
| 1.6 Verschiedende Isoformen der Östrogenrezeptoren   | 8             |
| 1.7 Östrogenbiosynthese  | 11            |
| 1.8 Adipositas im Zusammenhang mit Brustkrebs  | 15            |
| 1.9 Struktur des Insulin/IGF-Systems   | 16            |
| 1.10 Wirkmechanismus des Insulin/IGF-Systems   | 17            |
| 1.11 Beeinflussung des Zusammenhangs zwischen Brustkrebs und Adipositas<br>durch den menopausalen Status | 18            |
| 1.12 Bedeutung von Adiponectin   | 18            |
| 1.13 Wechselwirkungen zwischen Östrogenen und dem IGF-System   | 19            |
| 1.14 Ziel der Arbeit   | 20            |
| <br><b>2 Material</b>  | <br><b>22</b> |
| 2.1 Laborgeräte  | 22            |
| 2.2 Chemikalien  | 22            |
| 2.3 Puffer und Lösungen  | 23            |
| 2.4 Verwendete Primer  | 24            |
| <br><b>3 Methoden</b>  | <br><b>26</b> |
| 3.1 Erstellung des Patientenkollektivs   | 26            |
| 3.2 Probengewinnung  | 26            |
| 3.3 Mikrodissektion  | 27            |
| 3.4 RNA-Isolierung aus mikrodisseziertem Material  | 29            |
| 3.5 cDNA-Synthese für die Real-time PCR  | 31            |
| 3.5.1 Herstellung der cDNA   | 31            |
| 3.5.2 Herstellung der Positivkontrolle   | 32            |
| 3.6. RT-PCR  | 32            |
| 3.6.1 Polymerasekettenreaktion   | 32            |
| 3.6.2 Genexpressionsbestimmung   | 34            |

|   |    |
|---|----|
| 3.7 Kontrolle der RT-PCR Produkte über Agarosegelelektrophorese | 36 |
| 3.8 HOMA-Modelling zur Bestimmung der Insulinsensitivität       | 37 |
| 3.9 Statistische Methoden                                       | 38 |
| <br>  |    |
| 4 Ergebnisse  | 39 |
| 4.1 Beschreibung der Patientendaten                             | 39 |
| 4.1.1 Altersverteilung  | 39 |
| 4.1.2 Body Mass Index (BMI)                                     | 39 |
| 4.1.3 Tumorstadien  | 40 |
| 4.1.4 Ermittlung der Genexpression                              | 41 |
| 4.2 Korrelation der Patientendaten untereinander                | 45 |
| 4.2.1 Östrogenstoffwechsel                                      | 45 |
| 4.2.2 Insulinstoffwechsel                                       | 46 |
| 4.2.3 Adiponectin   | 48 |
| 4.2.4 Tumorstadien  | 50 |
| 4.2.5 Korrelationen der Genexpression untereinander             | 50 |
| <br>  |    |
| 5 Diskussion  | 52 |
| 5.1 Östrogensignalweg   | 53 |
| 5.2 Insulinsignalweg  | 57 |
| 5.3 Einfluss von Adiponectin                                    | 60 |
| 5.4 Korrelation der molekularen Daten mit der Tumorentwicklung  | 62 |
| 5.5 Korrelation von Östrogen- und Insulinsignalweg              | 63 |
| 5.6 Ausblick  | 64 |
| <br>  |    |
| 6 Zusammenfassung   | 65 |
| 7 Literaturverzeichnis  | 67 |

## Tabellenverzeichnis

|          |  |       |
|----------|--|-------|
| Tab. 1:  | Bedeutung der verschiedenen Risikofaktoren für die Entwicklung von Brustkrebs            | 2     |
| Tab. 2:  | Nukleotidsequenzen der verwendeten PCR-Primer  | 24/25 |
| Tab. 3:  | Reagenzien für die RNA-Isolierung  | 29    |
| Tab. 4:  | HOMA-Index   | 38    |
| Tab. 5:  | Verteilung der klinischen und histopathologischen Parameter im Patientenkollektiv        | 40/41 |
| Tab. 6:  | Durchschnittliche Östrogenspiegel und mRNA-Genexpression und Korrelationen mit dem Alter | 46    |
| Tab. 7:  | Korrelationen zwischen Alter der Patientinnen und Markern des Insulinstoffwechsels       | 47    |
| Tab. 8:  | Korrelation zwischen Insulinspiegel und Gefäßeinbruch                                    | 48    |
| Tab. 9:  | Korrelationen mit den Adiponectinrezeptoren  | 49    |
| Tab. 10: | Korrelationen der Genexpression untereinander  | 51    |

## Abbildungsverzeichnis

|         |  |       |
|---------|--|-------|
| Abb. 1: | Schematische Darstellung der ER-gesteuerten und Liganden-unabhängigen Signaltransduktion | 5     |
| Abb. 2: | Proteinstruktur von ER $\beta$ 1 und ER $\alpha$   | 8     |
| Abb. 3: | Schematische Darstellung der mRNA des humanen ER $\beta$ 1 und seiner Isoformen          | 10/11 |
| Abb. 4: | Endogene Östrogenbiosynthese   | 12    |
| Abb. 5: | Vereinfachte Darstellung der Signalwege von IGF-I und IGF-2                              | 16    |
| Abb. 6: | Gewebeschnitt vor (a) und nach (b) Mikrodissektion                                       | 28    |
| Abb. 7: | Schema der Polymerase-Kettenreaktion nach Löffler  | 34    |
| Abb. 8: | Agarosegel mit 10 aufgetragenen Proben   | 37    |
| Abb. 9: | Altersverteilung der Patientinnen  | 39    |



|          |   |       |
|----------|---|-------|
| Abb. 10: | Schmelzkurven der untersuchten Oligonukleotide                          | 42/43 |
| Abb. 11: | Genexpression von ER $\alpha$ und STS im Vergleich                      | 44/45 |
| Abb. 12: | Zusammenhänge zwischen BMI und Tumoreinbruch in Blut- und Lymphgefäße   | 58    |
| Abb. 13: | Regulation des Insulinrezeptors in Normalgewebe und in Brustkrebsgewebe | 61    |

**Abkürzungsverzeichnis**

|                 |  |
|-----------------|--|
| AF-1            | Activation function 1                      |
| AF-2            | Activation function2                       |
| BMI             | Body Mass Index                            |
| Bp              | Basenpaare                                 |
| cDNA            | complementary DNA                          |
| CLM             | Cell line mix                              |
| COMT            | Catechol-O-Methyltransferase               |
| DBD             | DNA Binding Domain                         |
| DEPC            | Diethylpyrocarbonat                        |
| DHEA            | Dehydroepiandrosteron                      |
| DHEAS           | Dehydroepiandrosteron Sulfat               |
| DNA             | Desoxyribonukleinsäure                     |
| E1              | Östron                                     |
| E1S             | Östron Sulfat                              |
| E2              | 17 $\beta$ -Östradiol                      |
| ER              | Estrogen Receptor                          |
| GH              | Growth Hormone                             |
| GST             | Glutathion-S-Transferase                   |
| HBD             | Hormone Binding Domain                     |
| HOMA            | Homeostatic Model Assessment               |
| 17 $\beta$ -HSD | 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase   |
| IGF             | Insulin-like Growth Factor                 |
| IGFBP           | Insulin-like Growth Factor Binding Protein |
| IGF-1R          | Insulin-like Growth Factor-1 Receptor      |
| IGF-2R          | Insulin-like Growth Factor-2 Receptor      |
| IL-6            | Interleukin 6                              |
| INSR            | Insulinrezeptor                            |
| IRS-1           | Insulin Receptor Substrate 1               |
| MAPK            | Mitogen Activated Protein Kinase           |
| M6P             | Mannose 6-Phosphate Receptor               |
| mRNA            | messenger RNA                              |
| 4-OHEN          | 4-Hydroxyequilenin                         |
| PCR             | Polymerase Chain Reaction                  |

---

|              |                              |
|--------------|------------------------------|
| PI-3K        | Phosphatidylinositol-3Kinase |
| RNA          | Ribonukleinsäure             |
| RNase        | Ribonuklease                 |
| STS          | Steroid Sulfatase            |
| SULT         | Sulfotransferase             |
| TNF $\alpha$ | Tumornekrosefaktor           |

## 1 Einleitung

### 1.1 Risikofaktoren für Brustkrebs

Brustkrebs ist die häufigste maligne Erkrankung der Frau. In entwickelten Ländern erkrankt jede achte bis zehnte Frau bis zum 75. Lebensjahr an Brustkrebs. Bei Frauen zwischen dem 30. und 60. Lebensjahr ist das Mammakarzinom die häufigste Todesursache in der westlichen Welt (Hahn 2008). In Deutschland sterben nach Angaben der WHO jährlich ca. 17.000 Frauen an Brustkrebs (<http://data.euro.who.int>).

Eine Reihe an Faktoren, die das Brustkrebsrisiko beeinflussen, konnten in den letzten Jahrzehnten etabliert werden. Zu diesen Risikofaktoren zählen ein höheres Alter, der geographische und wirtschaftliche Lebensraum (USA und westliche Länder), positive Familienanamnese, Mutationen in den Genen BRCA1 und BRCA2, Exposition ionisierender Strahlung in der Kindheit sowie gutartige Erkrankungen der Brust in der Eigenanamnese. Ganz klar konnte gezeigt werden, dass die Dauer der Exposition gegenüber Östrogenen das Brustkrebsrisiko beeinflusst (Kuhl 2005; Okobia and Bunker 2005). So erhöht eine frühe Menarche (unter 12 Jahren) bzw. eine späte Menopause (Alter über 54 Jahre) das Risiko. Weiterhin haben Frauen ohne vollendete Schwangerschaft bis zum 35. Lebensjahr ein erhöhtes Brustkrebsrisiko (Tab.1).

Faktoren, die das Risiko nur geringfügig erhöhen, sind die Hormonersatztherapie, der Gebrauch von oralen Kontrazeptiva, Adipositas bei postmenopausalen Frauen und Alkoholkonsum.

**Tabelle 1: Bedeutung verschiedener Risikofaktoren für die Entwicklung von Brustkrebs (nach Dumitrescu et al. 2005)**

|                                 | Risikofaktoren für Brustkrebs                                | Erhöhung des Risikos | Literatur   |
|---------------------------------|--|----------------------|---|
| <b>Gesicherte Faktoren</b>      | Erhöhtes Alter   | ++                   | Hulka and Moorman (2001)  |
|                                 | Geographische Region   | ++                   | Parkin et al. (2005)  |
|                                 | Familienanamnese   | ++                   | Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (2001) |
|                                 | Mutationen in BRCA1 und BRCA2 Genen                          | ++                   | Easton et al. (1993)  |
|                                 | Mutationen in anderen Genen mit hoher Penetranz              | ++                   | Easton et al. (1993)  |
|                                 | Exposition gegenüber ionisierender Strahlung in der Kindheit | ++                   | Hulka and Moorman (2001)  |
|                                 | Gutartige Erkrankung der Brust in der Eigenanamnese          | ++                   | McPherson et al. (2000)   |
|                                 | Später Eintritt der Menopause                                | ++                   | Berkey et al. (1999)  |
|                                 | Frühes Alter der ersten Menarche                             | ++                   | Berkey et al. (1999)  |
|                                 | Nullipara oder spätes Alter bei der ersten Geburt            | ++                   | McPherson et al. (2000)   |
|                                 | Hohe Dichte der Brust in der Mammographie                    | ++                   | Byrne et al. (1995)   |
|                                 | Hormonersatztherapie   | +                    | Ross et al. (2000)  |
|                                 | Gebrauch oraler Kontrazeptiva                                | +                    | Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (2001) |
|                                 | Übergewicht bei postmenopausalen Frauen                      | +                    | Trentham-Dietz et al. (2000)                                    |
|                                 | Hohe Statur  | +                    | Lahmann et al. (2004)   |
|                                 | Alkoholkonsum  | +                    | Singleton et al. (2001)   |
| <b>Wahrscheinliche Faktoren</b> | Hohes Insulin-like growth factor 1 (IGF1) Level              | ++                   | Renehan et al. (2004)   |
|                                 | Hohes Prolaktin Level  | +                    | Hankinson et al. (1999)   |
|                                 | Hoher sozioökonomischer Status                               | +                    | Robert et al. (2004)  |
|                                 | Hoher Fleischkonsum  | +                    | Zheng et al. (1998)   |

Zu den aufgeführten Risikofaktoren ist Diabetes mellitus Typ 2 als Sonderfall hinzuzufügen. Die Prävalenz von Diabetes Typ 2 als Zustand erhöhter peripherer Insulinresistenz und dadurch erhöhten Blutzuckerspiegeln ist weltweit im Anstieg, weshalb diese Erkrankung in der Brustkrebsentstehung und Progression immer mehr an Bedeutung gewinnt. Eine schwedische Studie mit 80.000 Frauen konnte nachweisen, dass Patientinnen mit Typ 2 Diabetes ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Mammakarzinoms verglichen zur Normalbevölkerung haben (Weiderpass et al. 1997). Für die Entwicklung von Diabetes sind neben genetischen Faktoren vor allem „life style“ Parameter und hier im Besonderen die Adipositas, verantwortlich. Diabetes mellitus Typ 2 könnte somit die Verbindung zwischen Übergewicht und erhöhter Inzidenz von Krebserkrankungen herstellen.

Adipositas ihrerseits beeinflusst das Krebsrisiko aber auch die Prognose und die Mortalität von Krebserkrankungen. In einer von Calle et al. (2003) durchgeführten prospektiven Studie an 900.000 Männern und Frauen, zeigte sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen Adipositas und der Mortalität an malignen Tumoren, einschließlich Brustkrebs.

Zur Erklärung dieses Zusammenhangs wurde u. a. der Einfluss von Hormonen herangezogen. Da sowohl maligne Tumore der Fortpflanzungsorgane als auch andere Organe, wie Kolon-, Pankreas-, Gallenblasen-, Nieren-, Leber- und Ösophaguskarzinome durch Übergewicht nachteilig beeinflusst werden, spielen weitere Faktoren eine gewichtige Rolle (Boyd 2003). So könnte beispielsweise die Effektivität von Screeningmethoden bei Übergewicht verringert sein und zusätzlich könnte die Möglichkeit der Unterdosierung von Chemotherapeutika für die schlechtere Prognose von übergewichtigen Personen verantwortlich sein.

## **1.2 Stand der Forschung**

Adipositas wurde in der Literatur bereits vielfach als Risikofaktor und ungünstiger Prognosefaktor beschrieben (Calle et al. 2003; Boyd 2003). Diabetes Typ 2 ist eine häufige Folge von Übergewicht und geht mit erhöhten Insulinspiegeln einher. Insulin ist jedoch nicht nur für die Glukosehomöostase entscheidend, sondern spielt gleichzeitig bei anabolen Prozessen eine wichtige Rolle. Insulin kann jedoch nicht für sich alleine wirken, sondern ist in ein Netzwerk von Liganden, Rezeptoren und Bindeproteinen

eingebunden. Über unterschiedliche Signalwege können antiapoptotische Wirkungen eintreten.

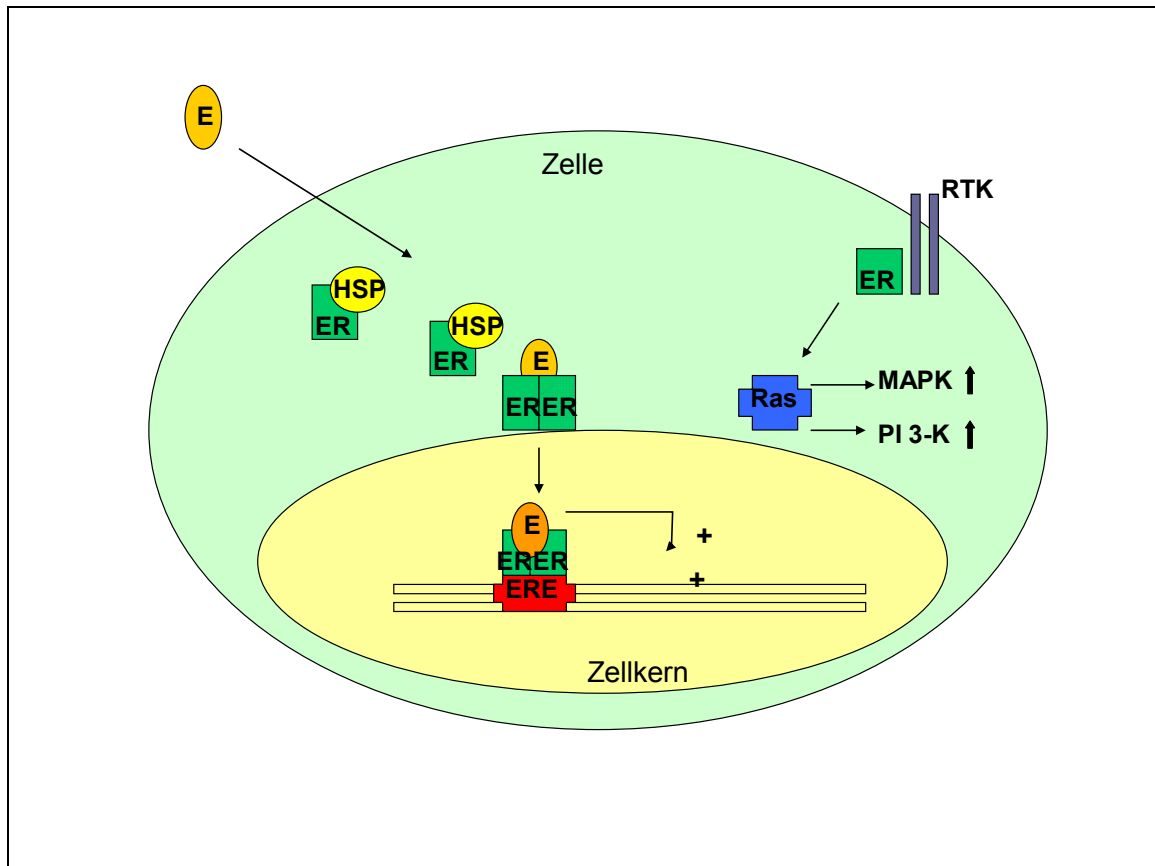
Ebenso wie der Insulinspiegel ist auch der Östrogenspiegel bei postmenopausalen Frauen indirekt von der Fettgewebssmasse beeinflusst. Da bei Frauen nach der Menopause die ovarielle Östrogenproduktion sistiert, stellt das Fettgewebe den Hauptproduktionsort dieses wichtigsten Geschlechtshormons dar. Die für die Östrogensynthese wichtigsten Enzyme (CYP 19, STS und 17 $\beta$ -HSD) sind daher ebenso Gegenstand der Forschung, wie die verschiedenen Rezeptoren, über die Östrogene ihre Wirkung entfalten können. Im Zusammenhang mit Brustkrebs stellt der Östrogenrezeptor einen wichtigen Faktor sowohl für die Prognose als auch als therapeutisches Ziel dar. Während im gesunden Organismus dieser Rezeptor bei 6-10% der Epithelzellen des Brustgewebes exprimiert wird, sind bis zu 60% der primären Mammakarzinome Östrogenrezeptor positiv (Dickson and Lippmann 1988).

Deshalb wird der karzinogene Effekt von Östrogenen und Wirkmechanismus, Struktur und Splice-Varianten der Östrogenrezeptoren näher erläutert.

### **1.3 Wirkmechanismus der Östrogenrezeptoren**

Östrogenrezeptoren kommen sowohl intrazellulär, als auch membranständig vor. Diese beiden Rezeptortypen können über verschiedene Wege ligandenabhängig oder ligandenunabhängig aktiviert werden.

Östrogen kann aufgrund seiner Struktur frei durch die Zellmembran diffundieren. Im Zytoplasma bindet es an den Östrogenrezeptor, wodurch eine allosterische Änderung erzielt wird. Dadurch wird die Verbindung mit einem Hitzeschockprotein, welches den Rezeptor vorher blockiert hat, aufgelöst, das Protein dissoziiert ab und der Rezeptor gelangt in den Zellkern, wo er sich zu Dimeren formiert, die es dem Hormon-Rezeptor-Komplex erlauben, an ihr spezifisches Ziel an der DNA zu binden, dem „estrogen response element“ (ERE; Abbildung 1).



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der ER-gesteuerten und ligandenunabhängigen Signaltransduktion. Östradiol diffundiert durch die Zellmembran und bindet an ER. Die Bindung von Östrogenen führt zur Abdissoziierung von Hitzeschockproteinen, mit anschließender ER-Dimerisierung. Die ER-Dimere steuern als liganden-abhängige Transkriptionsfaktoren die Genregulation durch spezifische Bindung an ERE der Zielgene. Rechts im Bild ist die liganden-unabhängige Transkriptionsaktivierung durch membranständige Tyrosinkinase dargestellt. E= Östrogen, ER= Östrogenrezeptor, ERE= Estrogen Response Element, HSP= Hitzeschockprotein, MAPK= Mitogen aktivierte Protein Kinase, PI3K= Phosphatidylinositol-3Kinase, RTK= Rezeptor Tyrosin Kinase (nach Mitter et al. 2005).

Diese Bindung an das Estrogen response element (ERE) führt umgehend zur Transkriptionsaktivierung östrogenabhängiger Gene (Hanstein et al. 2004).

Ein weiterer Weg über den Östrogene ihre Funktion ausüben, besteht in der schnellen Aktivierung, welche nicht über Transkriptionsaktivierung, sondern über membranständige Rezeptoren übermittelt wird (siehe Abbildung 1; rechts im Bild). Nach Aktivierung der Tyrosinkinase wird eine Signalkaskade angestoßen, in der Ras, eine monomere GTPase angeregt wird. Ras unterstützt die Signalausendung von der Zelloberfläche zu anderen Zellbereichen. Es wird oft gebraucht, um Zellproliferation oder Differenzierung durch Änderung der Genexpression anzuregen. Ras bleibt solange aktiv wie GTP



gebunden ist. Dadurch werden die mitogen aktivierte Proteinkinase (MAP-Kinase) und die Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI 3-Kinase) aktiviert.

Die MAP-Kinase kann daraufhin in den Kern eintreten, wo sie Komponenten eines Genregulatorkomplexes, und somit die Transkription bestimmter Gene induziert. Als zweites aktiviert Ras jedoch auch die PI-3 Kinase, wodurch ein Signalweg angeregt wird, der Zellen zum Wachstum anregt. Auf diese Weise werden über den MAP/PI-3 Kinase Signalweg die Apoptose gehemmt und die Zellen zur Teilung gebracht.

Die Auswirkungen dieses Signalweges zeigen sich unter anderem darin, dass bei 30% aller Menschen mit Tumoren Mutationen mit hyperaktivem Ras nachweisbar sind (Alberts et al. 2004).

#### **1.4 Karzinogener Effekt von Östrogenen**

Der gerade beschriebene ER Signaltransduktionsweg mit erhöhter Zellproliferation und verminderter Apoptose (Abbildung 1) ist jedoch nur eine Möglichkeit, über die Östrogene ihre kanzerogene Wirkung bei Langzeitexposition ausüben (Yue et al. 2003).

Eine weitere Möglichkeit wird von Yager and Davidson (2006) beschrieben und besteht über Metabolite des Hormons, die im Östrogen Metabolismus entstehen.

An der Phase I des Östrogen Metabolismus sind verschiedene Cytochrom P450 Enzyme beteiligt, die vor allem den oxidativen Abbau von Östrogenen katalysieren (Jefcoate et al. 2000). In Anwesenheit spezifischer Cytochrom P450 Enzyme findet in humanem Brustgewebe Östrogenabbau statt. Der oxidative Metabolismus von 17 $\beta$ -Östradiol (E2) zu Östrogen-3,4 Quinonmetaboliten wird durch die E2-4-Hydroxylase, die im Brustgewebe lokalisiert ist, katalysiert (Jefcoate et al. 2000). Östrogen-3,4-Quinonmetabolite sind selbst direkt genotoxisch und können mit Adenin und Guanin instabile Verbindungen eingehen, die zu Punktmutationen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* führen (Cavalieri 2000).

In der folgenden Phase II des Östrogenmetabolismus - wozu Sulfatierung, Methylierung und Reaktionen mit Glutathion zählen – finden entgiftende Reaktionen statt, die protektiv gegenüber endogenen und exogenen Karzinogenen wirken (Yue et al. 2003).

Enzyme der Phase II sind beispielsweise die Catechol-O-Methyltransferase (COMT) und die Glutathion-S-Transferase (GST). Diese primär schützenden Enzyme können jedoch über 4-Hydroxyequilenin (4-OHEN), einem reaktiven Metaboliten von Equilenin, das in Hormonersatztherapien vorkommt, gehemmt werden (Yao et al. 2003). Durch

diese zwei Prozesse: erhöhte Zellproliferation durch Östrogene und genotoxische Metabolite, könnte auf additive oder synergistische Weise der Tumor induzierende Effekt von Östrogenen entstehen (Yue et al.2003).

### 1.5 Struktur der Östrogenrezeptoren

Für die erhöhte Zellproliferation durch Östrogene ist jedoch zunächst einmal das Zusammenspiel von Substrat und Rezeptor notwendig. Um dies nachvollziehen zu können wird im Folgenden die Struktur der Östrogenrezeptoren erläutert. Östrogenrezeptoren bestehen aus 6 funktionellen Domänen, die mit den Buchstaben A bis E gekennzeichnet sind (Abbildung 2).

Die A/B Region am N-terminalen Ende des Proteins enthält die Funktion der hormonunabhängigen Transkriptionsaktivierung, AF1, die auch in Abwesenheit eines Liganden ihre Funktion durchführen kann (Kumar et al.1986). Kato et al. (1995) konnten eine Phosphorylierung der AF-1-Domäne des Östrogenrezeptors über die MAP-Kinase nachweisen. Damit wird die Aktivierung des Östrogenrezeptors über Wachstumsfaktoren der MAP-Kaskade beeinflusst.

Die folgende C-Domäne wurde als DNA-bindende Region (DBD) identifiziert. Der als D- oder auch „hinge“ (Gelenk)-Region bezeichnete nächste Abschnitt ist möglicherweise an der Unterdrückung der steroidvermittelten Transkription beteiligt (Adler et al. 1988).

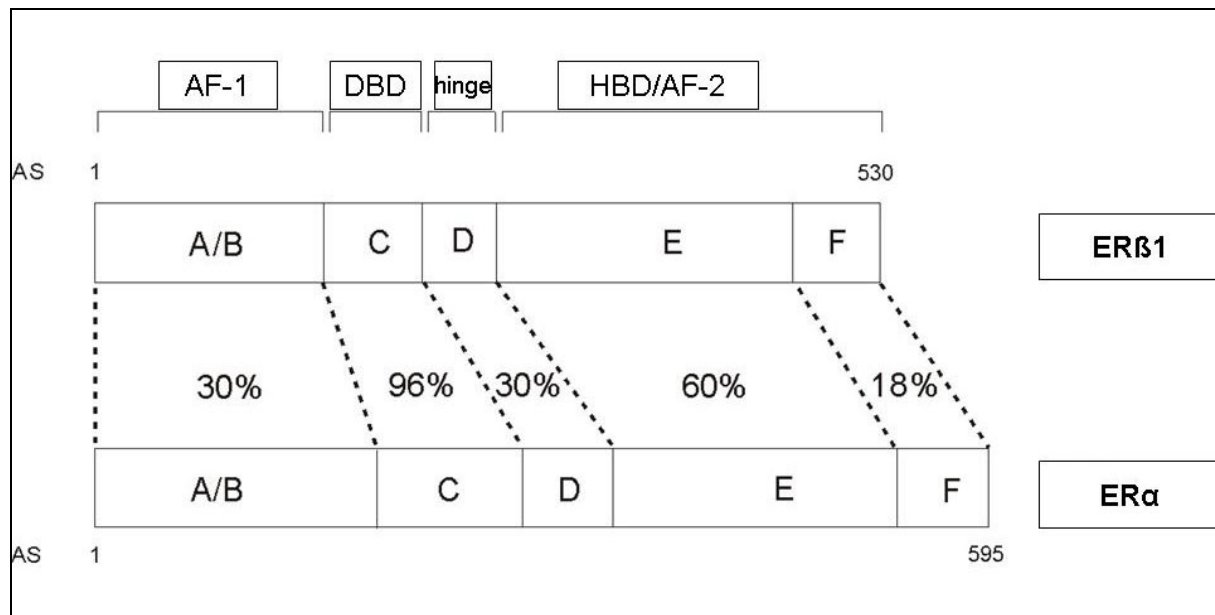
Als weiterer funktioneller Abschnitt konnte die „ligand-binding-domain“ (Region E) identifiziert werden. Diese Domäne besteht aus 251 AS in  $\alpha$ -Helices mit komplexen Funktionen, wie Hormonbindung, Bindung von Hitzeschockproteinen und Ausbildung von ER-Dimeren (Mangelsdorf et al.1995). Die „ligand-binding-domain“ wird von der AF-2 Domäne teilweise überlappt. Aufgabe der AF-2 Domäne ist wahrscheinlich die ligandenabhängige Transkriptionsaktivierung (Durand et al. 1994).

Das C-terminale Ende des Östrogenrezeptors besteht aus Region F mit 42 Aminosäuren.

## 1.6 Verschiedene Isoformen der Östrogenrezeptoren

Diese gerade beschriebene Struktur der Östrogenrezeptoren ist jedoch kein allgemein gültiges Muster. Durch die Komplexität der verschiedenen Signalwege, die durch Östrogene angeregt werden, ist das Vorkommen vieler unterschiedlicher Varianten der Rezeptoren zu erklären. Seit der Entdeckung und Charakterisierung des Östrogenrezeptors in den sechziger Jahren (Toft und Gorski 1966), wurde intensive Forschungsarbeit geleistet, deren Höhepunkt die Entdeckung des Östrogenrezeptor  $\beta$  und seiner Splice-Varianten darstellt (Levin 2001).

ER $\alpha$  und ER $\beta$  haben in ihrer DNA bindenden Domäne 96% identische Aminosäuresequenz (Abbildung 2), wogegen in der Liganden bindenden Domäne nur 56% Homologie besteht (Yager et al. 2006). Hieraus lassen sich sowohl Unterschiede in ihrer Affinität für bestimmte Liganden und in ihrer Interaktion mit verschiedenen Cofaktoren, als auch unterschiedliche Funktionen bezüglich der Zellproliferation erklären (Tremblay et al. 1997).



**Abbildung 2:** nach Mitter et al. (2005) Proteinstruktur von ER  $\beta$ 1 (Wildtyp) und ER $\alpha$ . ER  $\beta$ 1 besteht aus 530 Aminosäuren (AS), ER  $\alpha$  aus 595 AS. Die funktionellen Domänen A bis F sind mit dem Grad an prozentualer Übereinstimmung schematisch dargestellt.

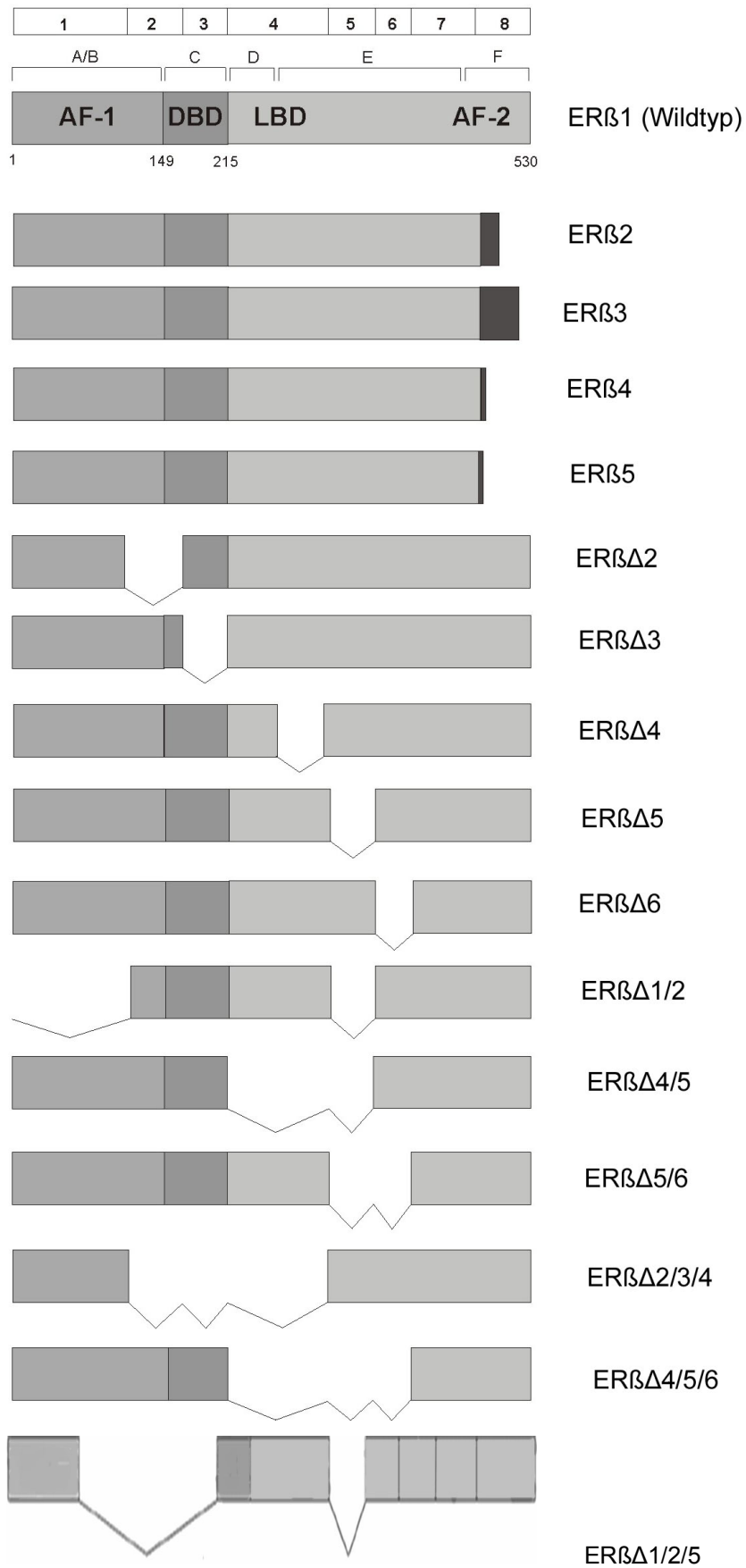
AF-1= activation function 1; DBD= DNA-Bindungsdomäne; LBD= Ligandenbindungsdomäne; AF-2= activation function 2

Diese Differenzen legen nahe, dass beide Rezeptoren unterschiedliche Funktionen bezüglich Genregulation ausüben und verschiedene Reizantworten hervorrufen können (Gustavsson and Warner 2000). So konnte in mehreren Studien eine Abnahme von ER $\beta$  mRNA in Tumorgewebe verglichen zu Normalgewebe nachgewiesen werden (Pujol et al. 1998; Roger et al. 2001). Die Ratio ER $\alpha$ / ER $\beta$  ist jedoch im Tumorgewebe erhöht, was darauf hindeutet, dass spezifische Signalwege für beide Rezeptoren bestehen (Leygue et al. 1998).

Darüber hinaus konnten Roger et al. (2001) eine inverse Korrelation von ER $\beta$  mit Ki67, einem Marker der Zellproliferation nachweisen, woraus Bardin et al. (2004) schließen, dass dieser Rezeptor einen Schutzmechanismus gegen die mitogene Aktivität von Östrogenen in Tumorstadien der Mamma darstellt.

Zusammengefasst nimmt die Konzentration von ER $\beta$  während der Entwicklung von Brustkrebs ab und der Verlust der Expression von ER $\beta$  ist ein wichtiges Kennzeichen der Tumorgenese (Bardin et al. 2004). ER $\beta$  kommt jedoch in verschiedenen Mutationen und Splice-Varianten vor (siehe Abbildung 3), so dass für diesen Rezeptor keine pauschalen Aussagen getroffen werden können, ohne die Bedeutung der Unterschiede zwischen den einzelnen Formen zu kennen. Neben ER $\beta$ 1 kommen ER $\beta$ 2, ER $\beta$ 5 und Varianten mit unterschiedlichen Deletionen vor, die aber bislang noch nicht als Ursache von Krankheitsgeschehen identifiziert werden konnten. Die meisten der bislang identifizierten Splice-Varianten sind entweder durch alternative 3'-Exons gekennzeichnet, wie zum Beispiel ER $\beta$ 2, ER $\beta$ 3, ER $\beta$ 4 und ER $\beta$ 5 oder sie unterscheiden sich durch den Verlust eines oder mehrerer Exons. Als Beispiele hierfür sind ER $\beta$  $\Delta$ 2 (entspricht ER $\beta$ cx), ER $\beta$  $\Delta$ 1/2/5 oder ER $\beta$  $\Delta$ 5/6 zu nennen (Treeck et al. 2007; Abbildung 3).

# ERβ Isoformen



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der mRNA des humanen ER $\beta$ 1 (Wildtyp) und seiner Isoformen. Das ER $\beta$ -Gen ist aus 8 Exons aufgebaut. Die verschiedenen Deletionsvarianten zeichnen sich durch den Verlust eines oder mehrerer Exons aus (nach Mitter et al. 2005).**

## 1.7 Östrogenbiosynthese

Nach der Beschreibung der unterschiedlichen Rezeptortypen, die für die unterschiedlichen Östrogenwirkungen verantwortlich sind, soll nun die Herkunft des Substrats, das Östrogen selbst, untersucht werden. Wie bereits anfangs erwähnt, erkrankt in den entwickelten Ländern jede achte bis zehnte Frau an Brustkrebs. Steigendes Alter gilt als einer der wichtigsten Risikofaktoren für die Malignomentwicklung. Dennoch besteht die höchste Inzidenz der Erkrankung postmenopausal, wenn die ovarielle Hormonproduktion bereits geendet hat (Reed et al. 2005). Obwohl die Plasmakonzentrationen der Östrogene postmenopausal viel geringer sind, als vor der Menopause, sind die Level im Tumorgewebe bei beiden Altersgruppen gleich hoch (Thijssen and Blankenstein 1989). Für die Herkunft des Östrogens bestehen zwei grundsätzlich verschiedene Möglichkeiten: zum einen die Aufnahme aus der Zirkulation, zum anderen die *in-situ* Synthese aus Vorstufen (Abbildung 4; Reed et al. 2005). Dieser Vorgang der Synthese geschieht bei postmenopausalen Frauen zum großen Teil durch die Umwandlung von Androstendion in Östron (E1) durch den Aromatase Enzymkomplex (Reed et al. 1979). Das gebildete E1 kann daraufhin über die 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase (17 $\beta$ -HSD) in das potentere Östradiol (E2) umgewandelt werden. Ein großer Teil des so produzierten E1 kann über Sulfotransferasen (SULT) in Östron Sulfat umgewandelt werden (Strott 2002). Durch diese Sulfatierung wird Östrogen hydrophil und kann nicht mehr an den Östrogenrezeptor binden. Erst über die Aktivität der Steroid Sulfatase kann das Molekül wieder zu E1 umgewandelt werden, das wiederum eine Vorstufe von E2 darstellt.

Alle drei für die Östrogensynthese wichtigen Enzyme (CYP19, STS und 17 $\beta$ -HSD) wurden in malignem Brustgewebe nachgewiesen, Aromatase jedoch nur in 40-60% der Fälle, STS dagegen in nahezu allen Proben (James et al. 1987). Im Folgenden soll auf diese drei Enzyme im Einzelnen eingegangen werden.

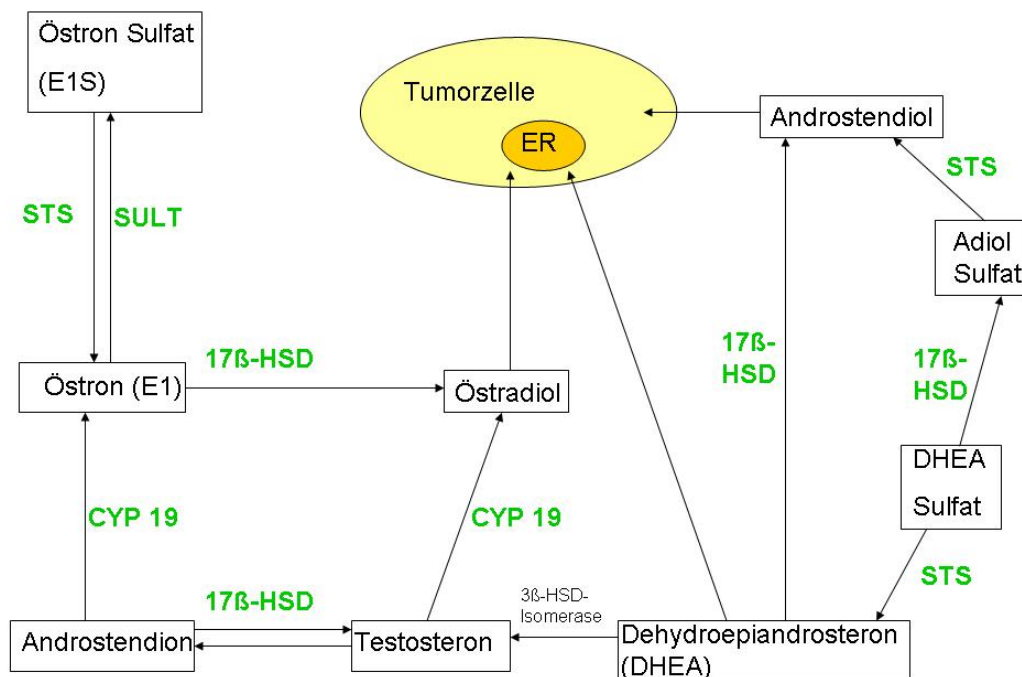


Abbildung 4: Endogene Östrogenbiosynthese (nach Reed et al. 2005)

**Cytochrom P450 Aromatase (CYP 19):** Die P450 Aromatase (CYP 19) ist der Cytochrom P450 Superfamilie zugehörig, die über 460 Enzyme umfasst. Cytochrome P450 sind eine Gruppe von Enzymen, die in Phase-I-Reaktionen den Einbau von Sauerstoff in lipophile Substanzen katalysieren (Karow and Lang-Roth 2005).

P450 Aromatase im speziellen katalysiert die Umwandlung von Testosteron zu Östrogen, von Androstendion zu Östron und von 16α-Hydroxydehydroepiandrosteron zu Östriol und somit den letzten Schritt der Östrogensynthese, die Umwandlung von Androgenen zu Östrogenen (Sasano and Harada 1998). Das Enzym wird von einem einzigen Gen, dem CYP19 Gen, codiert, welches auf Chromosom 15q21.2 liegt. Das humane CYP19 Gen umfasst 123kb mit einer codierenden Region von 30kb (9 Exons; Meinhardt and Mullis 2002) und einer 93kb umfassenden regulierenden Region.

Nach der Menopause findet die Östrogenproduktion hauptsächlich im subkutanen Fettgewebe statt, weshalb die Aktivität der peripheren Aromatase und der Plasma Östrogenspiegel positiv mit dem Body Mass Index korrelieren (Longcope et al. 1986). Während der Menopause fallen die durchschnittlichen Plasma Östrogen Level von ungefähr 110pg pro Milliliter auf circa 7pg pro Milliliter. Der Östrogenspiegel im Brustkrebsgewebe ist jedoch fast zehnmal höher als im Plasma (Thijssen and Blankenstein

1989). Dieser hohe Spiegel ist sicherlich zum Teil durch die Anwesenheit von Aromatase im Tumorgewebe bedingt, da dieses Enzym in zwei Drittel aller Karzinome der Brust enthalten ist und somit lokal im Tumorgewebe signifikante Mengen von Östrogen synthetisiert werden können (Santen et al. 1994).

Hemmung der Aromatase ist ein wichtiger therapeutischer Ansatz um die Wachstum stimulierenden Effekte von Östrogenen bei Östrogen abhängigen Tumoren vor allem bei postmenopausalen Frauen zu reduzieren.

**17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase (17 $\beta$ -HSD):** Wie in Abbildung 4 dargestellt, besitzen die meisten Mammakarzinome ein effizientes Enzymsystem für die *in situ* Produktion von Östrogenen aus im Blut zirkulierenden Vorstufen. Unter ihnen sind verschiedene Isoformen von 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Sulfatasen, die den letzten Schritt der Umwandlung von Androgenen zu Östrogenen kontrollieren (Labrie et al. 1997).

17 $\beta$ -HSD Typ 1 benutzt dabei NADPH als Cofaktor, um die Reaktion des schwach wirksamen Östrogen E1 in das stärker potente E2 zu katalysieren. 17 $\beta$ -HSD Typ2 dagegen braucht NAD<sup>+</sup> für die Oxidation von Testosteron und E2 zu Androstendion und E1 (Miettinen et al. 1996). Somit kooperieren beide Enzyme um die Level von E2 zu regulieren, wobei Reduktion von E1 zu E2 in malignen Tumoren der Brust vorherrscht und Oxidation von E2 zu E1 in normalem Brustgewebe überwiegt (Speirs et al. 1999). Beim Vergleich der beiden Isoformen wurde 17 $\beta$ -HSD Typ 1 in 61% der untersuchten dukталen Mammakarzinome nachgewiesen, wogegen Typ 2 in keinem der Fälle gefunden werden konnte (Suzuki et al. 2000). Typ 2 dagegen wurde in einer weiteren Studie in allen untersuchten Proben von normalem Brustgewebe und in 31% der ER-negativen Tumoren nachgewiesen (Gunnarsson et al. 2001).

Der Verlust von 17 $\beta$ -HSD Typ 2 könnte also zu einem signifikanten Anstieg des potenteren E2 führen, was wiederum einen wichtigen Mechanismus der Pathogenese von ER positivem Brustkrebs darstellt.

**Steroid Sulfatase (STS):** Als letztes Enzym der Östrogenbiosynthese soll auf die Steroid Sulfatase (STS) eingegangen werden, einem Mitglied einer Superfamilie von 12 verschiedenen, bei Säugern vorkommenden, Sulfatasen (Bond et al. 1997).



Steroid Sulfatase katalysiert zwei verschiedene Enzymreaktionen, die für die Entstehung und die Prognose von Brustkrebs eine Rolle spielen können.

Eine davon ist die Hydrolyse von Östron Sulfat (E1S) zu Östron (E1). Da die Plasmakonzentration von Östron Sulfat viel höher als die Konzentration von unkonjugiertem Östrogen ist und die sulfatierte Form durch Bindung an Albumin eine erhöhte Halbwertszeit hat, wird von Reed et al. (2005) die These vertreten, diese Form als Reservoir anzusehen, von dem über STS jederzeit die benötigte Menge an Östrogen hergestellt werden kann. Von Santner et al. (1984) wurde belegt, dass zehnmal mehr E1 aus E1S entsteht, als aus Androstendion unter Mitwirkung der Aromatase. Hierdurch erhält STS eine grundlegende Rolle in der Regulation der Östrogenproduktion.

Eine weitere von STS katalysierte Reaktion besteht in der Hydrolyse von Dehydroepiandrosteron Sulfat (DHEAS) zu Dehydroepiandrosteron (DHEA) (Reed et al. 2005). DHEAS wird in der Nebennierenrinde synthetisiert und zu 75% im peripheren Gewebe zu DHEA umgewandelt (Kroboth et al. 1999). Nach Entfernung der Sulfatgruppe durch STS kann DHEA weiter zu Androstendiol reduziert werden. Androstendiol kann daraufhin an den Östrogenrezeptor binden. Die Affinität für diesen Rezeptor ist geringer als die von Östrogen. Da jedoch die Plasmakonzentrationen von Androstendiol bei postmenopausalen Frauen circa 100-fach höher als die von Östrogen sind, wird ihm von Bonney et al. (1984) eine ebenso hohe Potenz bei dieser Gruppe wie Östrogen zugesprochen. In neueren Studien zeigte sich, dass DHEA auch direkt, ohne vorherige Reduzierung zu Androstendiol, den Östrogenrezeptor aktivieren und somit die Proliferation von Brustkrebszellen stimulieren kann (Maggiolini et al. 1999).

Bei der Untersuchung der Expression von STS mRNA durch RT-PCR zeigten sich deutlich höhere Level in malignem Brustgewebe (1458 amol/mg RNA) im Gegensatz zu normalem Gewebe mit 536 amol/mg RNA (Utsumi et al. 2000).

Weiterhin stellte sich die Expression von STS mRNA auch als prognostischer Faktor für rezidivfreies Überleben dar, indem hohe Expressionslevel mit schlechter Prognose assoziiert waren (Utsumi et al. 1999).

Weder STS noch die anderen beschriebenen Enzyme der Östrogenbiosynthese können jedoch im Einzelnen die kanzerogene Wirkung der Östrogene bedingen, sondern das Zusammenspiel vieler Faktoren ist notwendig. Nicht außer Acht gelassen werden darf auch das Ausmaß, in dem die gerade beschriebenen Abläufe stattfinden. Hier soll im Folgenden auf das Fettgewebe, dem Hauptbildungsort von Östrogenen in der Postmenopause, eingegangen werden.

### 1.8 Adipositas im Zusammenhang mit Brustkrebs

Neben der Östrogenexposition ist Fettleibigkeit einer der wichtigsten Risikofaktoren für Brustkrebs. Adipositas ist ein weltweites Problem, das Risiko und Prognose einiger häufiger Krebsformen verändert; so waren beispielsweise bei amerikanischen Frauen im Jahr 2003 schätzungsweise 20% aller Todesfälle durch Krebs mit extrem erhöhtem Körpergewicht verbunden (Calle et al. 2003). Bei stark übergewichtigen Frauen wird zudem durch erschwerte Untersuchungsbedingungen die Diagnose öfter erst im bereits metastasierten Stadium gestellt, wodurch sich allgemein eine schlechtere Prognose gegenüber normal gewichtigen Frauen ergibt (Harvie et al. 2003).

Für diese Assoziation stehen generell zwei Erklärungsmöglichkeiten zur Verfügung:

Zum einen endet nach der Menopause die ovarielle Östrogenproduktion und sämtliches zirkulierende Östrogen wird in den Stromazellen des Fettgewebes durch Aromatisierung von Androstendion synthetisiert, einem relativ schwachem Androgen, das darauf hin in das potentere Östradiol umgewandelt wird (Bulun et al. 1994). Durch vermehrtes Fettgewebe ist bei adipösen Frauen sowohl die Produktion von Androstendion als auch dessen Umwandlung in Östradiol erhöht, was sich auch an erhöhten Plasma Östrogen Konzentrationen zeigt (Rose et al. 2004).

Die Hauptaufgabe des Fettgewebes besteht in der Speicherung überschüssig aufgenommener Energie, jedoch erfüllt es gleichzeitig die Aufgabe eines endokrinen Organs, wie oben bereits im Fall der extraglandulären Östrogensynthese angesprochen wurde. Die Östrogenproduktion ist hierbei nur eines von vielen Beispielen, von im weißen Fettgewebe hergestellten Hormonen, Enzymen und Wachstumsfaktoren (Pfeiler et al. 2006).

Ein erhöhter BMI, also erhöhte Körperfettmasse, konnte jedoch auch unabhängig vom Östrogenspiegel als Risikofaktor für die Entwicklung von Brustkrebs eruiert werden. Neben der erhöhten peripheren Östrogensynthese müssen also weitere Mechanismen an der engen Korrelation zwischen erhöhtem Körpergewicht und Auftreten von Brustkrebs beteiligt sein.

Boyd (2003) sieht die Hyperinsulinämie als Folge von Adipositas als Bindeglied zwischen erhöhter Körperfettmasse und Tumorkommen. Insulin stellt zusätzlich zu seiner Bedeutung in der Glukosehomöostase ein entscheidendes Hormon bei anabolen Prozessen dar und ist in frühes Wachstum und Entwicklung mit einbezogen (Nakae et al. 2001).

## 1.9 Struktur des Insulin/ IGF-Systems

Das Insulin/ IGF- System erfüllt eine Vielzahl von verschiedenen Funktionen im gesunden Gewebe, einschließlich dem Brustgewebe. Es umfasst ein kompliziertes Netzwerk von Liganden (IGF-1 und 2), ihren jeweiligen Rezeptoren (IGF-1R, IGF-2R), den IGF-Bindeproteinen (IGFBPs) und IGFBP- Proteasen, eine schematische Übersicht hierzu zeigt Abbildung 5.

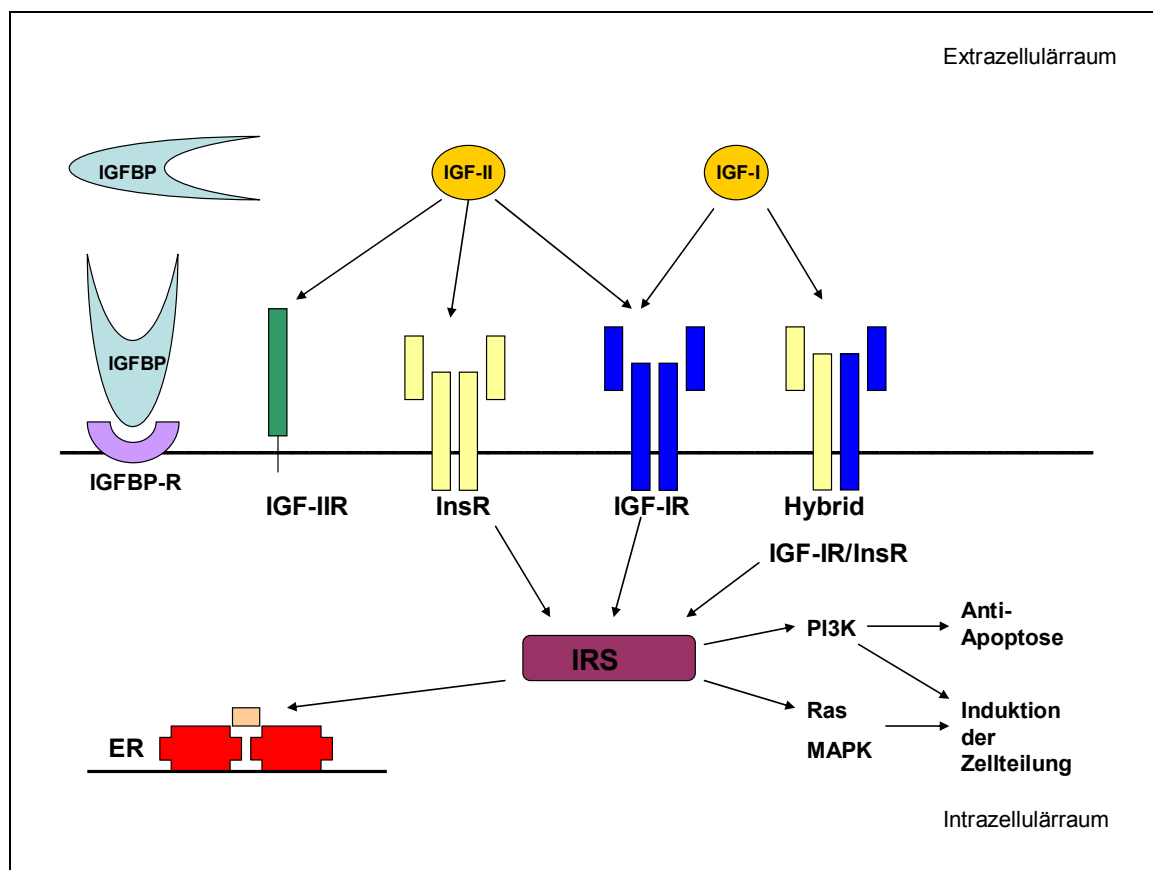


Abbildung 5: vereinfachte Darstellung der Signalwege von IGF-1 und IGF-2 (nach Sachdev und Yee 2001)

Die Familie der IGFs wurde auf der Suche nach Faktoren entdeckt, die den stimulierenden Effekt des Wachstumshormons (Growth Hormone; GH) regulieren können. Bei genauerer Nachforschung ergaben sich zwei IGFs aus unterschiedlich langen Aminosäureketten; IGF-1 besteht aus 70 Aminosäuren, IGF-2 aus 67 (Rinderknecht and Humbel 1976), beides sind Einzelkettenpolypeptide von 7,5 kD mit hoher strukturellen Ähnlichkeiten zu Insulin (Hamelers and Steenbergh 2003). Die Hauptfunktion der IGFs besteht darin, als Effektormolekül von Wachstumshormonen zu agieren, die

für die normale Entwicklung unerlässlich sind. Normalerweise besteht ein negativer Regelkreis zwischen diesen beiden Hormonen und dem Wachstumshormon; wobei freies IGF die Sekretion von GH unterdrückt (Chapman et al. 1998).

Der größte Anteil von zirkulierendem IGF ist jedoch nicht frei verfügbar, sondern in einem Komplex an IGF-Bindeproteine (IGFBPs) gebunden, die eine regulierende Rolle spielen, da sie Einfluss auf die Hormon-Rezeptorinteraktion haben (Helle 2004).

Die Familie der IGFBPs enthält sechs verschiedene Proteine (IGFBP1-6), die eine hohe Affinität für IGFs aufweisen und mehrere IGFBP-ähnliche Proteine (IGFBP related proteins) mit geringerer Affinität für diese Wachstumsfaktoren. Die Expression der IGFBPs auf Transkriptionsebene wird über Steroidhormone, Wachstumsfaktoren und Zytokine geregelt (Hamelers and Steenbergh 2003).

### **1.10 Wirkmechanismus des Insulin/IGF-Systems**

Sowohl Insulin als auch IGF-1/2 können den Insulinrezeptor und den IGF-1 Rezeptor aktivieren und dadurch eine Hochregulation des „insulin response substrate-1“ (IRS-1) bewirken, was wiederum eine Aktivierung der MAP-Kinase und der PI 3-Kinase auslöst (Boyd 2003; Abbildung 5). Beide Kinasen sind wichtig für die Entwicklung und Proliferation von verschiedenen malignen Tumoren beim Menschen (Achiwa et al. 2007).

Bislang wurden zwei verschiedene IGF-Rezeptoren beschrieben, IGF-1R und IGF-2/6Man-P-Rezeptor. Während der IGF-2R spezifisch nur IGF-2 bindet, bindet der IGF-1R sowohl IGF-1 als auch IGF-2, wenn auch die Affinität für IGF-1 größer ist, weshalb auch die meisten physiologischen Effekte über den IGF-1 Rezeptor vermittelt werden. Sind die IGFs jedoch nicht frei zirkulierend im Plasma, sondern wie üblich an IGFBPs gebunden, können sie nicht an ihren spezifischen Rezeptor binden, wodurch ihr mitogener Effekt verhindert wird. IGF-1 ist hierbei vor allem in einem heterotrimären Komplex an IGFBP-3 und eine säureinstabile Untereinheit (acid-labile subunit ALS) mit langer Halbwertszeit gebunden.

### **1.11 Beeinflussung des Zusammenhangs zwischen Brustkrebs und Adipositas durch den menopausalen Status**

Übergewicht und die damit verbundene erhöhte Inzidenz von Diabetes Typ 2 mit gestörtem Insulin/IGF-System erhöhen das Brustkrebsrisiko auf vielfältige Weise. Nach Klärung von Struktur und Wirkmechanismus des Insulin/IGF-Systems und der Auswirkung von Adipositas wurden Unterschiede zwischen Fettleibigkeit bei prä- und postmenopausalen Frauen bezüglich der Tumorentwicklung untersucht. Wie in Tabelle 1 aufgeführt, bedeutet erhöhter BMI eine Erhöhung des Karzinomrisikos bei postmenopausalen Frauen. Viele Studien haben aber einen signifikanten Unterschied gegenüber prämenopausalen Frauen festgestellt (Cleary and Maihle 1997, Kandiah and Tan 2004). In einer Analyse von sieben prospektiven Kohortenstudien durch van den Brandt et al. (2000), die Körpergröße, Gewicht und menopausalen Status mit einbeziehen, zeigt sich eine klare positive Korrelation zwischen BMI und Brustkrebsrisiko bei postmenopausalen Frauen, jedoch eine inverse Korrelation bezüglich BMI und der Entwicklung von Brustkrebs bei prämenopausalen Frauen, vor allem ab einem BMI über 31kg/m<sup>2</sup>.

### **1.12 Bedeutung von Adiponectin**

Nachdem die Auswirkungen von Übergewicht auf vielfältige Weise untersucht worden war und auch zwischen prä- und postmenopausalen Frauen unterschieden wurde, wurde auch das Fettgewebe selbst Gegenstand vieler Studien.

Traditionell als Energie speicherndes Organ betrachtet, hat sich im letzten Jahrzehnt seine Rolle als endokrines Organ abgezeichnet (Ahima and Flier 2000). Bei der systematischen Analyse aktiver Gene im Fettgewebe fand sich eine hohe Frequenz sekretorischer Proteine, die meisten davon biologisch aktive Substanzen, wie zum Beispiel Leptin oder TNF- $\alpha$  (Funahashi et al. 1999).

Die höchsten Konzentrationen konnten hierbei für Adiponectin, das 1995/1996 von vier verschiedenen Gruppen entdeckt wurde, festgestellt werden (Hu et al. 1996; Maeda et al. 1996; Nakano et al. 1996; Scherer et al. 1995). Dieses Protein wird ausschließlich von Adipozyten synthetisiert und fungiert als Insulin Sensitizer (Hu et al. 1996), wodurch es bei Fettsucht und anderen Zuständen die mit Insulinresistenz einhergehen, wie Diabetes Mellitus Typ 2 (Weyer et al. 2001) vermindert ist.

Zwei Transmembranproteine konnten als Adiponectin 1- und Adiponectin 2-Rezeptor (AdipoR1, AdipoR2) identifiziert werden; AdipoR1 mRNA wird vorwiegend im Herz und Skelettmuskel exprimiert, AdipoR2 vorwiegend in der Leber (Yamauchi et al. 2003). Die Konzentration liegt beim Menschen im Durchschnitt zwischen 5-10 µg/ml, wobei eine negative Korrelation mit dem BMI und der Insulinresistenz besteht (Takahashi et al. 1996;). In Fall-Kontroll Studien stellten sich außerdem niedrige Plasma Level als unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung eines Diabetes Mellitus Typ 2 heraus (Spranger et al. 2003).

In zwei weiteren Studien konnte eine streng negative Beziehung zwischen den Adiponectin-Konzentrationen im Serum und dem Auftreten von Brustkrebs gezeigt werden (Mantzoros et al. 2004; Miyoshi et al. 2003). Es konnte bis jetzt jedoch kein Wirkmechanismus nachgewiesen werden, der diesen Zusammenhang erklärt.

### **1.13 Wechselwirkungen zwischen Östrogenen und dem IGF-System**

In den vorangegangenen Abschnitten wurde ausführlich auf die Bedeutung der Östrogene, des Insulin/IGF-Systems und als Sonderfall Adiponectin für die Entwicklung eines Mammakarzinoms eingegangen. Sowohl IGF wie auch Östrogene wirken einzeln für sich kanzerogen, dennoch dürfen diese beiden Wege der Kanzerogenese nicht isoliert betrachtet werden, sondern sie interagieren auf vielfältige Weise miteinander:

1. Langzeit- Regulation der Expression von Proteinen des IGF-Systems über Östrogene
2. Direkte Aktivierung des IGF-1R durch ligandengebundenen Östrogenrezeptor
3. Transkriptionsaktivierung des Östrogenrezeptors über IGF-Signale
4. Synergistische Effekte beider Hormone

(Hamelers and Steenbergh 2003).

Langzeit Effekte von Östrogenen auf das IGF- System waren Gegenstand vieler Studien, in denen gezeigt wurde, dass über 17β-Östradiol (E2) die Expression von IGF-1R, IRS-1 und die Gruppe der IGFBPs hoch reguliert wird (Huynh et al. 1996, Lee et al. 1999). Darüber hinaus konnten Kahlert et al. (2000) direkte Aktivierung des IGF-1R durch Östradiol zeigen, solange dieses an ERα gebunden war, ein Effekt der nur mit ERα, nicht aber mit ERβ nachweisbar war.

Die gegenseitige Beeinflussung funktioniert auch in der entgegengesetzten Richtung. Mehrere Studien konnten demonstrieren, dass sowohl IGF als auch andere Wachstumsfaktoren unabhängig von weiteren Liganden den Östrogenrezeptor aktivieren können (Ram et al. 1998, Stoica et al. 2000).

Als letzte Wechselwirkung ist der synergistische Effekt von Östradiol und IGF-1 zu nennen, der in verschiedenen Geweben und Zellen einschließlich kultivierten Brustkrebszellen von verschiedenen Gruppen beschrieben wurde (Van der Burg et al. 1988, Cardona-Gomez et al. 2001).

### **1.14 Ziel der Arbeit**

Durch veränderte Lebensgewohnheiten, mit dauerhaft überhöhter Kalorienzufuhr und Bewegungsmangel, steigt nicht nur der Body Mass Index und das Risiko an Herz-Kreislauf-Erkrankungen oder Diabetes zu erkranken, sondern es treten auch schwerwiegende Veränderungen im Hormonhaushalt auf, die das Risiko für eine maligne Erkrankung erhöhen.

Ziel der Arbeit ist es, Zusammenhänge zwischen gestörter Stoffwechsellage mit erhöhter Insulinresistenz und dem Auftreten von Brustkrebs zu erkennen und daraus prognostische Schlüsse zu ziehen.

Zur Analyse von hormonellen Veränderungen soll der Östrogenspiegel im Blut bei prä- und postmenopausalen Brustkrebspatientinnen untersucht und mit klinischen und histopathologischen Parametern korreliert werden. Da der Östrogenspiegel stark von Hormonen der Östrogenbiosynthese abhängen müsste, sollen auch diese bestimmt und deren Genexpressionen sowohl mit Östrogen als Endprodukt als auch untereinander in Beziehung gesetzt werden.

Neben dem Östrogensignalweg soll die durch Übergewicht veränderte prädiabetische Stoffwechsellage, ausgedrückt durch Veränderungen im Insulin/IGF-System in die Untersuchungen mit einbezogen werden. Dies umfasst die Bestimmung der Insulinresistenz, des Insulinspiegels und der Insulinrezeptoren.

Die Einzelbefunde sollen kausal verknüpft werden, um Reaktionsketten im gesunden und erkrankten Gewebe und deren gegenseitige Beeinflussung zu erkennen.

Unter Heranziehung der aktuellen Literatur soll versucht werden, aus gesicherten Zusammenhängen, Wege zu einer verbesserten Aussagekraft von Prognosefaktoren des Mammakarzinoms zu entwickeln.



## 2 Material

### 2.1 Laborgeräte

Digitalkamera (Canon Powershot G5)

Gelelektrophorese Horizontalapparatur (Horizon 20.25, Life Technologies, GIBCO)

Horizontale Electrophorese (BRL)

Lichtmikroskop HM-Lux 3 (Leitz-Wetzlar)

LightCycler (Roche)

LightCycler Capillaries 20µl (Roche)

Magnetrührer mit Heizplatte (Stuart SB162)

PCR- Softstrips 0,2 ml (Biozym)

QIAshredder 250 (Qiagen)

Reaktionsgefäße 1,5ml (Biozym)

RNeasy Micro Kit (Quiagen)

Schlittenmikrotom Microm HM 400 (Heidelberg)

Schüttelgerät (IKA MS2)

Sterile Nadeln Microlance 3 (Becton Dickinson)

Thermocycler (Biometra T-Gradient)

UV-Leuchttisch (MWG Biotech)

UV- Photometer (Biometra GeneRay)

Zentrifuge Biofuge pico (Heraeus)

### 2.2 Chemikalien

Sämtliche verwendete Chemikalien wiesen Analysequalität auf.

Agarose (SeaKem LE Agarose, Cambrex Bio Science)

Cryospray (Medite)

DNTP-Mix (Sigma)

DNA-Molekulargewichtsstandard 1kb plus DNA-Ladder (invitrogen)

Eosin (MERCK)

Ethanol (Mallinckrodt Baker B.V.)

Ethidiumbromid (Roth)

Hämatoxilin (MERCK)

Methylenblau (Sigma)

MLV- Enzym (Promega)  
MLV-Puffer (Promega)  
Random Primer (invitrogen)  
RNA-later (Quiagen)  
RNAse Zap (Ambion)  
RNAsin plus (Promega)  
SYBR® Green PCR Master Mix (Qiagen)  
Xylol (Merck)

### 2.3 Puffer und Lösungen

DEPC-Wasser:

|                            |       |
|----------------------------|-------|
| Diethylpyrocarbonat (Roth) | 500µl |
| Aqua bidest.               | 500ml |

→ schütteln, über Nacht stehen lassen, 2x autoklavieren

RLT-Puffer:

|                     |        |
|---------------------|--------|
| RLT-Puffer (Qiagen) | 19,8ml |
| β-Mercaptoethanol   | 0,2ml  |

1xTBE-Puffer:

|                    |        |
|--------------------|--------|
| Tris (Roth)        | 121,1g |
| Borsäure (Roth)    | 55,6g  |
| EDTA (Chalbiochem) | 3,7g   |
| H <sub>2</sub> O   | Ad 1l  |

Gelladepuffer:

|                                   |          |
|-----------------------------------|----------|
| Glycerin (Roth)                   | 5ml      |
| Na <sub>2</sub> EDTA (Calbiochem) | 0,37g    |
| Natriumdodecylsulfat (Calbiochem) | 0,1g     |
| Bromphenolblau (Roth)             | 0,01g    |
| Deionisiertes H <sub>2</sub> O    | Ad 10 ml |

1x kB Marker:

|                                |        |
|--------------------------------|--------|
| H <sub>2</sub> O               | 16,5µl |
| Gelladepuffer                  | 2µl    |
| Leiter Konzentrat (invitrogen) | 1,5µl  |

## 2.4 Verwendete Primer

Tabelle 2: Nukleotidsequenzen der verwendeten PCR-Primer

| Bezeichnung | Sequenz  | Produktgrösse<br>(Basenpaare) |
|-------------|--|-------------------------------|
| β-actin     | β-actin 2573<br>CTGTGGCATCCACGAACTA<br>β-actin 2876<br>CGCTCAGGAGCAATG |                               |
| ERα         | ERAL1<br>TGATGAAAGGTGGGATACGA<br>ERAL2<br>AAGGTTGGCAGCTCTCATGT         | 125                           |
| ER β1       | ERβ1S<br>TTTGGGTGATTGCCAAGAGC<br>ERβ1A<br>AGCACGTGGGCATTCAGC           | 186                           |
| ER β2       | ERβ2neu-1<br>AACCTCCTGATGCTCCTGTC<br>ERβ 2neu-2<br>CCCAGAGGGAACTGAAGTG |                               |

|                         |  |     |
|-------------------------|--|-----|
| ER $\beta$ 5            | ER $\beta$ 5A<br>CACTTTTCCCAAATCACTTCACC<br>ER $\beta$ 1S<br>TTTGGGTGATTGCCAAGAGC                | 177 |
| ER $\beta$ $\Delta$ 125 | ER $\Delta$ 125neu<br>GGTGTGTTTATCTGCAAGGACA<br>ER $\beta$ $\Delta$ 125r<br>CTCATCCCGGGAATCTTCTT | 438 |
| IGF1R                   | IGF1R-A<br>TGAGGATCAGCGAGAATGTG<br>IGF1R-B<br>TATCCTGTTTTGGCCTGGAC                               | 171 |
| IGF2R                   | IGF2R-A<br>CTCCGATATTCGGATGGAGA<br>IGF2R-B<br>AGGAGTTCCTTTCCCATCGT                               | 132 |
| INSR                    | INSR-1<br>GCTCACGGAGACCTGAAGAG<br>INSR-2<br>GTCCCGATGCACAACTTCT                                  |     |
| CYP 19 Aro-<br>matase   | CYP19 neu-1<br>GTGGACGTGTTGACCCTTCT<br>CYP19 neu-2<br>GCTTGCCATGCATCAAAATA                       | 126 |
| IGFBP4                  | IBP1<br>GCCCTCTGACAAGGACGAG<br>IBP2<br>CCCCATTGACCTTCATCTTG                                      | 141 |
| Aromatase<br>/CYP 19    | CYP19-1<br>GAGGATCCCTTTGGACGAA<br>CYP19-2<br>TGCGATCAGCATTTCGAAT                                 | 306 |
| Adiponectin1            | R1uni<br>GGGGAATTCTCTTCCCACAAAGGATCTGTGGTG<br>R1rev<br>GGGCTGCAGTTAAGTTTCTGTATGAATGCGGAAGAT      |     |
| Adiponectin2            | R2uni<br>GGGGAATTCAACGAGCCAACAGAAAACCGATTG<br>R2 rev<br>GGGCTGCAGCTAAATGTTGCCTGTTTCTGTGTGTAT     |     |

### 3 Methoden

#### 3.1 Erstellung des Patientenkollektivs

Für die Studie konnten 92 Frauen mit neu diagnostiziertem Brustkrebs über den Zeitraum 2005-2006 gewonnen werden. Alle Patientinnen unterzeichneten eine Einverständniserklärung, an der Studie teilzunehmen. Es wurden keine Patientinnen mit Diabetes Typ1 oder Typ 2 in die Studie aufgenommen. Des weiteren wurden alle Frauen mindestens mit lokaler Exzision des Tumorgewebes und der Sentinelmethode zur Entfernung der axillären Lymphknoten behandelt. Bei Befall des Sentinellymphknotens wurde eine Dissektion der axillären Lymphknoten durchgeführt. Von molekularer Seite wurden nur duktale Karzinome in die Studie aufgenommen, das Grading wurde nach Bloom und Richardson (Bloom and Richardson 1957) festgelegt.

#### 3.2 Probengewinnung

Zur Probengewinnung wurden bei der Operation Tumorgewebestücke entnommen, sofort bei -80°C tief gefroren und in diesem Zustand zur weiteren Verarbeitung ins Labor transportiert.

Schnitte/HE-Färbung der Schnitte:

Im ersten Schritt wurde von jedem Gewebe jeweils ein 10µm dicker Schnitt angefertigt und auf einen Objektträger aufgebracht. Dazu musste der gefrorene Tumorblock mit einem speziellen Kleber auf einer kleinen Metallscheibe des Schlittenmikrotoms festgeklebt werden. Zusätzlich kam Cryospray zum Einsatz, um den Block vor dem Schneiden festfrieren zu lassen. Mit einem Pinsel wurde das abgeschabte Gewebe dann auf einen autoklavierten Objektträger aufgetragen.

Für die Blaufärbung musste der Objektträger ca. eine Minute in Hämalanflüssigkeit stehen, nach Bläuung unter fließendem Wasser folgte die Rotfärbung durch 20 Sekunden Eosin Einwirkung. Die Objektträger mit dem gefärbten Gewebe wurden daraufhin kurz in eine Salzsäure/Alkohol Mischung getaucht (6ml 1M HCl auf 1l 70%igen Ethanol), durch eine aufsteigende Alkoholreihe von 0-90% gezogen (jeweils ca. eine Minute) und zum Abschluss zwei Mal 10 Minuten in Xylol belassen. Durch Hämatoxilin als basischen Farbstoff werden der Zellkern und andere saure Strukturen blau angefärbt, wogegen Eosin als saurer Farbstoff basophile Gewebekomponenten

anfärbt. So konnten die histologischen Strukturen durch den Pathologen gut beurteilt werden. Die angefärbten Schnitte dienten als Referenz bei der Mikrodissektion.

### **3.3 Mikrodissektion**

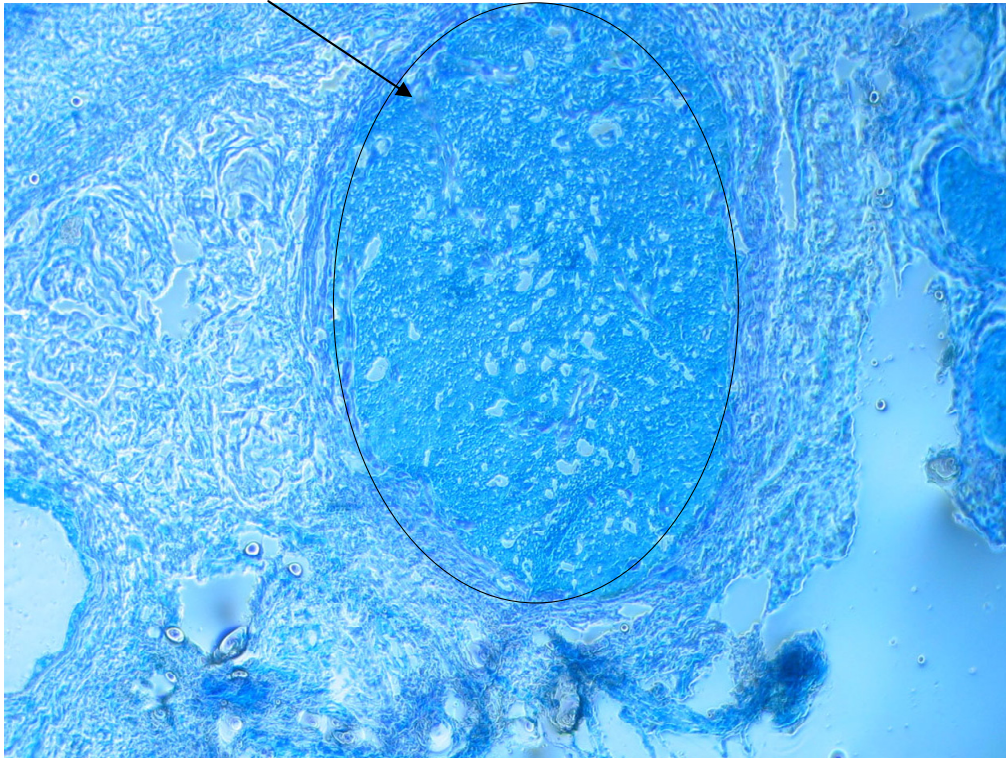
Mit dem Rest des gefrorenen Tumorgewebes erfolgte die Mikrodissektion.

Dazu wurden 20µm dicke Schnitte aus dem gefrorenem Tumormaterial angefertigt (siehe HE-Färbung) und im Gegensatz zu den Schnitten für die HE-Färbung sofort mit RNA-later, einem RNase Inhibitor, beträufelt, um eine möglichst große RNA-Ausbeute zu erzielen. Die hergestellten Schnitte sind bei -80°C lagerbar.

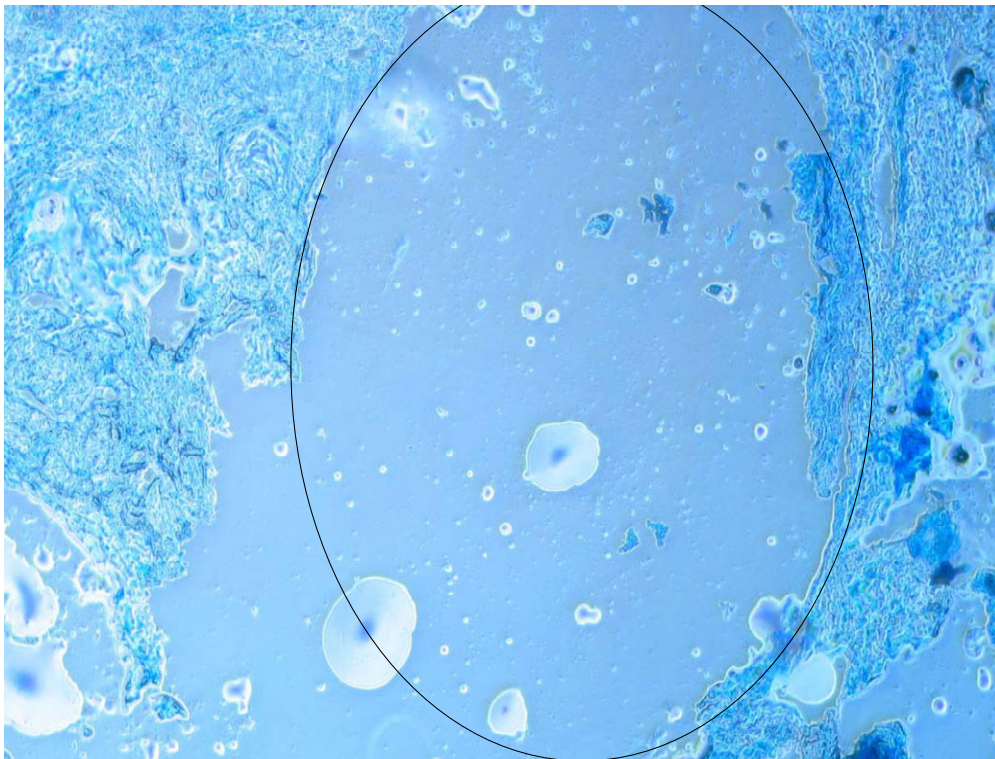
Mit Hilfe der Mikrodissektionstechnik ist es dann möglich, selektiv bestimmte Areale aus einem Gewebeschnitt zu isolieren. Hierzu wurde zuerst der HE-gefärbte Referenzschnitt auf das Lichtmikroskop aufgelegt, das gewünschte Tumorareal gesucht und mit Folienstift markiert. Zum Auftauen der 20µm dicken Gefrierschnitte wurden diese zuerst in 70% Ethanol getaucht und daraufhin in 0,1% Methylenblau ca. 5 Minuten gefärbt. Überschüssige Farbe wurde in DEPC-Lösung abgewaschen. Nun konnte im Mikroskop das entsprechende Areal aufgesucht werden (Abbildung 6) und mit einer sterilen Nadel abgekratzt werden.

Das gewonnene Material wurde nun in vorbereitete Eppendorf-Cups gegeben, in denen bereits 350µl RLT- Puffer vorgelegt war.

Bis zur weiteren Verarbeitung wurde das so gewonnene Material bei -80°C tief gefroren.

**Tumorgewebe umgeben von Normalgewebe**

a)



b)

**Abbildung 6: Gewebeschnitt vor (a) und nach (b) Mikrodisektion; das Tumorgewebe ist aufgrund höherer Dichte von Zellkernen intensiver blau angefärbt und lässt sich gut vom Normalgewebe unterscheiden.**

### 3.4 RNA-Isolierung aus mikrodissiziertem Material

Vorversuch:

In einem Vorversuch sollte geklärt werden, auf welche Weise aus der geringen Gewebemasse eine möglichst hohe Konzentration von RNA isoliert werden kann.

Von drei verschiedenen Brusttumorgeweben wurden Schnitte angefertigt, die jeweils einmal mit und einmal ohne RNA-later behandelt wurden. Diese Schnitte wurden vor der weiteren Verarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren. Die aus diesen Geweben bestimmten RNA-Konzentrationen sollten klären, ob die RNA-later Behandlung einen signifikant protektiven Effekt auf die zu isolierende RNA aufweist, so dass durch diese Vorbehandlung eine höhere Konzentration an RNA erzielt werden kann.

Die Probe, die mit RNA-later behandelt wurde, ergab nach Eluierung in 30  $\mu\text{l}$  RNase freiem Wasser eine Konzentration von 78,40 ng/ $\mu\text{l}$ , die unbehandelte Probe 53,60 ng/ $\mu\text{l}$ , woraufhin für die Vorbehandlung mit RNA-later entschieden wurde.

Die RNA-Isolierung und der Verdau der DNA-Anteile wurden dann nach einem modifizierten Protokoll von Quiagen (RNeasy Micro Kit / RNeasy Micro Handbook 04/2003, Quiagen) durchgeführt (Tabelle 1).

**Tabelle 3: Reagenzien für die RNA-Isolierung:**

|                             |                      |
|-----------------------------|----------------------|
| RLT-Puffer                  | 350 $\mu\text{l}$    |
| RW1-Puffer                  | 2x 350 $\mu\text{l}$ |
| DNase stock-solution        | 10 $\mu\text{l}$     |
| Puffer RDD                  | 70 $\mu\text{l}$     |
| RPE-Puffer                  | 500 $\mu\text{l}$    |
| EtOH 80%                    | 500 $\mu\text{l}$    |
| EtOH 70%                    | 350 $\mu\text{l}$    |
| H <sub>2</sub> O RNase-frei | 16 $\mu\text{l}$     |





|                         |  |                     |
|-------------------------|--|---------------------|
| 3. Elution<br>(auf Eis) | 16µl RNase freies<br>Wasser auf 37°C<br>erwärmen | 1min bei 13.000 rpm |
|                         | reeluieren                                       | 1min bei 13.000 rpm |

Zur Kontrolle der ermittelten Konzentrationen wurde jeweils eine 1:10 Verdünnung im Photometer bei 260 nm bestimmt.

### 3.5 cDNA-Synthese für die RT PCR

#### 3.5.1 Herstellung der cDNA

Reaktionsansatz für cDNA- Synthese:

|                          |         |
|--------------------------|---------|
| RNA                      | 0,5µg   |
| RNase Inhibitor          | 0,25µl  |
| Random Primer (100ng/µl) | 1,0µl   |
| H <sub>2</sub> O         | Ad 14µl |

Für die cDNA- Herstellung wurde je nach ermittelten Konzentrationen 1µg beziehungsweise 0,4µg RNA eingesetzt und diese dann mit RNase Inhibitor, Random Primer und RNase- freiem H<sub>2</sub>O zu 14 µl Endvolumen pipettiert.

Nach Zentrifugation folgte der Denaturierungsschritt (5min bei 70°C).

Pipettierschema des Mastermixes je Probe:

|                  |        |
|------------------|--------|
| H <sub>2</sub> O | 4,25µl |
| MLV- Puffer      | 5,0µl  |
| DNTP-Mix         | 1,25µl |
| MLV-Enzym        | 0,5µl  |

Zu jedem Ansatz wurden nach Zentrifugation 11 µl des Mastermixes gegeben, daraufhin ein zweites Mal zentrifugiert und das PCR- Programm gestartet.

Bis zur weiteren Verarbeitung wurde die so hergestellte cDNA bei -20°C aufbewahrt.

### 3.5.2 Herstellung der Positivkontrolle

Um Kontamination der Primer auszuschließen und die Funktion der Primer zu überprüfen, wurde zu jedem getesteten Oligonukleotid jeweils eine Positiv- und eine Negativkontrolle durchgeführt.

Als Negativkontrolle diente RNase-freies Wasser, für die Negativkontrolle wurde ein „Cell line mix“, aus sieben verschiedenen Tumorzelllinien hergestellt.

Folgende Zelllinien wurden verwendet:

- MCF-7
- MDA
- SKBR
- OVCAR
- SKOV
- HEC-1

Von jeder Zelllinie wurden 2x 10µg RNA in einem Reaktionsgefäß vereinigt und die Konzentration auf 0,2µg/µl eingestellt. Das entstandene Produkt ist bei -80°C lagerbar und kann in der gewünschten Menge (5µl = 1µg) in die RT-PCR eingesetzt werden.

## 3.6 RT-PCR

### 3.6.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR ist eine schnelle und einfache Methode zur *in vitro* Amplifikation von DNA.

Diese Methode dient zur Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen. Hierzu wurden definierte Primer verwendet, die jeweils an der 3'-Seite des Matrixstranges der gewünschten Zielsequenz binden, eine Polymerase, sowie die vier verschiedenen Desoxyribonukleosidtriphosphate. Die PCR ist seit ihrer Einführung durch Mullis (Mullis et al., 1990) eines der wichtigsten Verfahren in der Molekularbiologie. Eine PCR setzt sich aus n Zyklen zusammen (Abbildung 7). Im Folgenden werden die drei Schritte eines Zyklus kurz vorgestellt:

1. **Denaturierung:** Strangtrennung der Ausgangs- DNA durch kurzes Erhitzen (1 min.) auf 94 °C
2. **Annealing:** Hybridisierung der Primer bei der sogenannten Annealing-Temperatur, primerspezifisch zwischen 50°C und 70°C
3. **Elongation:** Verlängerung der Primer bei 72°C durch Anheften der komplementären Nukleotide an das freie 3'- OH- Ende und damit in Richtung der Zielsequenz.

Voraussetzung für diese Methode ist die Anlagerung von zwei Primern (Oligonukleotiden) an die komplementären Enden. Die freien 3`OH-Enden der Primer können dann von einer DNA-Polymerase zur Synthese der komplementären Stränge verwendet werden. Nach anschließender Denaturierung der neusynthetisierten DNA kann der Vorgang wiederholt werden. Die PCR ist somit eine zyklische Amplifikationsmethode. Durch eine mehrfache Wiederholung der drei Schritte kommt es zur Amplifikation des von den Primern flankierten DNA-Fragmentes. Nach etwa 30 Zyklen nimmt die Amplifikation der DNA deutlich ab, da Primer und Nukleotide verbraucht sind und die Polymerase teilweise inaktiviert ist. Außerdem steigt mit der Zahl der Zyklen die Wahrscheinlichkeit für eine Fehlamplifikation.

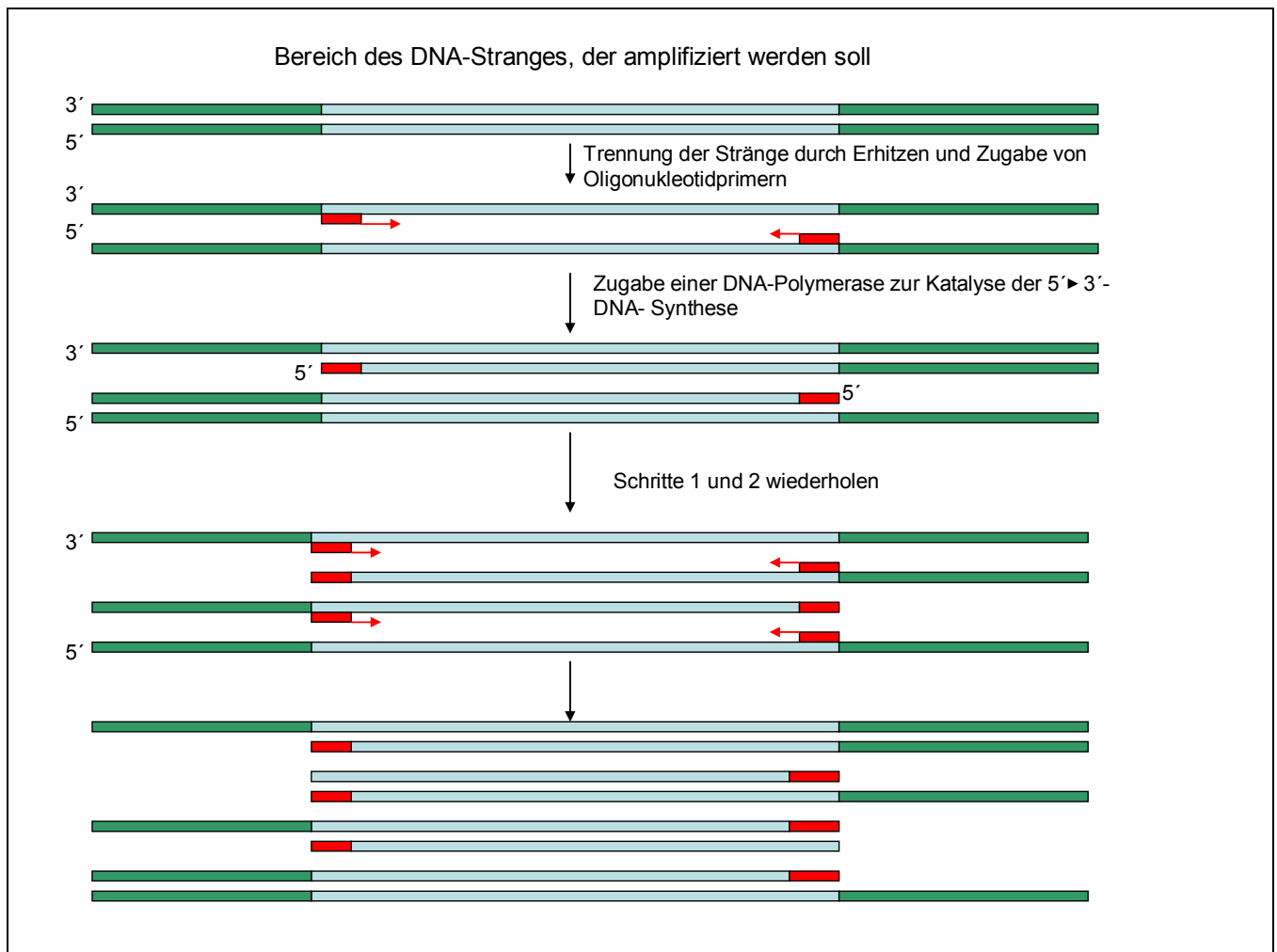


Abbildung 7: Schema der Polymerase-Kettenreaktion nach Löffler (1998):

Nach 25 Zyklen ist die Zielsequenz auf 1.000 000-fach amplifiziert.

### 3.6.2 Genexpressionsbestimmung

Pipettierschema für RT- PCR:

|                            |     |
|----------------------------|-----|
| SYBR® Green PCR Master Mix | 5µl |
| Primer-Mix                 | 1µl |
| cDNA                       | 1µl |
| H2O                        | 3µl |

In Ergänzung zur normalen PCR wurde mit Hilfe der RT-PCR die Expression der in der Einleitung genannten Gene bestimmt. Die Quantifizierung der in der real-time RT-PCR synthetisierten PCR-Produkte erfolgt durch kontinuierliche Erfassung der laserinduzierten Fluoreszenzsignale, die von in der Reaktion enthaltenen Farbstoffen gegeben

werden. Die Intensität des Fluoreszenzfarbstoffes ist dabei direkt proportional zur PCR-Produktmenge. Es wird davon ausgegangen, dass mit Erreichen eines Fluoreszenzschwellenwertes (threshold) in jeder Probe die gleiche Kopienzahl der analysierten DNA-Sequenz enthalten ist. Der PCR-Zyklus, mit dem dieser threshold überschritten wird, wird als Ct-Wert (threshold cycle) bezeichnet.

Die so ermittelten Werte wurden im Verhältnis zu  $\beta$ -Actin als ubiquitär vorkommendem Protein des Zytoskeletts ausgedrückt (r-Wert). Die Reaktionen erfolgten in einem 20 $\mu$ l Ansatz.

Sämtliche Reaktionen wurden dreimal wiederholt.

Das Temperaturprofil für den SYBR® Green Assay war wie folgt:

|     |       |               |
|-----|-------|---------------|
| 95° | 15min | Denaturierung |
| 95° | 10s   | } 38Zyklen    |
| 59° | 30s   |               |
| 72° | 30s   |               |

Die Expression der einzelnen Gene wurde in Prozent von  $\beta$ -actin angegeben. Die Prozentzahl wurde nach folgender Formel errechnet:

$$\% \text{ von } \beta\text{-actin: } 2^{\Delta CT} \times 100$$

$\Delta CT$ :

Zykluszahl von  $\beta$ -actin – Zykluszahl der Probe

### 3.7 Kontrolle der RT-PCR Produkte über Gele

Erforderliche Lösungen für Agarosegelelektrophorese:

|                         |              |
|-------------------------|--------------|
| 1xTBE-Puffer            | 180 ml       |
| Gelladepuffer           | 2,2µl        |
| Ethidiumbromidlösung 1% | 9,0µl        |
| Agarose                 | 2,7g (=1,5%) |
| 1x kB Marker            | 20,0µl       |

Nukleinsäuren haben aufgrund der negativen Ladungen des Phosphatrückgrats die Eigenschaft im elektrischen Feld in Richtung der Anode zu wandern. Diese Eigenschaft kann man nutzen, um DNA-Fragmente ihrer Größe nach zu trennen, indem man sie in Agarosegelen auftrennt. Der Siebeffekt der Agarose hat zur Folge, dass kleine DNA-Fragmente im Gel schneller wandern als große. Die Laufweite der Fragmente ist dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus der Größe des Moleküls. Durch Variation der Agarosekonzentration kann man die Trennschärfe von Agarosegelen variieren und somit DNA-Fragmente über einen weiten Grössenbereich trennen.

Die Agarose wurde in 1 x TBE suspendiert und durch Aufkochen gelöst wobei das verdampfte Volumen durch destilliertes Wasser wieder auf das Endvolumen von 200ml aufgefüllt wurde. Zum Anfärben der DNA wurde dem Gel Ethidiumbromidlösung zugegeben. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA- Doppelhelix und kann durch UV-Licht (302nm) zur Fluoreszenz angeregt werden.

Nach kurzem Abkühlen wurde die Agarose in die vorbereitete Gelform mit einem Kamm gegossen, der zur Erzeugung der Probestaschen dient. Die Trockenzeit bis zum Aushärten des Gels beträgt ca. 1h.

Die Kapillaren wurden nun aus dem Light Cycler genommen, zentrifugiert, abgebrochen und in vorbereitete Eppendorf Cups umgefüllt. Zu jeder Probe wurde 2,2 ml Ladepuffer gegeben und nach nochmaligem Zentrifugieren wurden 20µl in jede Gel-tasche pipettiert.

Die Elektrophorese erfolgte in einer Horizontalapparatur, welche mit 1xTBE als Laufpuffer gefüllt war. Die Laufzeit betrug ca. 1h bei 170 mA.

Anschließend wurde das Gel auf einen UV-Leuchtschirm gelegt, wodurch die DNA-Banden sichtbar wurden (Abbildung 8).

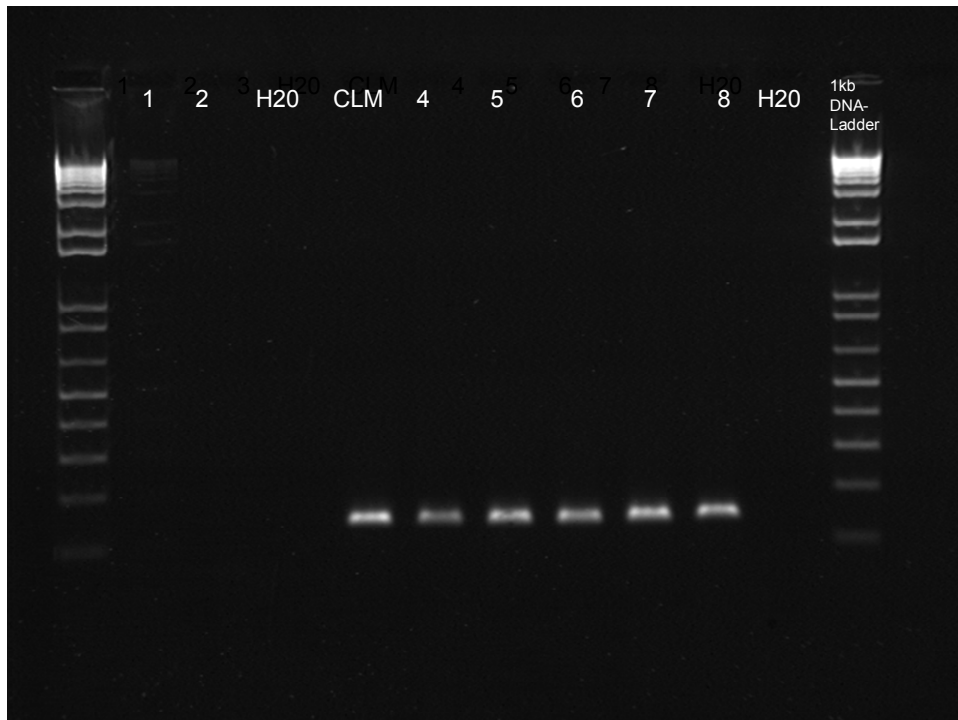


Abbildung 8: Agarosegel mit 10 aufgetragenen Proben: 1-2:ER  $\beta$ 2, H<sub>2</sub>O, CLM (Cell Line Mix), 4-8: ER  $\beta$ 5

### 3.8 HOMA-Modelling zur Bestimmung der Insulinsensitivität

Zusätzlich zum Tumorgewebe wurden bei allen Frauen Blutproben zur Bestimmung des Nüchternblutzuckers entnommen. Der Entnahmezeitpunkt war jeweils unmittelbar vor der Operation nach einer Nüchternperiode von mindestens 12 h. Das Serum wurde sofort nach Entnahme abzentrifugiert und je Patientin 2ml in Aliquots von 0,5ml bei -80° C tiefgefroren.

Aus diesen Blutproben wurde in der Abteilung für klinische Chemie (Universität Regensburg) Insulin, Glukose, C-Peptid und Östrogenlevel durch ELISA bestimmt.

Die Insulinsensitivität wurde unter Anwendung des **HO**meostasis **M**odel **A**ssessment (**HOMA**) bestimmt.

Dieses Modell stellt eine Methode zur Abschätzung der  $\beta$ -Zellfunktion und Insulin-Resistenz, ausgehend von Nüchternblutzucker und Insulin- oder C-Peptid Konzentrationen.

Der Vorteil dieser Methode liegt in der einfachen Durchführung: es wird nur eine einzige Plasmaprobe nach mindestens 12-stündiger Nahrungskarenz zur Bestimmung von Nüchternblutzucker und Insulinkonzentration gebraucht (Wallace et al. 2004).



HOMA leitet sich von einer mathematischen Abschätzung der Interaktion zwischen  $\beta$ -Zellfunktion und Insulinsensitivität ab. In einem idealisierten Modell werden daraus die Konzentrationen von Insulin und Glukose abgeschätzt. Als Ergebnis werden normale  $\beta$ -Zellfunktion mit 100% und normale Insulinsensitivität mit 1 angegeben (Tabelle 3). Sobald diese Beziehung ermittelt ist, lassen sich die  $\beta$ -Zellfunktion und die Insulinsensitivität für jedes Paar von Plasmaglukose und zugehöriger Insulinkonzentration errechnen, ohne das gesamte Modell zu wiederholen.

$$\text{HOMA-Index} = \frac{\text{Insulin (nüchtern, } \mu\text{U/ml)} \times \text{Blutzucker (nüchtern, mg/dl)}}{405}$$

**Tabelle 4: HOMA-Index** (<http://www.laborlexikon.de>)

| HOMA-Index | Interpretation                          |
|------------|---|
| $\leq 1$   | Normal                                  |
| $> 2$      | Hinweis auf eine Insulinresistenz       |
| $> 2,5$    | Insulinresistenz sehr wahrscheinlich    |
| $> 5$      | Durchschnittswert bei Typ 2 Diabetikern |

### 3.9 Statistische Methoden

Da die zu untersuchenden Parameter keiner Gauß'schen Verteilung unterlagen, wurden nicht-parametrische Test angewandt. Mit dem Spearmans Rangkorrelationskoeffizient konnte der Zusammenhang zwischen BMI, klinischen und histopathologischen Kennzeichen und zwischen den Genexpressionen untereinander bestimmt werden (<http://www.zwisler.de/edv/parfree.html>).

Der Mann-Whitney Test wurde zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Alter und Östrogenlevel, ER $\alpha$ , STS, CYP19 und Insulinresistenz angewandt (<http://www.zwisler.de/edv/parfree.html>).

Das Signifikanzniveau wurde für  $p < 0,05$  als stark signifikant, für  $p = 0,05-0,1$  als schwach signifikant definiert.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Beschreibung der Patientendaten

#### 4.1.1 Altersverteilung

Das Alter der Patientinnen reichte von 24 Jahren bis 94 Jahren, mit einem Durchschnittsalter von 59,93 Jahren.

Die genaue Verteilung zeigt Abbildung 9.

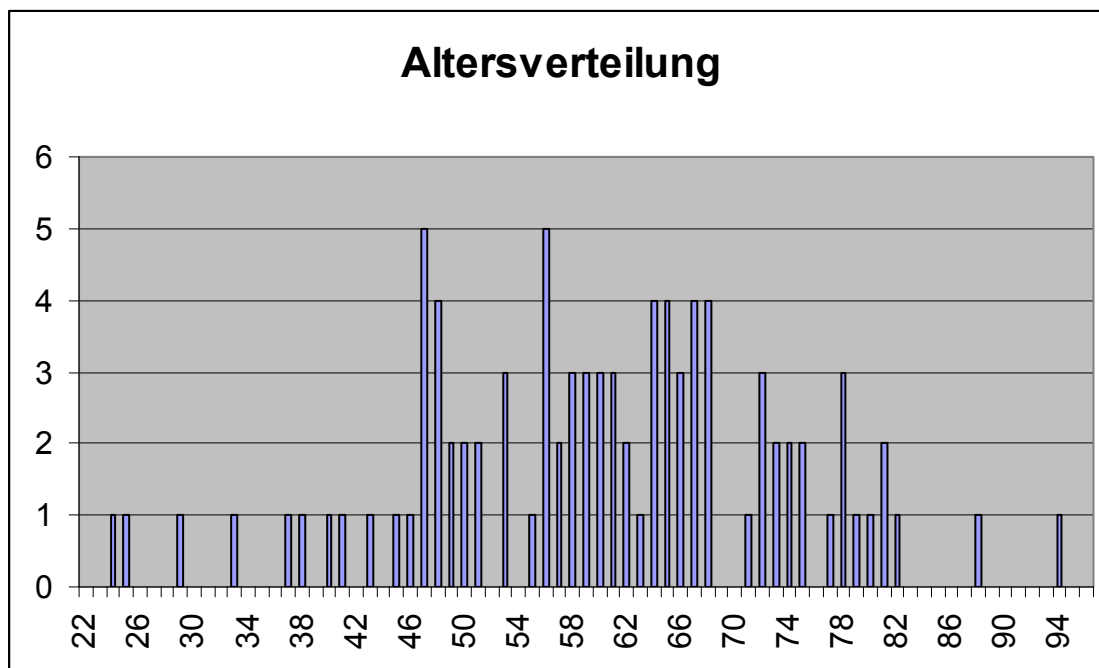


Abbildung 9: Altersverteilung der Patientinnen (n = 92)

#### 4.1.2 Body Mass Index (BMI)

Der Durchschnittliche BMI lag bei 26,0 kg/m<sup>2</sup>. Dieser Wert liegt bereits über der Grenze für Normalgewicht, die bei 24,9kg/m<sup>2</sup> liegt, was jedoch in dieser Altersgruppe in Deutschland nicht ungewöhnlich ist. Zusätzlich korrelierte der Wert des BMI positiv mit steigendem Alter ( $r=0,649$ ;  $p=0,005$ ).

### 4.1.3 Tumorstadien

Bezüglich des Tumorstadiums wiesen nahezu zwei Drittel der Patientinnen das Stadium T1c auf, insgesamt 23% hatten ein Stadium T2 oder T3. Der Lymphknotenstatus war in 50% der Fälle negativ. Im Falle von positiven Lymphknoten lagen zwei Drittel im Stadium N1a oder N1b und lediglich 11% aller Studienteilnehmerinnen befanden sich im Stadium N2a oder N2b. Keine der in die Untersuchung einbezogenen Patientinnen wies zum Zeitpunkt des Studienbeginns Fernmetastasen auf. Im histopathologischen Grading ergab sich bei über 50% der Studienteilnehmerinnen ein Grading von G2, lediglich 4% wiesen die am prognostisch günstigste Einteilung G1 auf. Bezüglich des Fortschritts der Tumorausbreitung im Körper zeigten sich bei circa einem Drittel der Tumorproben ein Einbruch in Lymphgefäße bzw. bei 15% ein Einbruch in die Blutbahn. Der Her2 neu Status erwies sich bei über 50% negativ, geringe Expression konnten wir gar nicht nachweisen, jedoch eine mehrfache Positivität bei 15% der eingeschlossenen Studienteilnehmer (siehe Tabelle 3).

**Tabelle 5: Verteilung der klinischen und histopathologischen Parameter**

| <b>Tumorstadium</b>      | <b>Anzahl</b> | <b>Prozentangabe</b> |
|--------------------------|---------------|----------------------|
| T1a, T1b                 | 1             | 3,8                  |
| T1c                      | 16            | 61,5                 |
| T2,T3                    | 6             | 23,0                 |
| Unbekannt                | 3             | 11,5                 |
| <b>Lymphknotenstatus</b> |               |                      |
| N0                       | 13            | 50,0                 |
| N1a,b,c                  | 7             | 26,9                 |
| N2a,b,c                  | 3             | 11,5                 |
| Unbekannt                | 3             | 11,5                 |
| <b>Grading</b>           |               |                      |
| G1                       | 1             | 3,8                  |
| G2                       | 14            | 53,8                 |
| G3                       | 8             | 30,8                 |
| Unbekannt                | 3             | 11,5                 |

**Gefäßinvasion (V1)**

|                 |    |      |
|-----------------|----|------|
| Vorhanden       | 4  | 15,4 |
| Nicht vorhanden | 18 | 69,2 |
| Unbekannt       | 4  | 15,4 |

**Lymphgefäßinvasion  
(L1)**

|                 |    |      |
|-----------------|----|------|
| Vorhanden       | 9  | 34,6 |
| Nicht vorhanden | 14 | 53,8 |
| Unbekannt       | 3  | 11,5 |

**Her 2 neu**

|                  |    |      |
|------------------|----|------|
| Negativ          | 14 | 53,8 |
| Einfach positiv  | 0  | 0    |
| Mehrfach positiv | 4  | 15,4 |
| Unbekannt        | 8  | 30,8 |

**4.1.4 Ermittlung der Genexpression**

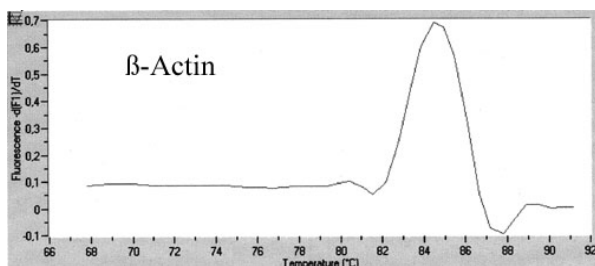
Ziel der Studie war es, die gerade beschriebenen klinischen und histopathologischen Merkmale untereinander und mit der gemessenen Genexpression ausgewählter Rezeptoren und Enzyme im Tumorgewebe zu korrelieren.

Die Ermittlung der Genexpression erfolgte mit der Real-Time PCR. Um jedoch möglichst reines Tumorgewebe ohne umgebendes Brustgewebe zu untersuchen, wurden sämtliche Proben vorher durch Mikrodissektion auf Gehalt an malignen Zellen geprüft. Durch diese Methode der Mikrodissektion standen jedoch nur sehr geringe Mengen an Tumorgewebe zur Verfügung, aus welchen die größtmögliche Ausbeute an spezifischer Tumor-RNA erzielt werden sollte. Hierzu wurde im Vorversuch ein Vergleich der Konzentration von RNA nach unterschiedlicher Vorbehandlung durchgeführt: die Hälfte der Proben wurde mit RNA-later behandelt, die andere Hälfte wurde unbehandelt weiterverarbeitet. Die so vorbehandelten Proben zeigten ein eindeutig besseres Ergebnis in der RNA-Ausbeute, weshalb im Folgenden mit allen weiteren Proben auf diese Weise verfahren wurde. Trotzdem war es nur von verhältnismäßig wenigen Patientenpro-

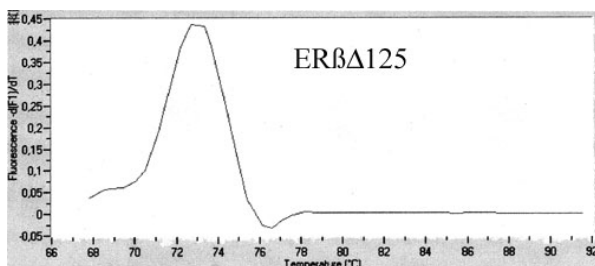
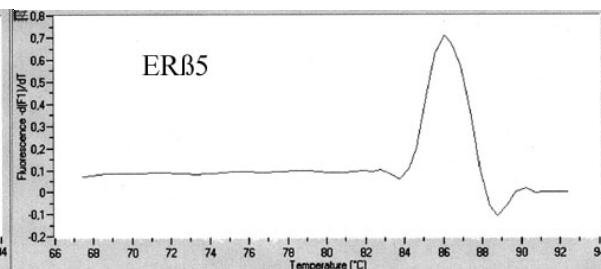
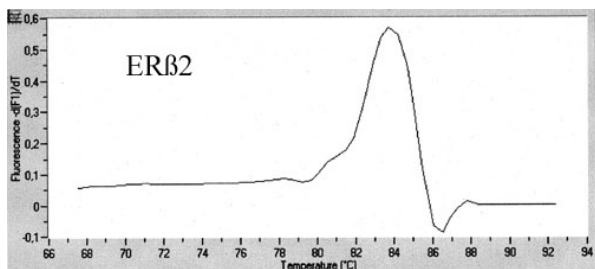
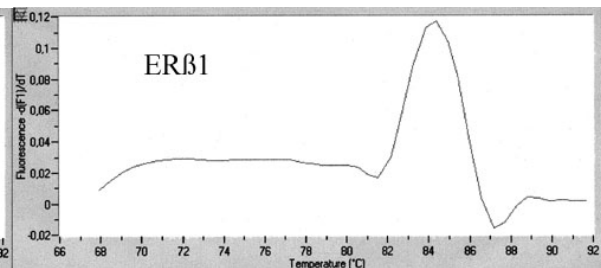
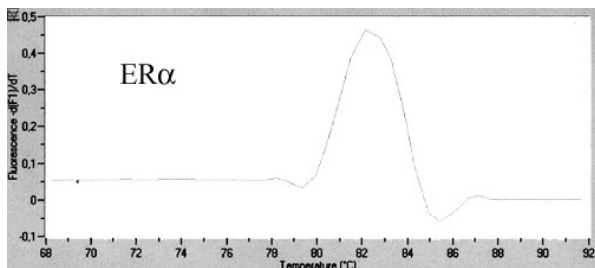
ben möglich, genügend RNA für die weitere Genexpressionsbestimmung zu erlangen. Die Resultate der RNA-Isolierungen schwankten weiterhin stark und lagen zwischen 0µg bis maximal 7µg für eine einzelne Gewebeprobe. Dennoch konnten am Ende von 26 Patientinnen Tumorgewebeproben bezüglich unterschiedlicher Genexpression der ausgewählten Gene untersucht werden.

In der hierzu durchgeführten Real-Time PCR ergaben sich unterschiedliche Schmelzkurven für die einzelnen Oligonukleotide, die im Folgenden aufgetragen sind (Abbildung 10). Die Schmelzpunkte der unterschiedlichen Gene lagen bei ca. 65-85°C.

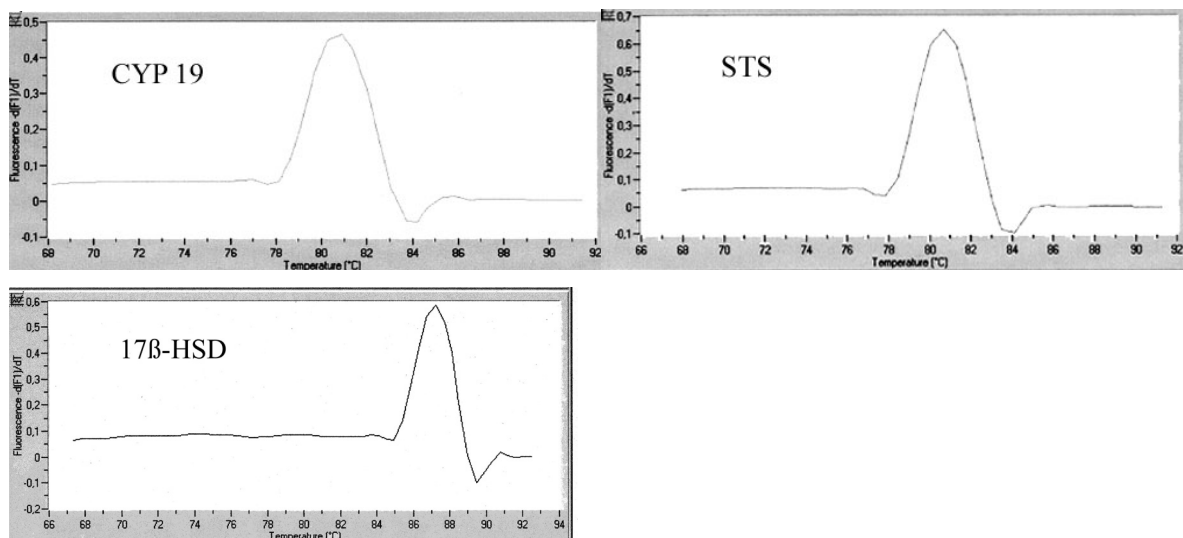
### β-Actin als Referenzgen



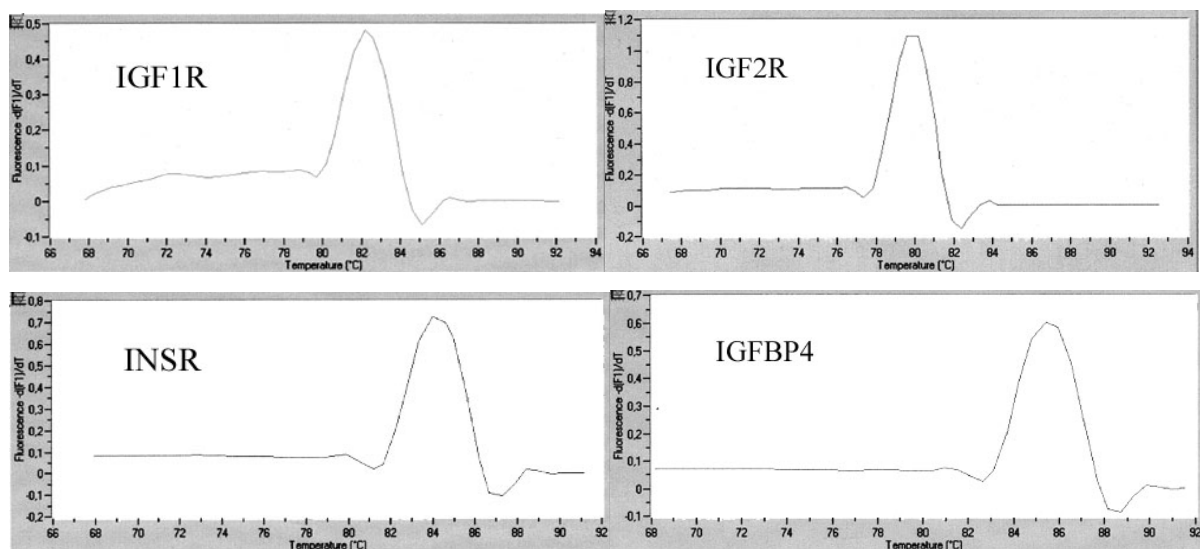
### Östrogenrezeptoren



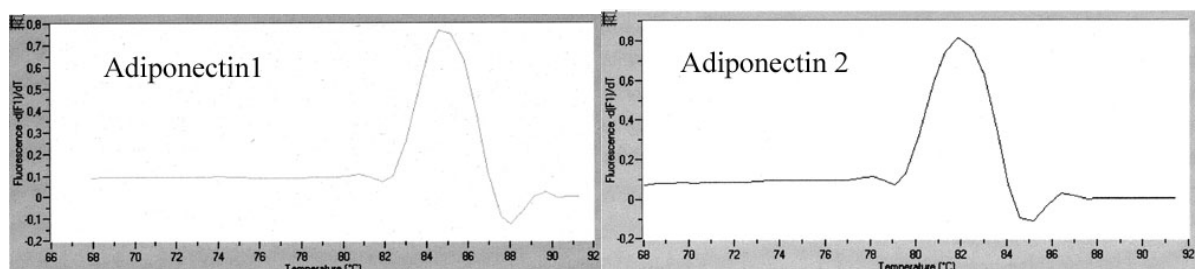
## Enzyme der Östrogenbiosynthese



## IGF/Insulin-System



## Adiponectinrezeptoren



**Abbildung 10: Schmelzkurven der untersuchten Oligonukleotide**

Sämtliche Light-Cycler-Läufe wurden mindestens dreimal wiederholt, um die Ergebnisse zu validieren. Hierbei ergaben sich extreme Unterschiede, zum einen zwischen den

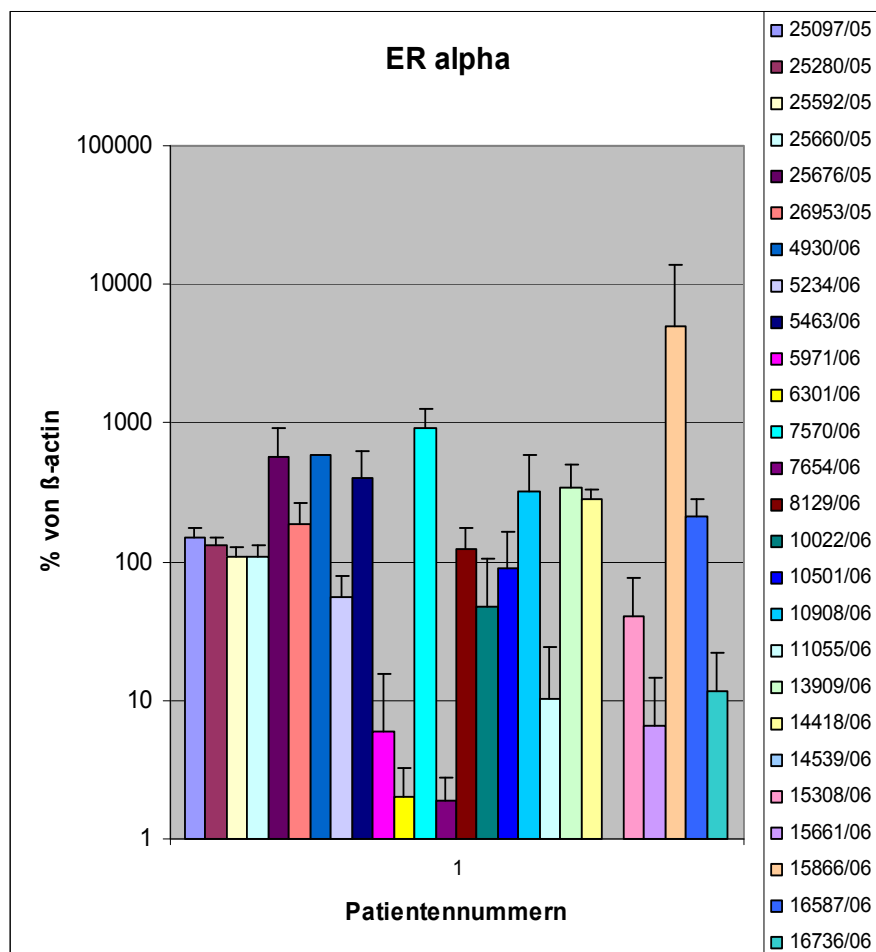
verschiedenen untersuchten Genen, zum anderen auch innerhalb eines Gens im Vergleich der Patientinnen untereinander.

Die folgenden Diagramme zeigen schematisch die Genexpression von ER $\alpha$  und von STS bei allen Patientinnen. Es ist ein deutlicher Unterschied zwischen dem Östrogenrezeptor  $\alpha$  in Diagram a), dessen Genexpression zwischen 50 bis über 1000% bezogen auf  $\beta$ -actin und der Steroid Sulfatase mit Expressionen bis maximal 200% zu sehen (Abbildung 11).

Auch die interindividuellen Unterschiede innerhalb eines untersuchten Gens sind deutlich zu erkennen, weshalb zur besseren Darstellung der stark differierenden Werte im Diagramm die logarithmische Skalierung gewählt wurde.

Bei der Auswertung der Genexpression und ihrem Bezug auf  $\beta$ -actin, ergaben sich für 17 $\beta$ -HSD minimale Werte, bzw. in über der Hälfte der Fälle ein Nullwert, weshalb dieses Enzym nicht in weitere Korrelationsuntersuchungen mit einbezogen wurde.

a)



b)

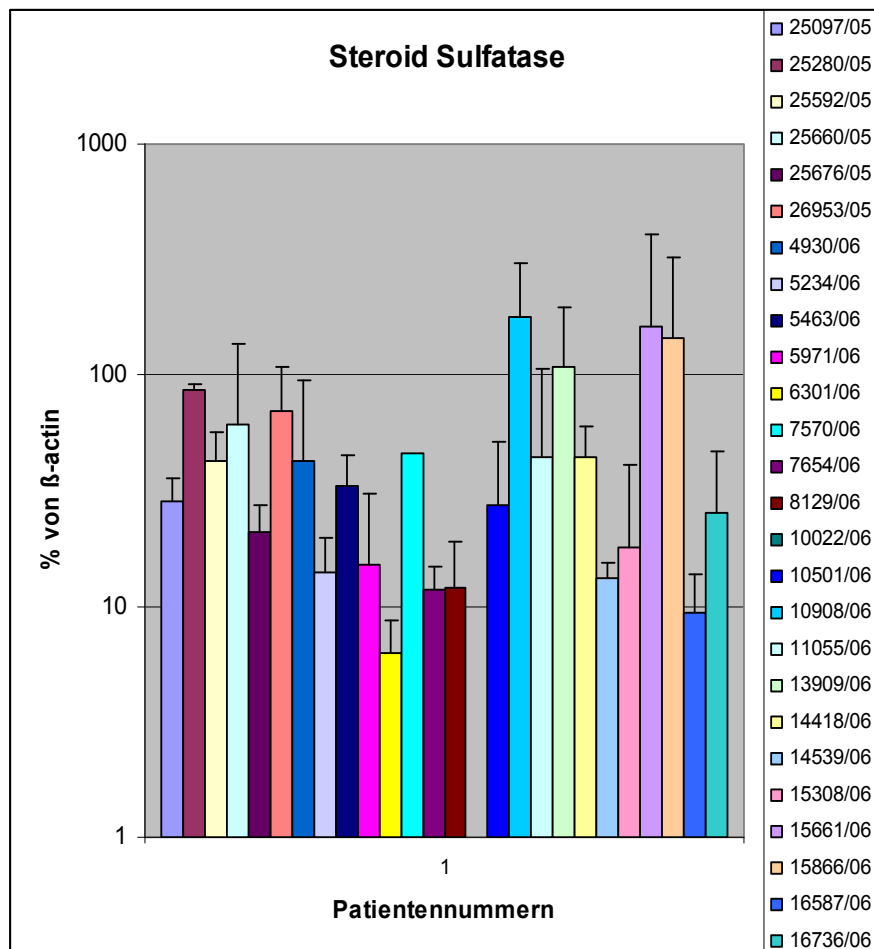


Abbildung 11: Genexpression von ER alpha und STS im Vergleich

a) Expression von ER $\alpha$  bezogen auf  $\beta$ -Actinb) Expression der Steroid Sulfatase bezogen auf  $\beta$ -Actin

## 4.2 Korrelationen der Patientendaten untereinander

### 4.2.1 Östrogenstoffwechsel

Zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Östrogenrezeptoren, Östrogen-  
 spiegel und Enzymen der Östrogenbiosynthese mit dem Alter, wurde der Patienten-  
 pool in drei Gruppen unterteilt (<50; 50-70; >70Jahre). Beim Vergleich der jüngsten  
 Gruppe mit der ältesten konnten in Bezug auf ER $\alpha$  (%von  $\beta$ -Actin), Östrogenlevel  
 (pmol/l), STS (% von  $\beta$ -Actin) und CYP19 (% von  $\beta$ -Actin) unterschiedliche Korrelatio-  
 nen festgestellt werden (siehe Tabelle 6).



**Tabelle 6: Durchschnittliche Östrogenspiegel und mRNA-Genexpression und Korrelationen mit dem Alter**

|  | <b>Östrogenspiegel<br/>(pmol/l)</b> | <b>ER<math>\alpha</math><br/>(% von <math>\beta</math>-actin)</b> | <b>ER<math>\beta</math>1<br/>(% von <math>\beta</math>-actin)</b> | <b>STS<br/>(% von <math>\beta</math>-actin)</b> |
|--|-------------------------------------|---|---|---|
| <b>Alter</b>                                     |                                     |   |   |   |
| Durchschnittlicher Wert <50 Jahre                | 285                                 | 23,3  | nd  | 14,8  |
| Durchschnittlicher Wert >70Jahre                 | 76                                  | 124,8   | nd  | 62,2  |
| <b>Signifikanz (p)</b>                           | 0,062                               | 0,045   | 0,038   | 0,039   |
| <b>Rangkorrelationskoeffizient (Spearman; r)</b> | -0,463                              | 0,396   | 0,445   | 0,424   |

Stark-negativ korrelierten Alter der Patientinnen und Östrogenspiegel ( $r=-0,463$ ;  $p=0,062$ ), eine stark positive Beziehung konnte dagegen zwischen Alter und ER $\alpha$  aufgedeckt werden ( $r=0,396$ ;  $p=0,045$ ). Bezüglich weiterer Östrogenrezeptoren ergab sich noch für ER $\beta$ 1 eine positive Korrelation mit dem Alter ( $r=0,445$ ;  $p=0,038$ ).

Die Untersuchung zwischen Alter und verschiedenen Enzymen der Östrogenbiosynthese ergab unterschiedliche Ergebnisse: so konnte bei den älteren Patientinnen im Vergleich zu den jüngeren ein höherer Spiegel an STS nachgewiesen werden ( $r=0,424$ ;  $p=0,039$ ), jedoch keine Korrelation zwischen Alter und CYP 19.

#### 4.2.2 Insulinstoffwechsel

Nach den Parametern des Östrogenstoffwechsels wurde der Insulinstoffwechsel anhand von Insulinresistenz und BMI mit dem Alter der Patientinnen, mit Markern des Glukosestoffwechsels, mit Erkrankungsstadien, mit der Expression von Östrogenrezeptoren und untereinander korreliert.

Hierbei war es wichtig, dass keine der in die Studie eingeschlossenen Patientinnen zum Zeitpunkt der Blutentnahme auf orale Antidiabetika eingestellt war, wodurch ansonsten die Insulinsensitivität und der Blutzuckerspiegel künstlich „verfälscht“ würde.

Das untersuchte Patientenkollektiv wurde bezüglich des Alters in drei Gruppen eingeteilt und die jüngste Gruppe mit der ältesten auf Unterschiede in der Insulinresistenz

hin getestet. Hierbei zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen beiden Gruppen. Der durchschnittliche Wert der jüngeren Gruppe lag bei 0,67; der Durchschnittswert der oberen Altersgruppe lag bei 2,12 und zeigte somit bereits einen Hinweis auf Insulinresistenz. Der Korrelationskoeffizient lag bei 0,339; das Signifikanzniveau bei  $p=0,001$ .

Neben der Insulinresistenz zeigten sich auch Zusammenhänge zwischen Alter und dem Insulinspiegel im Serum ( $r=0,389$ ;  $p<0,001$ ) und daraus ableitbar eine Korrelation zum C-Peptid ( $r=0,452$ ;  $p<0,001$ ). Auch der BMI selbst stieg signifikant mit dem Alter an ( $r=0,276$ ;  $p=0,011$ ).

**Tabelle 7: Korrelation zwischen Alter der Patientinnen und Markern des Insulinstoffwechsels**

|  | <b>Insulinresistenz</b> | <b>Insulinspiegel</b> | <b>C-Peptid</b> | <b>BMI</b> |
|--|-------------------------|-----------------------|-----------------|------------|
| <b>Alter</b>                                     |                         |                       |                 |            |
| <b>Signifikanz p</b>                             | 0,001                   | 0,001                 | 0,001           | 0,011      |
| <b>Rangkorrelationskoeffizient (Spearman; r)</b> | 0,339                   | 0,389                 | 0,452           | 0,276      |

Wie die Tabelle zeigt, stiegen alle untersuchten Parameter (Insulinresistenz, Insulinspiegel, C-Peptid und BMI) signifikant mit dem Alter an.

Weiterhin konnte eine hohe Korrelation zwischen dem Insulinspiegel und dem Tumoreinbruch in Blut- und Lymphgefäße ( $r_{V1}=0,474$ ;  $p_{V1}=0,047$  und  $r_{L1}=0,488$ ;  $p_{L1}=0,034$ ) nachgewiesen werden. Der Gefäßeinbruch war jedoch der einzige prognostisch ungünstige Faktor, für den eine positive Korrelation mit der Insulinresistenz gezeigt werden konnte. Bezüglich der Tumorgroße, des Lymphknotenbefalls oder des Gradings ergaben sich im Patientenkollektiv keine eindeutigen Zusammenhänge mit der Insulinresistenz.

Die Untersuchung von Insulinspiegel und BMI ergab dagegen eine stark positive Korrelation ( $r=0,307$ ;  $p=0,009$ ).

Tabelle 8: Korrelation zwischen erhöhtem Insulinspiegel und Gefäßeinbruch

|  | L1    | V1    |
|--|-------|-------|
| <b>Insulinspiegel ↑</b>                          |       |       |
| <b>Signifikanz p</b>                             | 0,034 | 0,047 |
| <b>Rangkorrelationskoeffizient (Spearman; r)</b> | 0,488 | 0,474 |

Die Tabelle zeigt deutlich, wie ein erhöhter Insulinspiegel im Serum die Wahrscheinlichkeit eines Tumoreinbruchs in Blut- oder Lymphgefäße erhöhte.

Desweiteren wiesen Patientinnen mit höherem BMI auch eine höhere Wahrscheinlichkeit des Tumoreinbruchs in Blutgefäße auf mit  $r_{V1}=0,532$  und  $p_{V1}=0,034$ . Diese Korrelation ließ sich trotz des positiven Zusammenhanges zwischen Blut- und Lymphgefäßeinbruch ( $r=0,628$ ;  $p=0,001$ ) nicht auf die Wahrscheinlichkeit des Tumoreinbruchs in Lymphgefäße übertragen.

Ferner sollten Zusammenhänge zwischen der Insulinresistenz und der durch die Real-Time PCR ermittelten Genexpression ermittelt werden.

Hierbei konnte jedoch für keines der untersuchten Gene des Insulin- und Östrogenstoffwechsels wie der Östrogenrezeptor alpha, Splice-Varianten des Östrogenrezeptors beta, Enzyme der Östrogenbiosynthese oder auch beide Varianten des Adiponektinrezeptors weder positive noch negative Zusammenhänge mit der Ausprägung der Insulinresistenz festgestellt werden.

#### 4.2.3 Adiponectin

Adiponectin, ein von den Fettzellen hergeleitetes Protein, übt möglicherweise Einfluss auf die Entstehung und Prognose von Brustkrebs aus. Deshalb wurden Korrelationen zwischen diesem Adipozytokin mit Markern des Insulinstoffwechsels und Krankheitsstadien ermittelt.

Obwohl Adiponectin in den Fettzellen des Körpers synthetisiert wird, konnte keine Korrelation der beiden Adiponectinrezeptoren mit dem BMI der Patientinnen gemessen werden. Auch der Vergleich der Rezeptoren mit Insulinresistenz oder dem Alter der Patientinnen ergab keine signifikanten Ergebnisse. Lediglich beim Vergleich der Genexpression des Adiponectinrezeptors 1 mit dem Insulin like Growth factor binding pro-

tein 4 (IGFBP4), zeigte sich eine deutliche Verbindung dieser beiden Werte. Der Spearmans Korrelationskoeffizient betrug  $r=0,402$ ; das Signifikanzniveau  $p=0,042$ . Dieses Ergebnis war jedoch nicht auf den Adiponectinrezeptor 2 übertragbar.

Auch beim Vergleich zwischen dem IGF-1R mit dem Adiponectinrezeptor 1 waren deutlich signifikante Zusammenhänge zu erkennen. Der Rangkorrelationskoeffizient betrug  $r=0,445$ , die Signifikanz lag mit  $p=0,026$  auf hohem Niveau. Diese Ergebnisse trafen jedoch wiederum nicht auf den Adiponectinrezeptor 2 zu.

Am deutlichsten zeigte sich die Korrelation im Zusammenhang zwischen dem Insulinrezeptor und dem Adiponectinrezeptor1. Der Spearmans Korrelationskoeffizient ließ sich bei  $r=0,548$ , die zugehörige Signifikanz bei  $p=0,004$  festlegen.

Nahezu ebenso aussagekräftige Beziehungen ergaben sich zwischen der Genexpression des Adiponectinrezeptors 2 und dem Tumoreinbruch in Lymphgefäße. Der errechnete Korrelationskoeffizient betrug  $r=0,511$ , die zugehörige Signifikanz erreichte ein Niveau von  $p=0,013$ .

Auch der Gefäßeinbruch in die Blutbahn wies mit  $r=0,446$  und  $p=0,037$  eine enge Korrelation zum Status des Adiponectinrezeptors 2 auf.

**Tabelle 9: Korrelationen mit den Adiponectinrezeptoren**

| Adiponectin                                  | Insulinrezeptor |        |       |       |       |
|--|-----------------|--------|-------|-------|-------|
|  | IGFBP4          | IGF-1R | tor   | L1    | V1    |
| <b>Rezeptor 1</b>                            |                 |        |       |       |       |
| Signifikanz p                                | 0,042           | 0,026  | 0,004 |       |       |
| Rangkorrelationskoeffizient<br>(Spearman; r) | 0,402           | 0,445  | 0,548 |       |       |
| <b>Rezeptor 2</b>                            |                 |        |       |       |       |
| Signifikanz p                                |                 |        |       | 0,013 | 0,037 |
| Rangkorrelationskoeffizient<br>(Spearman;r)  |                 |        |       | 0,511 | 0,446 |

Zusammenfassend ist hierbei der enge Zusammenhang zwischen dem Insulinsignalweg und der Expression des Adiponectinrezeptors 1, sowie eine Korrelation des Gefäßeinbruchs mit dem Adiponectinrezeptors 2 herauszuheben.

#### 4.2.4 Tumorstadien

Weiterhin sollten Zusammenhänge zwischen dem Tumorstadium, gemessen an Tumorgroße, Lymphknotenbefall, Grading und Gefäßeinbruch in Blut- und Lymphgefäße und Patientendaten sowie mit der Genexpression der untersuchten Marker aufgezeigt werden. Hierbei fiel auf, dass weder die Größe des Primärtumors, noch der Befall der axillären Lymphknoten mit jeglichen anderen untersuchten Markern eine positive oder negative Assoziation ergab.

Der einzige Marker des Tumorstadiums, für den Korrelationen mit anderen untersuchten Parametern gefunden werden konnten, war der Gefäßeinbruch in Blut- und Lymphgefäße. Hier zeigten sich für den Einbruch in die Blutbahn (V1) die schon beschriebenen positive Korrelationen zum BMI, zum Insulinspiegel und zum Adiponectinrezeptor 2. Zusätzlich konnte eine positive Verbindung V1 zum C-Peptid gefunden werden ( $r=0,517$ ;  $p=0,028$ ). Für den Einbruch in Lymphgefäße (L1) bestand ebenfalls die schon erwähnte positive Korrelation zum Adiponectinrezeptor 2. Außerdem konnten positive Zusammenhänge von L1 zum Glukose- und Insulinspiegel im Serum gefunden werden ( $r_{\text{Glukose}}=0,538$ ;  $p_{\text{Glukose}}=0,026$ ;  $r_{\text{Insulin}}=0,488$ ;  $p_{\text{Insulin}}=0,034$ ).

#### 4.2.5 Korrelationen der Genexpression untereinander

Mit dem Spearmans Rangkorrelationskoeffizienten wurde die Genexpression sämtlicher untersuchter Gene untereinander in Beziehung gesetzt.

Es zeigte sich eine deutlich negative Korrelation zwischen  $ER\alpha$  und  $ER\beta 2$  ( $r=-0,458$ ;  $p=0,016$ ). Es konnte jedoch keine Korrelation zwischen  $ER\alpha$  und einer anderen  $ER\beta$ -Isoform gefunden werden.

Ein starker Zusammenhang zeigte sich dagegen zwischen  $ER\alpha$  und dem Insulinrezeptor ( $r=0,588$ ;  $p=0,002$ ), zwischen  $ER\alpha$  und IGF-1R ( $r=0,447$ ;  $p=0,022$ ) und zu IGFBP4 ( $r=0,378$ ;  $p=0,048$ ).

Beim Vergleich von Enzymen der Östrogenbiosynthese mit  $ER\alpha$  ergaben sich, wie auch schon bei der Korrelation dieser Enzyme mit dem Alter, unterschiedliche Ergeb-

nisse. Für STS konnte eine positive Korrelation mit ER $\alpha$  nachgewiesen werden ( $r=0,503$ ;  $p=0,007$ ), für CYP 19 konnte kein Zusammenhang mit ER $\alpha$  festgestellt werden.

Für keine andere Isoform der Östrogenrezeptoren außer für ER $\alpha$  konnte mit Genen des Insulinsignalweges eine positive oder negative Korrelation aufgezeigt werden.

Der Insulinrezeptor zeigte dagegen eine stark positive Korrelation sowohl zu IGF-1R mit  $r=0,445$  und  $p=0,026$ , als auch mit IGF-2R mit  $r=0,446$  und  $p=0,029$ . Auch beide Wachstumsfaktorrezeptoren untereinander zeigten stark positive Korrelation ( $r=0,450$ ;  $p=0,028$ ). Bezüglich IGFBP4 konnte nur für IGF-1R ( $r=0,446$ ;  $p=0,022$ ), nicht jedoch für IGF-2R eine positive Beziehung nachgewiesen werden. Auch für STS konnte eine positive Korrelation mit der Expression von IGF-1R ( $r=0,442$ ;  $p=0,027$ ) sowie mit IGFBP4 ( $r=0,653$ ;  $p<0,001$ ) nachgewiesen werden.

Für CYP 19 konnte keine Beziehung zu jeglichen Komponenten des Östrogen- oder Insulinsignalweges hergestellt werden.

**Tabelle 10: Korrelationen der Genexpression untereinander. Das Signifikanzniveau lag bei sämtlichen aufgelisteten Ergebnissen bei  $p<0,05$**

|              | ER $\alpha$ | ER $\beta$ 2 | IGFBP4 | IGFR1 | IGFR2 | INSR  | STS   | R1    |
|--------------|-------------|--------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|
| ER $\alpha$  | 1           | -,458        | 0,378  | 0,447 |       | 0,588 | 0,503 |       |
| ER $\beta$ 2 |             | 1            |        |       |       |       |       |       |
| IGFBP4       |             |              | 1      | 0,446 |       |       | 0,653 | 0,402 |
| IGFR1        |             |              |        | 1     | 0,450 | 0,445 | 0,442 | 0,445 |
| IGFR2        |             |              |        |       | 1     | 0,446 |       |       |
| INSR         |             |              |        |       |       | 1     |       | 0,548 |
| STS          |             |              |        |       |       |       | 1     |       |
| R1           |             |              |        |       |       |       |       | 1     |

Die Tabelle zeigt nochmals die Korrelationen der untersuchten Genexpression untereinander. Der hier nicht aufgelistete Adiponectinrezeptor 2 wies keinen Zusammenhang zu den anderen untersuchten Proteinen auf, weshalb er nicht in die Tabelle aufgenommen wurde.

## 5 Diskussion

Ziel der Studie war es, Auswirkungen von Menopause und Adipositas auf das Tumorgewebe zu analysieren und die Ergebnisse möglichst prognostisch nutzbar zu machen. Trotz des relativ kleinen Patientenkollektivs aus dem Klinikum Regensburg gelang es, mit Hilfe histopathologischer Marker und Genexpressionsdaten Trends im Zusammenhang mit der Entwicklung und Prognose des Mammakarzinoms aufzuzeigen. Unter Einbeziehung der relevanten Literatur sollte diskutiert werden, ob, und gegebenenfalls unter welchen weiteren Voraussetzungen, die erhaltenen molekulargenetischen Daten für diagnostische und prognostische Aussagen genutzt werden können. Insgesamt umfasste das Regensburger Patientenkollektiv 92 Probanden. Da jedoch aufgrund der angewandten Methode der Mikrodisektion für die Genexpressionsbestimmungen nur von 26 Patientinnen Material zur Verfügung stand, muss die Bedeutung von einigen der erhaltenen Befunde für das klinische Erscheinungsbild durch ein größeres Patientenkollektiv erhärtet werden.

Zunächst wurden cDNA-Sonden für die unterschiedlichen Östrogenrezeptoren, für die Enzyme der Östrogenbiosynthese, für den Insulinrezeptor und das Insulin-like Growth Factor Binding Protein 4 (IGFBP4), weiter die Insulin-like Growth Factor Rezeptoren 1 und 2 (IGF-1R und IGF-2R) und für beide Adiponectinrezeptoren konzipiert. Diese wurden im Folgenden nicht nur zur Auffindung und Quantifizierung entsprechender Gensequenzen eingesetzt, sondern sie dienten auch dazu, die Aktivität der jeweiligen Gene bei verschiedenen exogenen Dispositionen zu bestimmen. Für diese Ermittlung der Genexpressionsdaten, die von der Menge transkribierter RNA abgeleitet werden, musste zuerst möglichst native RNA aus dem spezifischen Gewebe gewonnen werden.

Mit der Mikrodisektionstechnik in Verbindung mit der Real-time PCR gelang es, sehr genaue Aussagen über unterschiedliche Genexpression des Tumorgewebes zu treffen, ohne diese durch umgebendes Brustgewebe zu verfälschen, da nur Bereiche aus dem Tumor verwendet wurden, die mindestens 75% maligne Epithelzellen enthielten. Der Nachteil war jedoch die geringe Ausbeute an RNA, weshalb insgesamt von nur 26 Patientinnen die Untersuchung der Genexpression durchgeführt werden konnte. Trotz dieser geringen Zahl konnten enge Korrelationen zwischen den untersuchten Parametern aufgezeigt und somit die starke gegenseitige Beeinflussung untermauert werden. Bestimmt wurden zunächst Korrelationen innerhalb des Östrogen Signalweges, wei-

terhin Korrelationen innerhalb des Insulin Signalweges und anschließend ihre gegenseitige Beeinflussung.

### 5.1 Östrogensignalweg

Östrogene können als grundlegender Faktor für die Entwicklung und Progression von Brustkrebs angesehen werden. Sie führen über ihren Signaltransduktionsweg zur Transkriptionsaktivierung östrogenabhängiger Gene und tragen somit zu erhöhter Zellproliferation und verminderter Apoptose von Brustkrebsgewebe bei. Gleichzeitig hemmen Östrogenmetabolite Schutzfunktionen von Phase II-Enzymen. Ein Beispiel hierfür ist die Hemmung der Catechol-O-Methyltransferase (COMT) durch Östrogen-3,4-Quinonmetabolite, wodurch entgiftende Reaktionen in geringerem Umfang katalysiert werden (Yue et al.2003).

Die Bestimmung des Östrogenspiegels aus Nüchternblut der Patientinnen war demnach zentraler Bestandteil der Untersuchungen.

So wurde zunächst der Östrogenspiegel von jüngeren und älteren Frauen miteinander in Beziehung gesetzt. Das Ergebnis, ein deutlich höherer Östrogenspiegel bei der jüngeren Altersgruppe ist nicht verwunderlich, da es um die Unterscheidung zwischen prä- und postmenopausalen Frauen geht. Interessanter ist jedoch die nun folgende Berechnung der Korrelation zwischen Alter und Östrogenrezeptoren. Einen besonders wichtigen Platz nahmen hierbei Genexpressionsstudien über das Vorkommen von unterschiedlichen Splice-Varianten der Östrogenrezeptoren ein. Da Östrogene über verschiedene Östrogenrezeptoren, mit ER $\alpha$  und ER $\beta$  als wichtigste Übergruppen, wirken können über diese Hormone unterschiedliche Reaktionen hervorgerufen werden, je nach dem, über welchen Rezeptor die Aktion läuft.

Hierbei ergaben sich sowohl für ER $\alpha$  als auch für ER $\beta$ 1 stark positive Zusammenhänge mit dem Alter der Patientinnen: im Tumorgewebe von älteren Frauen war signifikant mehr ER $\alpha$  und ER $\beta$ 1 nachweisbar, als im jüngeren Patientenkollektiv. Iwao et al. (2000) beschrieben ebenfalls ein geringeres Level von ER $\alpha$  mRNA in Brustkrebsgewebe von prämenopausalen im Vergleich zu postmenopausalen Frauen.

Weiterhin wurde untersucht, ob eine Korrelation von ER $\alpha$  und der Insulinresistenz, Insulin oder Glukose besteht. In den erhaltenen Daten konnte jedoch kein Zusammenhang erkannt werden. Daraus lässt sich der Schluss ziehen, dass die höhere Expression von ER $\alpha$  bei älteren im Vergleich zu jüngeren Patientinnen unabhängig vom Insu-



linstoffwechsel, und möglicherweise durch die niedrigeren Östrogenspiegel im Blut zu Stande kommt. Zu vergleichbaren Ergebnissen kommen Saceda et al. (1989), die ein Herunterregulieren der Östrogenrezeptorexpression durch Östrogenbehandlung publiziert haben.

Folgerichtig konnte auch keine Korrelation von ER $\beta$ 1 mit der Insulinresistenz nachgewiesen werden, da ER $\alpha$  von ER $\beta$  beeinflusst wird.

**Östrogenrezeptoren:** Bislang wurde nur auf zwei unterschiedliche Östrogenrezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$ 1 eingegangen. Sämtliche Untersuchungen sollten jedoch nicht nur auf diese beiden konzentriert werden, sondern es wurde versucht, Kenntnisse über die verschiedenen bekannten Splice-Varianten zu erhalten.

Insgesamt wurde von fünf unterschiedlichen Splice-Varianten des Östrogenrezeptors die Genexpression bestimmt. Neben ER $\alpha$  und ER $\beta$ 1 waren dies ER $\beta$ 2, ER $\beta$ 5 und ER $\beta$  $\Delta$ 125. Diese unterschiedlichen Splice-Varianten unterscheiden sich sowohl in ihrer Struktur, als auch in ihrer Funktion. Die fehlende Kenntnis über verschiedene Funktionen ist möglicherweise der Grund für widersprüchliche Meinungen über die Rolle von ER $\beta$ 2 in der Vergangenheit. Schon allein die Unterscheidung der verschiedenen Splice-Varianten ist über die meisten erwerbbaaren Antikörper nicht möglich, da diese gegen den N-Terminus gerichtet sind, sich die ER  $\beta$ -Isoformen jedoch über Differenzen am C-Terminus voneinander abgrenzen. Dem zu Folge ist auch ihre genaue biologische Bedeutung weitgehend ungeklärt (Mitter et al. 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, die Genexpression sämtlicher Splice-Varianten zueinander in Beziehung zu setzen. Die meisten Rezeptoren wiesen jedoch keinerlei Verbindung untereinander auf, einzig der Vergleich von ER $\alpha$  mit ER $\beta$ 2 zeigte eine negative Assoziation. Erklärbar wird dieses Ergebnis durch die von Saji et al. (2005) postulierte Funktion von ER $\beta$ . Demnach würde ER $\beta$  als Inhibitor von ER $\alpha$  fungieren, in dem es mit ER $\alpha$  Heterodimere bildet und dadurch dessen zellproliferativen Effekt hemmt.

In Kenntnis dieser Funktion von ER $\beta$  würde man eine positive Korrelation der ER $\beta$  mRNA mit günstigen histopathologischen Markern, wie zum Beispiel negativem Lymphknotenbefall erwarten. In Regensburger Patientenkollektiv war jedoch keine derartige Beziehung festzustellen, weder für ER $\beta$ 2, noch für eine andere Splice-Variante des Östrogenrezeptors. Damit liegen die hier gemessenen Daten im Gegensatz zu

Befunden von Bardin et al. (2004), die eine geringere Genexpression von ER $\beta$  mRNA in Krebszellen beschreiben im Vergleich zur Expressionshöhe in gutartigen Tumoren; Järvinen et al. (2000) publizierten eine Korrelation von ER $\beta$  mit negativem Lymphknotenstatus und niedrigem Grading.

Auch Skliris et al. (2003) zeigten zwar keinen vollständigen Verlust aber doch eine Abnahme der ER $\beta$  Genexpression beim Übergang von normalem Gewebe zu invasiven Krebszellen. Zu einem ähnlichen Ergebnis gelangten auch Mandusic et al. (2007). Dort wurde eine geringere Expression von ER $\beta$ 1 bei fortgeschritteneren Tumoren (T2, T3) als bei kleineren Tumoren gefunden.

Auf Grund dieser Veröffentlichungen ist die Genexpression von ER $\beta$  eventuell als signifikanter Prognosefaktor anzuerkennen. Die Tatsache, dass in dem vorliegenden Patientenkollektiv kein derartiger Zusammenhang festgestellt wurde, ist sehr wahrscheinlich auf die geringe Fallzahl zurückzuführen und würde bei einem größeren Kollektiv möglicherweise signifikant werden.

Neben dieser beschriebenen signifikanten Korrelation der Genexpression der Östrogenrezeptoren untereinander, ließen sich in den vorliegenden Untersuchungen keine weitere Korrelationen finden. Ähnlich wurden von Poola et al. (2005) signifikante Level nur für ER $\beta$ 1 und ER $\beta$ 5 beschrieben und diese waren unabhängig von der Höhe der Genexpression von ER $\alpha$ . Mandusic et al. (2007), erkennen eine negative Assoziation zwischen zwei unterschiedlichen Östrogenrezeptoren, ER $\alpha$  und ER $\beta$  $\Delta$ 5 bei postmenopausalen Brustkrebspatientinnen. Da in der hier vorliegenden Untersuchung ER $\beta$ 5 und nicht ER $\beta$  $\Delta$ 5, folglich mit unterschiedlichen Rezeptoren gearbeitet wurde, ergibt sich hieraus kein Widerspruch.

**Genexpression von Hormonen der Östrogenbiosynthese:** Nachdem verschiedene Varianten der Östrogenrezeptoren untersucht und zueinander in Beziehung gesetzt wurden, soll nun der Herkunft des Substrates selbst, dem Östrogen, Aufmerksamkeit geschenkt werden.

Im Regensburger Patientenkollektiv wurde die Genexpression von Hormonen der Östrogenbiosynthese, Aromatase (CYP 19) und Steroid Sulfatase (STS) gemessen und die Ergebnisse in die Korrelationsbestimmungen mit einbezogen. Da für die 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase mit der Methode der Real-time PCR keine relevante

Genexpression im untersuchten Gewebe festgestellt werden konnte, entfiel dieses Enzym für die Korrelationsbestimmungen. Dennoch darf dessen Rolle für die endogene Östrogenproduktion nicht vernachlässigt werden. Ob die fehlende Expression tatsächlich auf einem fehlenden bzw. minimalen Vorkommen im untersuchten Gewebe beruht, oder ob die eingesetzte Methode nicht sensitiv genug war, ist derzeit offen. Um somit nicht möglicherweise auf einem Messfehler beruhende Ergebnisse in die Gesamtuntersuchung einzubringen, wurden die Korrelationsbestimmungen komplett ohne dieses Enzym ausgeführt.

Für die beiden verbleibenden Enzyme wurde im Folgenden parallel zum Östrogenspiegel versucht, Korrelationen mit dem Alter aufzuzeigen.

Bei der Untersuchung der Aromatase konnte keine Veränderung mit dem Alter festgestellt werden, für STS ergab sich jedoch ein Hinweis für eine positive Korrelation mit steigendem Alter. Berücksichtigt man die steigende Expression von ER $\alpha$  mit dem Alter, so lässt sich hieraus die Folgerung ziehen, dass möglicherweise eine höhere Expression von ER $\alpha$  für die Aktivierung der Genexpression von STS verantwortlich ist. Dieser Schluss wird durch Beobachtungen von Zaichuk et al. (2007) untermauert, deren Ergebnisse auf eine Kontrollfunktion von Östrogenen bezüglich STS hinweisen. Dazu passt auch die im Regensburger Patientenkollektiv festgestellte starke Assoziation zwischen STS und ER $\alpha$ .

Kein Zusammenhang ließ sich zwischen CYP 19 und ER $\alpha$  erkennen. Dies bestätigt Befunde von Reed et al. (2005). Santner et al. (1984) konnten belegen, dass zehnmal mehr E1 aus E1S entsteht, als aus Androstendion unter Mitwirkung der Aromatase, womit der Sulfatase Signalweg in Brustkrebszellen für die endogene Östrogensynthese als wichtigere Quelle erscheint, als die Synthese über Aromatase. Yoshimura et al. (2004) konnten jedoch einen Zusammenhang zwischen niedriger Expression von CYP 19 mRNA mit schlechter Krankheitsprognose herstellen. Dieses paradoxe Ergebnis könnte einerseits durch beginnende Hormonunabhängigkeit des Tumors erklärt werden, andererseits spiegelt es möglicherweise auch die frühere Behandlung der Patientinnen mit Aromatasehemmern wieder.

Überraschenderweise konnte kein Zusammenhang zwischen dem Östrogenspiegel im Serum und STS oder Aromatase festgestellt werden. Es wurde jedoch wiederholt gezeigt, dass Brustkrebsgewebe bis zu zwanzigfach mehr Östrogen enthält, als im peripheren Blut vorhanden ist. Dieses Östrogen muss aus endogener Produktion über STS und Aromatase stammen. Es ist daher nur folgerichtig, dass unterschiedliche

Studien eine hohe Expression von STS mRNA mit schlechterer Prognose und kürzerem krankheitsfreiem Überleben in Verbindung bringen (Utsumi et al. 1999; Miyoshi et al. 2003). Da auch im Regensburger Patientenkollektiv der positive Zusammenhang zwischen STS und dem zellproliferativ wirkenden ER $\alpha$  bestand, darf die Expressionshöhe von STS mRNA für die Prognose genutzt werden.

## 5.2 Insulinsignalweg

**Wechselwirkung des Insulin/IGF Signalwegs mit Östrogenen:** Neben der Rolle der Östrogene war auch der Insulin/IGF-Signalweg und im Besonderen das Zusammenspiel dieser beiden Achsen Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

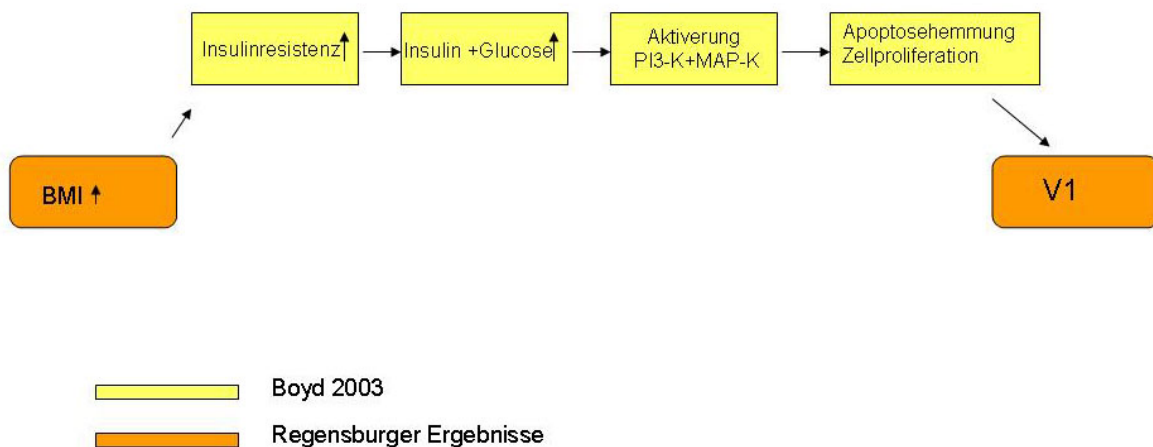
Östrogene und Insulin/IGF beeinflussen sich gegenseitig, dabei sind nicht nur additive Effekte, sondern auch eine Potenzierung ihrer zellproliferierenden Wirkung beschrieben worden (van der Burg et al. 1988). Beispielsweise kann ER $\alpha$ , so lange Östrogen als Ligand gebunden ist, das Insulin Receptor Substrate-1' (IRS-1) aktivieren. Dies wiederum kann, wie in Abbildung 5 schematisch dargestellt ist, die MAP-Kinase und die PI3-Kinase aktivieren, was erhöhte Zellproliferation und verminderte Apoptose nach sich zieht. Auf der anderen Seite kann jedoch auch durch Insulin der Östrogen Signalweg angeregt werden. Dabei wird ER $\alpha$  durch den Insulin Signalweg phosphoryliert und in Abwesenheit des eigentlichen Substrates Östradiol aktiviert.

Diese Wechselwirkungen konnten auf Grundlage der am Regensburger Patientenkollektiv ermittelten Daten weiter untermauert werden. Viele Studien haben bereits den Zusammenhang zwischen Übergewicht, Diabetes Typ 2 und Brustkrebs beschrieben (Dumitrescu et al. 2005; Pfeiler et al. 2006; Rose et al. 2004).

Da bei postmenopausalen Frauen die Östrogenproduktion hauptsächlich über Aromatisierung von Androgenen aus den Nebennieren abläuft (Edman et al. 1978), liegt der Schluss nahe, dass Frauen mit einem hohen BMI erhöhte Östrogen Level und somit auch ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Brustkrebs haben. Diese Theorie der Verstärkung der Östrogensynthese im peripheren Fettgewebe trifft jedoch nicht für prämenopausale Frauen zu, da vor der Menopause Östrogen hauptsächlich in den Ovarien synthetisiert wird. Die Ergebnisse von Verkasolo et al. 2001 untermauern diese These, da auch hier kein Zusammenhang zwischen BMI und Serum Östrogen Level bei prämenopausalen Frauen festgestellt werden konnte.

Im Regensburger Patientenkollektiv konnte jedoch ein Zusammenhang zwischen dem

BMI und dem Insulinspiegel festgestellt werden. Eine hohe Insulinresistenz zieht natürlicherweise hohe Level sowohl von Insulin als auch von Glukose im Blut nach sich. Beide Substanzen können über die PI 3-Kinase und die MAP-Kinase die Apoptose hemmen und die Zellproliferation induzieren (Boyd 2003). Insulin kann darüber hinaus die Expression von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), einem potenten Agens der Angiogenese, hochregulieren (Mick et al. 2002). Übereinstimmend damit konnte im Regensburger Patientenkollektiv eine positive Korrelation zwischen dem BMI und dem Tumoreinbruch in Blutgefäße ermittelt werden (Abbildung 12).



**Abbildung 12: Zusammenhänge zwischen BMI und Tumoreinbruch in Blut- und Lymphgefäße**

Darüber hinaus fand sich zusätzlich ein positiver Zusammenhang zwischen dem Insulinspiegel und dem Gefäßeinbruch in Blut- und Lymphgefäßbahn. Die Differenzierung zwischen gestörter Insulinresistenz, die mit erhöhtem Insulinspiegel einhergeht und manifestem Diabetes mellitus Typ 2, den auch Chlebowski et al. (2002) beschreiben, ist von besonderem Interesse, da Blutzuckerwerte durch geeignete Medikation oft unauffällig sein können, die Insulinresistenz jedoch weiterhin gestört ist. Gerade die gestörte Insulinresistenz ist es jedoch, die das Risiko zur Entwicklung von Brustkrebs erhöht, und zwar auch bei durch Medikation unauffälligen Blutzuckerwerten. In der 'British Women's Heart and Health Study' wird von Lawlor et al. (2004) ein enger Zusammenhang zwischen Insulinspiegel und dem Risiko zur Entwicklung von Brustkrebs beschrieben. Dies gilt gleichermaßen für Frauen in der Prä- und Postmenopause. Weiterhin zeigten sich der Nüchternblutzucker, die Insulinresistenz, manifester Diabetes mellitus und auch Gestationsdiabetes in der Eigenanamnese positiv mit der Entwick-

lung von Brustkrebs assoziiert. Hohe Insulin Serumlevel können den Insulinrezeptor herunter regulieren (Sbraccia et al. 1990) und könnten somit die Expression des Rezeptors in Brustkrebsgewebe beeinflussen. Mulligan et al. (2007) konnten jedoch keine deutliche Abnahme des Rezeptorstatus in Brustkrebsgewebe durch hohe Insulin Serumlevel erkennen. Auch in den vorliegenden Untersuchungen bestand keine Korrelation zwischen der Insulinresistenz und dem Insulinspiegel mit der Expression des Insulinrezeptors.

Eine Erklärung für diese Tatsache besteht möglicherweise in der Fähigkeit von  $ER\alpha$ , die Expression des Insulinrezeptors in Anwesenheit von Östrogen Insulinunabhängig zu erhöhen (Kahlert et al. 2000). In der vorliegenden Studie konnte eine enge positive Korrelation zwischen dem Insulinrezeptor und  $ER\alpha$  festgestellt werden, wodurch die gerade formulierte Hypothese unterstützt wird.

Für das Regensburger Patientenkollektiv ergaben sich weiterhin positive Korrelationen von  $ER\alpha$  mit IGF-1R, mit dem Insulinrezeptor und mit IGFBP4. Dadurch wird das enge Zusammenspiel des Insulin- und Östrogensignalweges, das sich auch in der gerade beschriebenen Regulation des Insulinrezeptors durch  $ER\alpha$  zeigt, weiter untermauert.

Leider konnte kein Zusammenhang zwischen Lymphknotenstatus und BMI oder Insulinresistenz gefunden werden. Dies könnte an den frühen Krankheitsstadien ohne Lymphknotenbefall liegen, in denen die meisten Patientinnen operiert wurden.

**Zusammenhang zwischen Patientinnenalter und Insulinresistenz:** Eine erhöhte Insulinresistenz ist nicht als starrer Risikofaktor für die Entwicklung von Brustkrebs zu sehen, sondern es bestehen auch deutliche Zusammenhänge mit dem Alter. Zur Erklärung dieses Zusammenhangs wird eine Studie von Andres and Tobin (1975) herangezogen, in der eine Erhöhung des Glukose Levels mit dem Alter beschrieben wird. Durch das Zusammenspiel von Hyperglykämie mit altersabhängigen Risikofaktoren, wie zum Beispiel verstärkte Adipositas oder verminderte Aktivität der  $\beta$ -Zellen des Pankreas, kommt es zur Entwicklung von altersabhängiger Glukose-Intoleranz und erhöhter Insulinresistenz (Chang and Halter 2003). Dadurch ergibt sich auch die von Hales (1997) beschriebene Tatsache, dass die Mehrzahl der Fälle von Diabetes Typ 2 im Alter von über 50 Jahren diagnostiziert wird. Auch im Regensburger Patientenkollektiv konnten wir einen Zusammenhang zwischen Insulinsensitivität und dem Alter der Patientinnen nachweisen, ebenso korrelierten BMI, Insulinspiegel und C-Peptid mit

dem Alter der Probanden.

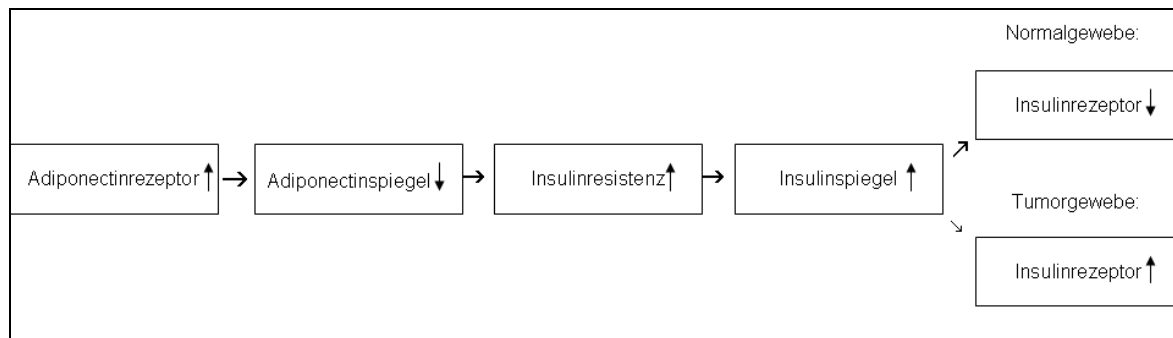
### 5.3 Einfluss von Adiponectin

Die Untersuchung von Insulinresistenz und BMI, beides wichtige Marker für die Funktion des Fettstoffwechsels, erscheint unvollständig, wenn nicht ein noch relativ unbekanntes Protein, Adiponectin, in die Berechnungen mit einbezogen wird.

Adiponectin wird ausschließlich von Adipozyten synthetisiert. Seine Funktion besteht darin, Muskel- und Leberzellen für Insulin sensibel zu machen (Hu et al. 1996). Dadurch erklärt sich die eigentlich paradoxe Tatsache, dass der Adiponectinspiegel bei Adipositas vermindert ist (Arita et al. 1999). Als wichtiger Indikator der Insulinsensitivität ist der Adiponectinspiegel folgerichtig bei anderen Zuständen, die mit Insulinresistenz einhergehen, wie Diabetes mellitus Typ 2 niedriger als bei Individuen mit ungestörter Glukosetoleranz (Weyer et al. 2001). Bislang sind zwei unterschiedliche Adiponectinrezeptoren bekannt, die in verschiedenen Geweben exprimiert werden. Deshalb war es wichtig, beide Rezeptoren getrennt voneinander zu untersuchen.

Zuerst sollte geklärt werden, ob ein Zusammenhang zwischen den verschiedenen Adiponectinrezeptoren mit Komponenten des Insulin/IGF-Signalweges besteht. Hierbei konnte eine positive Korrelation zwischen dem Adiponectinrezeptor 1, nicht jedoch mit dem Adiponectinrezeptor 2, mit dem Insulinrezeptor erkannt werden. Eine hohe Dichte an Substrat zieht jedoch normalerweise eine Herabregulierung des Rezeptors nach sich und umgekehrt. Besteht nun eine hohe Genexpression des Adiponectinrezeptors, könnte man von einer niedrigen Dichte des Substrates, also Adiponectin, ausgehen. Niedrige Adiponectinspiegel wiederum ziehen eine erhöhte Insulinresistenz nach sich. Diese hohe Insulinresistenz geht wiederum mit erhöhten Insulinspiegeln und einer verminderten Expression des Insulinrezeptors einher (Abbildung 13).

In Kenntnis dieses Zusammenspiels müsste nun eigentlich eine hohe Genexpression des Adiponectinrezeptors mit niedriger Expression des Insulinrezeptors einhergehen.



**Abbildung 13: Regulation des Insulinrezeptors in Normalgewebe und in Brustkrebsgewebe**

Wie die vorliegenden Ergebnisse zeigen, fand sich beim Regensburger Patientenkollektiv gerade der umgekehrte Zusammenhang. Zur Klärung dieses Widerspruchs, wurde untersucht, ob im Patientenkollektiv die erwartete negative Assoziation zwischen dem Insulinrezeptor und der Insulinresistenz besteht. Überraschenderweise konnte jedoch keinerlei Zusammenhang festgestellt werden. Damit bestätigen die vorliegenden Ergebnisse Daten von Mulligan et al. (2007), die eine fehlende Herunterregulierung des Insulinrezeptors durch hohe Insulinlevel in Brustkrebsgewebe beschrieben haben (Abbildung 13).

Als Erklärung für diese fehlende Herabregulation, könnte wieder ER $\alpha$  herangezogen werden. Möglicherweise besitzt dieser Östrogenrezeptor die Fähigkeit, die Expression des Insulinrezeptors in Anwesenheit von Östrogen Insulinunabhängig zu erhöhen, wie von Kahlert et al. (2000) vorgeschlagen. Die in der vorliegenden Untersuchung beschriebene Korrelation zwischen INSR und ER $\alpha$  unterstützt diese These und gibt somit eine Erklärung für die positive Assoziation zwischen dem Adiponectinrezeptor und dem Insulinrezeptor.

Weiterhin fanden sich positive Korrelationen des Adiponectinrezeptors 1 sowohl mit IGF-1R als auch mit IGFBP4. Auch Tworoger et al. (2007) beschreiben eine positive Assoziation von freiem IGF-1 mit Adiponectin im Serum bei übergewichtigen Frauen. Bringt man hier wieder die inverse Beziehung von Substrat und Rezeptor ins Spiel, ist dieses Ergebnis mit der hier postulierten Beziehung der beiden Rezeptoren zueinander, vergleichbar. Neben Tworoger beschrieben Vilarrasa et al. (2005) einen positiven Zusammenhang zwischen Adiponectin und IGF-1 bei Frauen.

Bezüglich der verschiedenen IGF-Bindeproteine ist lediglich für IGFBP-1 eine starke Assoziation zu Blutspiegeln von Adiponectin publiziert (Tworoger et al. 2007). Diese Korrelation ist erklärbar durch die Regulierung, die Insulin auf das Bindeprotein ausübt



(Kelley et al. 1996). Da Adiponectin die Sensitivität von Insulin erhöht, folgt hieraus die Erhöhung von IFGBP-1 durch niedrige Insulinspiegel.

#### **5.4 Korrelation der molekularen Daten mit der Tumorentwicklung**

Nachdem bislang vorwiegend auf Risikofaktoren für die Entstehung von Brustkrebs eingegangen wurde, soll im Folgenden die Tumorentwicklung näher betrachtet werden.

Ein wichtiges Ziel der Studie war die Frage, in wie weit das Tumorstadium, gemessen anhand Gefäßinvasion und Grading, mit molekularen Kennzeichen der Erkrankung korreliert. Hier kann nochmals die Korrelation zwischen erhöhtem Insulinspiegel und dem Gefäßeinbruch in Blut- und Lymphgefäße herangezogen werden, die über die Fähigkeit von Insulin erklärt wurde, über die MAP-Kinase und die PI-3 Kinase anti-apoptotisch und zellproliferierend zu wirken. Daneben zeigte auch der Adiponectinrezeptor 2 sowohl mit dem Gefäß-, als auch mit dem Lymphgefäßeinbruch einen positiven Zusammenhang. Dieses Ergebnis beruht möglicherweise auf ähnlichen physiologischen Gegebenheiten, wie die positive Korrelation mit dem Insulinspiegel: eine hohe Expression des Adiponectinrezeptors lässt auf niedrige Serumwerte schließen, die wiederum mit hoher Insulinresistenz zusammenhängen, für die gerade die positive Korrelation mit dem Gefäßeinbruch gezeigt wurde. Dass niedrige Adiponectinlevel allgemein mit erhöhtem Risiko für Brustkrebs und schlechterer Krankheitsprognose einhergehen, haben bereits unterschiedliche Studien gezeigt (Mantzoros et al. 2004; Miyoshi et al. 2003).

**Abhängigkeit des Tumorstadiums von IGF-1R und IGF-2R:** Da niedrige Serumlevel von Adiponectin mit erhöhter Insulinresistenz zusammenhängen, versuchten wir, auch weitere Faktoren des Insulinsystems für die Krankheitsprognose heranzuziehen. Als einzige Assoziation fand sich eine negative Korrelation des Lymphknotenbefalls mit dem IGF-2 Rezeptor, ein Ergebnis, das wahrscheinlich aufgrund der kleinen Probenzahl nur eine geringe Tendenz zeigte und nicht signifikant war. Ließe sich die bereits bei der geringen Fallzahl gefundene Tendenz mit höheren Patientenzahlen absichern, so ergäbe sich eine wertvolle Unterstreichung der Ergebnissen von Mulligan et al. (2007). In deren Studie wurde ein Zusammenhang zwischen hoher Expression des

Insulinrezeptors mit günstigen prognostischen Markern, wie niedrigem Grading und negativem Lymphknotenstatus beschrieben. Aus der Summe der neuen und publizierten Befunde erscheint es wahrscheinlich, dass die Messung der Aktivität des IGF-2R Rezeptors für eine Prognose genutzt werden kann.

Da auch die Aktivitäten der IGF-1 und IGF-2 Rezeptoren beim Regensburger Patientenkollektiv signifikant positiv korrelierten, besteht somit die Wahrscheinlichkeit, dass eine hohe Expression von IGF-1R oder IGF-2R für einen niedrigen Befall der Lymphknoten spricht.

Unterstützt wird diese These weiterhin durch die Ergebnisse von Koda et al. (2003). Sie beschreiben eine inverse Korrelation zwischen IGF-1R und Lymphknotenbefall.

Die These, dass IGF-1R und/oder IGF-2R als prognostische Marker genutzt werden können, wird auch von Mulligan et al. (2007) geteilt, die eine hohe Expression des Insulinrezeptors für eine günstige Prognose heranziehen. Schließlich war auch der Insulinrezeptor mit IGF-1R und IGF-2R in der hier vorgelegten Untersuchung signifikant positiv korreliert, was die Qualität dieser Marker für eine Prognose weiter deutlich erhöht.

### **5.5 Korrelation zwischen Östrogen- und Insulinsignalweg**

Sowohl Östrogene wie auch Faktoren des Insulinsignalweges können im Einzelnen kanzerogen wirken, Ziel der Studie war es jedoch, Verbindungen zwischen diesen Wegen aufzuzeigen.

So konnte beispielsweise im Regensburger Patientenkollektiv eine enge positive Korrelation zwischen IGF-1R und STS nachgewiesen werden. Chong et al. (2006) beschrieben eine Assoziation von IGF-1 mit STS, sowohl für Östrogenrezeptor positive, als auch für Östrogenrezeptor negative Tumoren. Da eine Erhöhung des IGF-1 Rezeptors durch Behandlung der Zelllinien mit IGF-1 aufgezeigt wird, kann für unser Ergebnis eine Übereinstimmung mit Chong et al. (2006) postuliert werden. Auch Hwa et al. (1999) konnten zeigen, dass die Aktivität von STS in MCF-7 Zellen durch Behandlung mit IGF-1 und IGF-2 signifikant erhöht wurde.

Schließlich konnte im Regensburger Patientenkollektiv ein positiver Zusammenhang zwischen IGF-1R und IGFBP4 gezeigt werden; auch IGFBP4 und STS korrelierten miteinander. Dies lässt auf eine enge Wechselbeziehung des Insulinstoffwechsels mit der Östrogensignalkaskade schließen.

## **5.6 Ausblick**

Die aufgezeigten Ergebnisse ermutigen dazu, die Untersuchung mit größeren Fallzahlen fortzusetzen, um Zusammenhänge, die bisher nur einen Trend aufwiesen, zu bekräftigen. Ebenso könnten weitere Techniken, wie beispielsweise der Microarray, angewendet werden, um bislang nicht beachtete Proteine, deren Aktivitätsbestimmung in der vorliegenden Arbeit nicht möglich war, in die Untersuchung mit einbeziehen zu können. Weiterhin könnten neben Adiponectin auch andere Adipozytokine, wie Leptin oder Resistin als mögliche Prognosefaktoren herangezogen werden.

## 6 Zusammenfassung

Adipositas und Insulinresistenz gelten als gesicherte Risikofaktoren für die Entwicklung von Brustkrebs bei postmenopausalen Frauen. Dieser Effekt beruht zum Teil auf der erhöhten Aktivität von Aromatase im peripheren Fettgewebe. In der vorliegenden Arbeit sollten die Auswirkungen von Menopause und Insulinresistenz auf das Tumorgewebe untersucht werden.

Insgesamt konnten 92 Frauen mit neu diagnostiziertem Mammakarzinom in die Studie aufgenommen werden, von denen Blutproben zur Bestimmung des Nüchternblutzuckers und des Östrogenspiegels im Serum vorlagen. Als Material für die Untersuchung der Genexpression dienten Tumorgewebeproben von 26 Frauen. Nach Mikrodissektion dieser Proben wurde RNA isoliert und die Expression von insgesamt 15 verschiedenen Genen bestimmt. Nach Analyse wurden diejenigen mit der höchsten Aktivität (Östrogenrezeptoren  $\alpha$ ,  $\beta 1$  und  $\beta 2$  [ER $\alpha$ , ER $\beta 1$  und ER $\beta 2$ ], Insulinrezeptor [INSR], Insulin-like Growth Factor-Rezeptor 1 und 2 [IGF-1R und IGF-2R], Insulin-like Growth Factor Binding Protein 4 [IGFBP4], Adiponectinrezeptor 1 und 2 [R1 und R2] und die Enzyme der Östrogenbiosynthese, Aromatase [CYP 19] und Steroid Sulfatase [STS]) in weitergehende Untersuchungen einbezogen.

Erwartungsgemäß wurde ein höherer Östrogenspiegel im Serum der bis 50-jährigen Frauen im Vergleich zu einem deutlich niedrigeren Hormonspiegel der über 70-jährigen Frauen gefunden. Ebenso wiesen postmenopausale Frauen im Vergleich zum jüngeren Patientenkollektiv eine signifikant höhere Expression sowohl von ER $\alpha$  wie auch von STS auf.

Zwischen den verschiedenen untersuchten Östrogenrezeptoren (ER $\alpha$  und ER $\beta 2$ ) bestand ein inverser Zusammenhang. Positive Assoziationen von ER $\alpha$  fanden sich zum Insulinrezeptor, zu IGF-1R und IGFBP4. Beim Vergleich von Enzymen der Östrogenbiosynthese und ER $\alpha$  konnte für STS eine positive Korrelation festgestellt werden. Daraus folgt - berücksichtigt man die steigende Expressionen von ER $\alpha$  und STS mit dem Alter - dass möglicherweise eine höhere Expression von ER $\alpha$  für die Aktivierung der Genexpression von STS verantwortlich ist. Für STS wurde darüber hinaus eine signifikante Korrelation sowohl zu IGF-1R als auch zu IGFBP4 errechnet. Da gleichzeitig keine direkte Korrelation zu Insulin oder C-Peptid und Blutzuckerspiegel erkannt werden konnte, muss davon ausgegangen werden, dass STS im hier gemessenen

Patientenkollektiv sowohl vom IGF-Signalweg als auch von  $ER\alpha$ , nicht jedoch von Insulin selbst beeinflusst wird.

Die Wahrscheinlichkeit für einen Gefäßeinbruch in die Blutbahn stieg mit zunehmendem BMI. Diese Beobachtung konnte jedoch nicht auf den Tumoreinbruch in die Lymphbahnen übertragen werden. Ein erhöhter Insulinspiegel im Serum führte jedoch zu gesteigertem Gefäßeinbruch in Blut- und Lymphgefäße.

Bezüglich der Tumorgroße, des Lymphknotenbefalls oder des Gradings ergaben sich keine eindeutigen Zusammenhänge mit dem Insulinspiegel bzw. der Insulinresistenz. Ebenso wenig konnten für diese Faktoren signifikant positive oder negative Assoziationen zu den weiteren untersuchten Parametern gefunden werden.

Bei der Untersuchung des Adiponectinrezeptors 1 ergaben sich positive Korrelationen für den Insulinrezeptor, IGFBP4 und IGF-1R. Demnach besteht ein enger Zusammenhang zwischen dem Insulinsignalweg und der Expression des Adiponectinrezeptors 1, nicht aber mit dem Adiponectinrezeptor 2. Für diesen stellten sich jedoch direkte Zusammenhänge mit dem Einbruch in Blut- und Lymphgefäße heraus. Aus diesen differierenden Ergebnissen muss auf unterschiedliche Funktionen der beiden bekannten Rezeptoren für Adiponectin geschlossen werden. Zwischen Insulin Serum Spiegel und der Insulinresistenz wurde kein Zusammenhang mit dem Insulin/IGF-Rezeptor oder der Expression des Adiponectinrezeptors 1 oder 2 gefunden.

Die Einzelbefunde wurden im Zusammenhang mit der aktuellen Literatur unter dem Aspekt der Kausalität und ihres prognostischen Wertes diskutiert. Dabei ergab sich, dass Adiponectin für eine verbesserte Prognosebestimmung einen wichtigen Faktor darstellt. Hierbei ist vor allem die positive Korrelation zwischen dem Adiponectinrezeptor 2 und dem Einbruch in Blut- und Lymphgefäße, die im Regensburger Patientenkollektiv festgestellt worden ist, hervorzuheben. Die Tatsache, dass eine Assoziation zwischen dem Adiponectinrezeptor 1 und IGF-1R gefunden wurde, für den bereits ein Zusammenhang mit günstiger Prognose postuliert wurde, untermauert die Hypothese von Adiponectin als signifikantem Prognosefaktor.

Die aufgezeigten Ergebnisse ermutigen dazu, die Untersuchung mit größeren Fallzahlen fortzusetzen, um Zusammenhänge, die bislang nur einen Trend aufwiesen, zu bekräftigen.

## 7. Literaturverzeichnis

- Achiwa Y, Hasegawa K, Udagawa Y (2007) Regulation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt and the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways by Ursolic Acid in Human Endometrial Cancer Cells. *Bioscience, biotechnology and biochemistry* **71**: 31-37.
- Adler S, Waterman ML, He X, Rosenfeld MG (1988) Steroid receptor-mediated inhibition of rat prolactin gene expression does not require the receptor DNA-binding domain. *Cell* **52**: 685-695.
- Ahima RS, Flier JS (2000) Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends in endocrinology and metabolism* **11**: 327-332.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2004) *Molekularbiologie der Zelle* 4. Auflage, Viley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, pp. 1019-1021.
- Andres R, Tobin JD (1975) Aging and the disposition of Glukose. *Advances in experimental medicine and biology* **61**: 239-249.
- Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y (1999) Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochemical and biophysical research communications* **257**: 79-83.
- Bardin A, Boulle N, Lazennec G, Vignon F, Pujol P (2004) Loss of ER $\beta$  expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression. *Endocrine-Related Cancer* **11**: 537-551.
- Berkey CS, Frazier AL, Gardner JD, Colditz GA (1999) Adolescence and breast carcinoma risk. *Cancer* **85**: 2279-2284.
- Beatson G (1896) On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestions for a new method of treatment with illustrative cases. *Lancet* **ii**: 104-107.
- Bloom HJ, Richardson WW (1957) Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *British journal of cancer* **11**: 359-377.
- Bond CS, Clements PR, Ashby SJ, Collyer CA, Harrop SJ, Hopwood JJ, Guss JM (1997) Structure of a human lysosomal sulfatase. *Structure* **5**: 277-289.
- Bonney RC, Scanlon MJ, Reed MJ, Jones DL, Beranek PA, James VHT (1984) Adrenal androgen concentrations in breast tumours and in normal breast tissue. The relationship to oestradiol metabolism. *Journal of steroid biochemistry* **20**: 501-504.
- Boyd DB (2003) Insulin and Cancer. *Integrative Cancer Therapies* **2**: 315-329.
- Bulun SE, Mahendroo MS, Simpson ER (1994) Aromatase gene expression in adipose tissue: relationship to breast cancer. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **49**: 319-326.
- Bulun SE, Takayama K, Suzuki T, Sasano H, Yilmaz B, Sebastian S (2004) Organisation of the Human Aromatase P450 (CYP 19) Gene. *Seminars in reproductive medicine* **22**: 5-9.
- Byrne C, Schairer C, Wolfe J, Parekh N, Salane N, Brinton LA, Hoover R, Haile R (1995) Mammographic features and breast carcinoma risk: effects with time, age, and menopause status. *Journal of the National Cancer Institute* **87**: 1622-1629.
- Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ (2003) Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *New England Journal of Medicine* **348**: 1625-1638.

- Cardona-Gomez GP, Mendez P, DonCarlos LL, Azcoitia I, Garcia-Segura LM (2001) Interactions of estrogens and insulin-like growth factor-1 in the brain: implications for neuroprotection. *Brain Research Reviews* **37**: 320-334.
- Cavalieri E, Frenkel K, Liehr JG, Rogan E, Roy D (2000) Estrogens as endogenous genotoxic agents-DNA adducts and mutations. *Journal of the National Cancer Institute* **27**: 75-93.
- Chang AM, Halter JB (2003) Aging and insulin secretion. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **284**: 7-12.
- Chapman IM, Hartman ML, Pieper KS, Skiles EH, Pezzoli SS, Hintz RL, Thorner MO (1998) Recovery of growth hormone release from suppression by exogenous insulin-like growth factor I (IGF-I): evidence for a suppressive action of free rather than bound IGF-I. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **83**: 2836-2842.
- Chlebowski RT, Aiello E, McTiernan A (2002) Weight loss in breast cancer patient management. *Journal of clinical oncology* **20**: 1128-1143.
- Chong YM, Colston K, Jiang WG, Sharma AK, Mokbel K (2006) The relationship between the insulin-like growth factor-1 system and the oestrogen metabolising enzymes in breast cancer tissue and its adjacent non-cancerous tissue. *Breast cancer research and treatment* **99**: 275-288.
- Cleary MP, Maihle MJ (1997) The role of body mass index in the relative risk of developing premenopausal versus postmenopausal breast cancer. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **216**: 28-43.
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (2001) Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet* **358**: 1389-1399.
- Dickson RB, Lippman ME (1988) Control of human breast cancer by estrogen, growth factors, and oncogenes. *Cancer Treatment and Research* **40**: 119-165.
- Dumitrescu RG, Cotarla I (2005) Understanding breast cancer risk – where do we stand in 2005? *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **1**: 208-221.
- Durand B, Saunders M, Gaudon C, Roy B, Losson R, Champon B (1994) Activation function 2 (AF-2) of retinoic acid receptor: presence of a conserved autonomous constitutive activating domain and influence of the nature of the response element on AF-2 activity. *EMBO Journal* **13**: 5370-5382.
- Easton D, Ford D, Peto J (1993) Inherited susceptibility to breast cancer. *Cancer surveys* **18**: 95-113.
- Edman CD, Aiman EJ, Porter JC, MacDonald PC (1978) Identification of the estrogen product of extraglandular aromatization of plasma androstendione. *American journal of obstetrics and gynecology* **130**: 439-447.
- Forman BM, Samuels HH (1990) Interactions among a subfamily of nuclear hormone receptors: the regulatory zipper model. *Molecular Endocrinology* **4**: 1293-1301.
- Funahashi T, Nakamura T, Shimomura I, Maeda K, Kuriyama H, Takahashi M, Arita Y, Kihara S, Matsuzawa Y (1999) Role of adipocytokines on the pathogenesis of atherosclerosis in visceral obesity. *Internal medicine (Tokyo, Japan)* **38**: 202-206.
- Gunnarsson C, Olsson BM, Stål O (2001) Abnormal expression of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases in breast cancer predicts late recurrence. *Cancer Research* **61**: 8448-8451.
- Gustavsson JA, Warner M (2000) Estrogen receptor  $\beta$  in the breast: role in estrogen responsiveness

- and development of breast cancer. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **74**: 245-248.
- Hahn D (2008) Moderne Brustkrebsdiagnostik. *Bayerisches Ärzteblatt* **2**: 72-76.
- Hales CN (1997) Non-insulin-dependent diabetes mellitus. *British Medical Bulletin* **53**: 109-122.
- Hamelers IHL, Steenbergh PH (2003) Interactions between estrogen and insulin-like growth factor signalling pathways in human breast tumor cells. *Endocrine-Related Cancer* **10**: 331-345.
- Hankinson SE, Willett WC, Michaud DS, Manson JE, Colditz GA, Longcope C, Rosner B, Speizer FE (1999) Plasma prolactin levels and subsequent risk of breast cancer in postmenopausal women. *Journal of the National Cancer Institute* **91**: 629-634.
- Hanstein B, Djanhansouzi S, Dall P, Beckmann MW, Bender G (2004) Insights into the molecular biology of the estrogen receptor define novel therapeutic targets for breast cancer. *European Journal of Endocrinology* **150**: 243-255.
- Harvie M, Hooper L, Howell AH (2003) Central obesity and breast cancer risk: a systematic review. *Obesity reviews: an official journal of the International Association for the Study of Obesity* **4**: 157-173.
- Helle SI (2004) The insulin-like growth factor system in advanced breast cancer. *Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism* **18**: 67-79.
- Hu E, Liang P, Spiegelman BM (1996) Adipo1 is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *The Journal of biological chemistry* **271**: 10697-10703.
- Hulka BS, Moorman PG (2001) Breast cancer: hormones and other risk factors. *Maturitas* **38**: 103-113.
- Huynh H, Nickerson T, Pollak M, Yang X (1996) Regulation of Insulin-like growth factor I receptor expression by the pure antiestrogen ICI182780. *Clinical Cancer Research* **2**: 2037-2042.
- Hwa IA, Reimann K, Lim PK, Lai LC (1999) Effects of insulin-like growth factors I and II on oestrone sulphatase activity in human breast cancer cell lines. *International journal of molecular medicine* **4**: 175-178.
- Iwao K, Miyoshi Y, Egawa C, Ikeda N, Tsukamoto F, Noguchi S (2000) Quantitative Analysis of Estrogen Receptor- $\alpha$  and - $\beta$  Messenger RNA Expression in Breast Carcinoma by Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Cancer* **89**: 1732-1738.
- James VHT, McNeill JM, Lai LC, Newton CJ, Ghilchik MW, Reed MJ (1987) Aromatase activity in normal breast and breast tumor tissue: *in vivo* and *in vitro* studies. *Steroids* **50**: 269-279.
- Järvinen TAH, Peltö-Huikko M, Holli K, Isola J (2000) Estrogen Receptor  $\beta$  is Coexpressed with ER $\alpha$  and PR and Associated with Nodal Status, Grade, and Proliferation Rate in Breast Cancer. *American Journal of Pathology* **156**: 29-35.
- Jefcoate CR, Liehr JG, Santen RJ, Sutter TR, Yager JD, Yue W, Santner SJ, Tekmal R, Demers L, Pauley R, Naftolin F, Mor G, Berstein L (2000) Tissue-specific synthesis and oxidative metabolism of estrogens. *Journal of the National Cancer Institute monograph* **27**: 95-112.
- Kahlert S, Nuedling S, van Eickels M, Vetter H, Meyer R, Grohe C (2000) Estrogen receptor alpha rapidly activates the IGF-1 receptor pathway. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 18447-18453.
- Kandiah M, Tan PC (2004) Inverse relationship between body mass index and premenopausal breast cancer risk in Malaysian women. *Asia Pacific journal of clinical nutrition* **13**: 171
- Karow T, Lang-Roth R (2005) *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie* S.30



- Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, et.al. (1995)  
Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase.  
*Science* **270**: 9535-9542.
- Kelley KM, Oh Y, Gargosky SE, Gucev Z, Matsumoto T, Hwa V, Ng L, Simpson DM,  
Rosenfeld RG (1996) Insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs) and their regulatory  
dynamics. *The international journal of biochemistry and cell biology* **28**: 619-637.
- Koda M, Sulkowski S, Garofalo C, Kanczuga-Koda L, Sulkowska M, Surmacz E (2003) Expression of  
the insulin-like growth factor-I receptor in primary breast cancer and lymph node metastases:  
correlations with estrogen receptors alpha and beta. *Hormone and metabolic research* **35**: 794-  
801.
- Kroboth PD, Salek FS, Pittenger AL, Fabian TJ, Frye RF (1999) DHEA and DHEAS: a review. *Journal of  
clinical pharmacology* **39**: 327-348.
- Kuhl H (2005) Breast cancer risk in the WHI study: the problem of obesity. *Maturitas* **51**: 83-97.
- Kumar V, Green S, Staub A, Chambon P (1986) Localisation of the oestradiol-binding and putative  
DNA-domains of the human oestrogen receptor. *EMBO Journal* **5**: 2231-2236.
- Labrie F, Luu-The V, Lin S-X, Labrie C, Simard J, Breton R, Belanger A (1997) The key role of 17 $\beta$ -  
hydroxysteroid dehydrogenases in sex steroid biology. *Steroids* **62**: 148-158.
- Lahmann PH, Hoffmann K, Allen N, van Gils CH, Khaw KT, Tehard B, Berrino F, Tjønneland A, Bigaard  
J, Olsen A, Overvad K, Clavel-Chapelon F, Nagel G, Boeing H, Trichopoulos D, Economou G,  
Bellos G, Palli D, Tumino R, Panico S, Sacerdote C, Krogh V, Peeters PH, Bueno-de-Mesquita  
HB, Lund E, Ardanaz E, Amiano P, Pera G, Quiros JR, Martinez C, Tormo MJ, Wirfalt E, Ber-  
glund G, Hallmans G, Key TJ, Reeves G, Bingham S, Norat T, Biessy C, Kaaks R, Riboli E  
(2004) Body size and breast cancer risk: findings from the European Prospective Investigation  
into Cancer And Nutrition (EPIC). *International journal of cancer* **111**: 762-771.
- Lawlor DA, Smith GD, Ebrahim S (2004) Hyperinsulinaemia and increased risk of breast cancer: find-  
ings from the British Women's Heart and Health Study. *Cancer causes & control: CCC* **15**: 267-  
275.
- Lee AV, Jackson JG, Gooch JL, Hilsenbeck SG, Coronado-Heinsohn E, Osborne CK, Yee D (1999)  
Enhancement of insulin-like growth factor signalling in human breast cancer: estrogen regulation  
of insulin receptor substrate-1 expression *in vitro* and *in vivo*. *Molecular Endocrinology* **13**: 787-  
796.
- Levin ER (2001) Cell localization, physiology, and nongenomic actions of estrogen receptors. *Journal of  
Applied Physiology* **91**: 1860-1867.
- Leygue EH, Dotzlaw H, Watson PH, Murphy LC (1998) Altered estrogen receptor alpha and beta mes-  
senger expression during human breast tumorigenesis. *Cancer Research* **58**: 3197-3201.
- Lipton A, Santen RJ, Santner SJ, Harvey HA, Sanders SI, Matthews YL (1992) Intratumoral aromatase  
as a prognostic factor in human breast carcinoma. *Cancer* **70**: 1951-1955.
- Löffler G (1998) *Basiswissen Biochemie* 3. Auflage, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, p.  
363.
- Longcope C, Baker R, Johnston CC Jr. (1986) Androgen and estrogen metabolism: relationship to obe-

- sity. *Metabolism* **35**: 235-237.
- Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K (1996) cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (adipose most abundant gene transcript 1). *Biochemical and biophysical research communications* **221**: 286-289.
- Maggiolini M, Donze O, Jeannin E, Ando S, Picard D (1999) Adrenal androgens stimulate the proliferation of breast cancer cells as direct activators of estrogen receptor  $\alpha$ . *Cancer Research* **59**: 4864-4869.
- Mandusic V, Nikolic-Vukosavljevic D, Tanic N, Kanjer K, Neskovic-Konstantinovic Z, Celeketic D, Dimitrijevic B (2007) Expression of estrogen receptor beta wt isoform (ERbeta1) and ERbeta-Delta5 splice variant mRNAs in sporadic breast cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology* **133**: 571-579.
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, et. al. (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83**: 835-839.
- Mantzoros C, Petridou E, Dessypris N, Chavelas C, Dalamaga M, Alexe DM, Papadiamantis Y, Markopoulos C, Spanos E, Chrousos G, Trichopoulos D (2004) Adiponectin and Breast Cancer Risk. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **89**: 1102-1107.
- McPherson K, Steel CM, Dixon JM (2000) ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ* **321**: 624-628.
- Meinhardt U, Mullis PE (2002) The Aromatase Cytochrome P450 and Its Clinical Impact. *Hormone Research* **57**: 145-152.
- Mick GJ, Wang X, McCormick K (2002) White adipocyte vascular endothelial growth factor: regulation by insulin. *Endocrinology*: **143**: 948-953.
- Miettinen M, Mustonen M, Poutanen M, Isomaa V, Vikho R (1996) Human 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and type 2 have opposite activities in cultured cells and tissue specific expression. *Biochemical Journal* **314**: 839-845.
- Mitter D, Ortmann O, Treeck O (2005) Östrogenrezeptor- $\beta$ -Isoformen – Funktionen und klinische Bedeutung bei Brustkrebs. *Zentralblatt für Gynäkologie* **126**: 1-7.
- Miyoshi Y, Ando A, Hasegawa S, Ishitobi M, Tagouchi T, Tamaki Y, Nogouchi S (2003) High expression of steroid sulfatase mRNA predicts poor prognosis in patients with estrogen receptor-positive breast cancer. *Clinical Cancer Research* **9**: 2288-2293.
- Miyoshi Y, Funahashi T, Kihara S, Taguchi T, Tamaki Y, Matsuzawa Y, Noguchi S (2003) Association of Serum Adiponectin Levels with Breast Cancer Risk. *Clinical Cancer Research* **9**: 5699-5704.
- Mulligan AM, O'Malley FP, Ennis M, Fantus IG, Goodwin PJ (2007) Insulin receptor is an independent predictor of favourable outcome in early stage breast cancer. *Breast cancer research and treatment* **106**: 39-47.
- Nakae J, Kido Y, Accili D (2001) Distinct overlapping functions of insulin and IGF-I receptors. *Endocrine reviews* **22**: 818-835.
- Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura NH, Mazda T, Tomita M (1996) Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *Journal of biochemistry* **120**: 803-812.
- Okobia MN, Bunker CH (2005) Epidemiological risk factors for breast cancer—a review. *Nigerian Jour-*

- nal of clinical practice **8**: 35-42.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P, (2005) Global cancer statistics, 2002. *A Cancer Journal for Clinicians* **55**: 74-108.
- Pfeiler GH, Latratch C, Schambeck C, Langmann T, Treeck O, Ortmann O (2006) Metabolismus und Mammakarzinom. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* **66**: 841-851.
- Poola I, Fuqua SA, DeWitty RL, Abraham J, Marshallack JJ, Liu A (2005) Estrogen Receptor  $\alpha$ -Negative Breast Cancer Tissues Express Significant Levels of Estrogen-Independent Transcription Factors, ER $\beta$ 1 and ER $\beta$ 5: Potential Molecular Targets for Chemoprevention. *Clinical cancer research* **11**: 7579-7585.
- Pujol P, Rey JM, Nirde P, Roger P, Gastaldi M, Laffargues F, Maudelonde T (1998) Differential expression of estrogen receptor-alpha and -beta messenger RNAs as a potential marker of ovarian carcinogenesis. *Cancer Research* **58**: 5367-5373.
- Ram PT, Kiefer T, Silverman M, Song Y, Brown GM, Hill SM (1998) Estrogen receptor transactivation in MCF-7 breast cancer cells by melatonin and growth factors. *Molecular and Cellular Endocrinology* **141**: 53-64.
- Reed MJ, Hutton JD, Baxendale PM, James VHT, Jacobs HS, Fisher RP (1979) The conversion of androstendione to oestrone and production of oestrone in woman with endometrial cancer. *Journal of steroid biochemistry* **11**: 905-911.
- Reed MJ, Purohit A, Woo LWL, Newman SP, Potter BLV (2005) Steroid Sulfatase: Molecular Biology, Regulation, and Inhibition. *Endocrine Reviews* **26**: 171-202.
- Renehan AG, Zwahlen M, Minder C, O'Dwyer ST, Shalet SM, Egger M (2004) Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein -3, and cancer risk: systematic review and meta-regression analysis. *Lancet* **363**: 1346-1353.
- Rinderknecht E, Humbel RE (1976) Amino-terminal sequences of two polypeptides from human serum with nonsuppressible insulin-like and cell-growth-promoting activities: evidence for structural homology with insulin B chain. *Proceeding of the National Academy of Sciences* **73**: 4379-4381.
- Robert SA, Strombom I, Trentham-Dietz A, Hampton JM, McElroy JA, Newcomb PA, Remington PL (2004) Socioeconomic risk factors for breast cancer: distinguishing individual- and community-level effects. *Epidemiology* **15**: 442-450.
- Roger P, Sahla ME, Makela S, Gustavsson JA, Baldet P, Rochefort H (2001) Decreased expression of receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors. *Cancer research* **61**: 2537-2541.
- Rose DP, Komninou D, Stephenson GD (2004) Obesity, adipocytokines, and insulin resistance in breast cancer. *Obesity reviews* **5**: 153-165.
- Ross RK, Paganini-Hill A, Wan PC, Pike MC, (2000) Effect of hormone replacement therapy on breast cancer risk: estrogen versus estrogen plus progestin. *Journal of the National Cancer Institute* **92**: 328-332.
- Saceda M, Lippman ME, Lindsey RK, Puente M, Martin MB (1989) Role of an estrogen receptor-dependent mechanism in the regulation of estrogen receptor mRNA in MCF-7 cells. *Molecular endocrinology* **3**: 1782-1787.
- Sachdev D, Yee D (2001) The IGF system and breast cancer. *Endocrine Related Cancer* **8**: 197-209.

- Saji S, Hirose M, Toi M (2005) Clinical significance of estrogen receptor beta in breast cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology* **56**: 21-26.
- Santen RJ, Martel J, Hoagland M, Naftolin F, Roa L, Harada N, Hafer L, Zaino R, Santner SJ (1994) Stromal spindle cells contain aromatase in human breast tumors. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **73**: 627-632.
- Santner SJ, Feil PD, Santen RJ (1984) *In situ* estrogen production via estrone sulfatase pathway in breast tumors: relative importance vs. the aromatase pathway. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **59**: 29-33.
- Sasano H, Harada N (1998) Intratumoral aromatase in human breast, endometrial and other malignancies. *Endocrine Reviews* **19**: 593-607.
- Sbraccia R, Wong KY, Brunetti A, Rafaeloff R, Vincenzo T, Hawley DM, Goldfine ID (1990) Insulin Down-regulates Insulin Receptor Number and Up-regulates Insulin Receptor Affinity in Cells Expressing a Tyrosine Kinase-defective Insulin Receptor. *The journal of biological chemistry* **265**: 4902-4907.
- Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF (1995) A novel serum protein similar to Clq, produced exclusively in adipocytes. *The Journal of biological chemistry* **270**: 26746-26749.
- Singletary KW, Gapstur SM (2001) Alcohol and breast cancer: review of epidemiologic and experimental evidence and potential mechanisms. *Journal of the American Medical Association* **286**: 2143-2151.
- Skliris GP, Munot K, Bell SM, Carder PJ, Lane S, Horgan K, Lansdown MR, Parkes AT, Hanby AM, Markham AF, Speirs V (2003) Reduced expression of oestrogen receptor beta in invasive breast cancer and its re-expression using DNA methyl transferase inhibitors in a cell line model. *The journal of pathology* **201**: 213-220.
- Speirs V, Walton DS, Hall M-C, Atkin S-L (1999) *In vivo* and *in vitro* expression of steroid converting enzymes in human breast tumors associations with interleukin-6. *British Journal of Cancer* **81**: 690-695.
- Spranger J, Kroke A, Mohlig M, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, Pfeiffer AF (2003) Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *Lancet* **361**: 226-228.
- Stoica A, Saceda M, Fakhro A, Joyner M, Martin MB (2000) Role of insulin-like growth factor-I in regulating estrogen receptor-alpha gene expression. *Journal of Cellular Biochemistry* **76**: 605-614.
- Strott CA (2002) Sulfonation and molecular action. *Endocrine reviews* **23**: 703-723.
- Suzuki T, Moriya T, Ariga N, Kanazawa M, Sasano H (2000) 17 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and type 2 in human breast carcinoma; a correlation to clinicopathological parameters. *British Journal of Cancer* **82**: 518-523.
- Takahashi M, Funahashi T, Shimomura I, Miyaoka Y, Matsuzawa Y (1996) Plasma leptin levels and body fat distribution. *Hormone and metabolic research* **28**: 751-752.
- Thijssen JH, Blankenstein MA (1989) Endogenous oestrogens and androgens in normal and malignant endometrial and mammary tissues. *European journal of cancer & clinical oncology* **25**: 1953-1959.

- Toft D, Gorski J (1966) A receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **55**: 1574-1581.
- Treeck O, Pfeiler G, Horn F, Federhofer B, Houlihan H, Vollmer A, Ortmann O (2007) Novel estrogen receptor beta transcript variants identified in human breast cancer cells affect growth and apoptosis of COS-1 cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* **264**: 50-60.
- Tremblay GB, Tremblay A, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Labrie F, Giguere V (1997) Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor  $\beta$ . *Molecular Endocrinology* **11**: 353-365.
- Trentham-Dietz A, Newcomb PA, Egan PM, Titus-Ernstoff L, Baron JA, Storer BE, Stampfer M, Willett WC (2000) Weight change and risk of postmenopausal breast cancer (United States). *Cancer causes & control* **11**: 533-542.
- Tworoger SS, Mantzoros C, Hankinson SE (2007) Relationship of Plasma Adiponectin With Sex Hormone and Insulin-like Growth Factor Levels. *Obesity* **15**: 2217-2224.
- Utsumi T, Yoshimura N, Takeuchi S, Ando J, Maruta M, Maeda K, Harada N (1999) Steroid sulfatase expression is an independent predictor of recurrence in human breast cancer. *Cancer Research* **59**: 377-381.
- Utsumi T, Yoshimura N, Takeuchi S, Maruta M, Maeda K, Harada N (2000) Elevated steroid sulfatase expression in breast cancer. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **73**: 141-145.
- Van den Brandt PA, Spiegelman D, Yaun SS, Adami HO, Beeson L, Folsom AR, Fraser G, Goldbohm RA, Graham S, Kushi L, Marshall JR, Miller AB, Rohan T, Smith-Warner SA, Speizer FE, Willett WC, Wolk A, Hunter DJ (2000) Pooled Analysis of Prospective Cohort Studies on Height, Weight, and Breast Cancer Risk. *American Journal of Epidemiology* **152**: 514-527.
- Van der Burg B, Rutteman GR, Blankenstein MA, De Laat SW, Van Zoelen EJ (1988) Mitogenic stimulation of human breast cancer cells in a growth factor-defined medium: synergistic action of insulin and estrogen. *Journal of cellular physiology* **134**: 101-108.
- Verkasolo PK, Thomas HV, Appleby PN, Davey GK, Key TJ (2001) Circulating levels of sex hormones and their relation to risk factors for breast cancer: a cross-sectional study in 1092 pre- and postmenopausal woman (United Kingdom). *Cancer Causes Control* **12**: 47-59.
- Vilarrasa N, Vendrell J, Maravall J, Broch M, Estepa A, Megia A, Soler J, Simón I, Richart C, Gómez JM (2005) Distribution and determinants of adiponectin, resistin and ghrelin in a randomly selected healthy population. *Clinical endocrinology* **63**: 329-335.
- Wallace TM, Levy JC, Matthews DR (2004) Use and Abuse of HOMA Modelling. *Diabetes Care* **27**: 1487-1495.
- Weiderpass E, Gridley G, Persson I, Nyren O, Ekblom A, Adami HO (1997) Risk of endometrial and breast cancer in patients with diabetes mellitus. *International journal of cancer* **71**: 360-363.
- Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, Tataranni PA (2001) Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: Close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **86**: 1930-1935.

- Yager JD, Davidson NE (2006) Estrogen Carcinogenesis in Breast Cancer. *New England Journal of Medicine* **354**: 270-282.
- Yamamoto Y, Yamashita J, Toi M, Muta M, Nagai S, Hanai N, Furuya A, Osawa Y, Saji S, Ogawa M (2003) Immunohistochemical analysis of estrone sulfatase and aromatase in human breast cancer tissues. *Oncology reports* **10**: 791-796.
- Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T (2003) Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* **431**: 1123.
- Yao J, Li Y, Chang M, Wu H, Yang X, Goodman JE, Liu X, Liu H, Mesecar AD, Van Breemen RB, Yager JD, Bolton JL (2003) Catechol estrogen 4-hydroxyequilenin is a substrate and an inhibitor of catechol-O-methyltransferase. *Chemical Research in Toxicology* **16**: 668-675.
- Yoshimura N, Harada N, Bukholm I, Kåresen R, Børresen-Dale A, Kristensen VN (2004) Intratumoral mRNA expression of genes from the oestradiol metabolic pathway and clinical and histopathological parameters of breast cancer. *Breast cancer research* **6**: 46-55.
- Yue W, Santen RJ, Wang JP, Li Y, Verderame MF, Bocchinfuso WP, Korach KS, Devanesan P, Todorovic R, Rogan EG, Cavalieri EL (2003) Genotoxic metabolites of estradiol in breast: potential mechanisms of estradiol induced carcinogenesis. *J Steroid Biochemical Molecular Biology* **86**: 477-486.
- Zaichuk T, Ivancic D, Scholtens D, Schiller C, Khan SA (2007) Tissue-specific transcripts of human steroid sulfatase are under control of estrogen signaling pathways in breast carcinoma. *The journal of steroid biochemistry and molecular biology* **105**: 76-84.
- Zheng W, Gustafson DR, Sinha R, Cerhan JR, Moore D, Hong CP, Anderson KE, Kushi LH, Sellers TA, Folsom AR (1998) Well-done meat intake and the risk of breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute* **90**: 1724-1729.

### Internetquellen:

- laborlexikon.de „HOMA-Index“ 2008 Das Lexikon der Labormedizin 22.09.2008  
<<http://www.laborlexikon.de/Lexikon/Infotext/h/HOMA-Index.htm>>
- WHO “Deaths, females, Malignant neoplasm of breast” 2007 European mortality database (MDB)  
21.09.2008 <http://data.euro.who.int>. Path: Select Parameters; Cancer mortality, 1710 Deaths (#), females, Malignant neoplasm of breast, selected countries: 0018 Germany, Years: 2007; tables: Table B.
- Zwisler R „Nichtparametrische Tests“ September 1998. Skripten zur Psychologie – Rainer Zwisler.  
17.09.2008 <<http://www.zwisler.de/edv/parfree.html>>

# Gitte Wenzel

---

Wohnort: Wittelsbacherstraße 4  
93049 Regensburg  
Telefon: 0941/26355  
e-mail: gitte.wenzel@web.de  
Geburtsdatum: 16.01.1981  
Geburtsort: Köln

## Berufserfahrung

---

Seit Oktober 2008 Assistenzärztin  
Goldbergklinik Kelheim  
Frauenklinik

## Universitätsausbildung

---

|                          |   |
|--------------------------|---|
| September 2001-Juli 2003 | Vorklinik an der Universität Regensburg                   |
| August 2003              | Physikum  |
| April 2004-Januar 2008   | Klinischer Studienabschnitt an der Universität Regensburg |
| Juni 2008                | 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung                       |

## Praktisches Jahr

---

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| Februar – April, Dezember 2007 | Abteilung für Innere Medizin,<br>Klinikum Regensburg  |
| April - August 2007            | Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe,<br>Kantonsspital Winterthur, Universität Zürich |
| August - Dez. 2007             | Abteilung für Chirurgie,<br>Frere Hospital, East London, Universität Kapstadt               |

## Famulaturen

---

|                |   |
|----------------|---|
| Februar 2004   | Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe, KKH Vilsbiburg                |
| September 2004 | Gemeinschaftspraxis für Pulmologie und Hämatologie/Onkologie Ros-<br>tock |
| März 2005      | Abteilungen für Anästhesie und für Orthopädie, KH Levanger, Norwegen      |
| September 2005 | Abteilung für klinische Chemie, Klinikum Regensburg                       |

Regensburg, den 15. Oktober 2009

## **Danksagung**

Ich möchte mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Dissertationsarbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Olaf Ortmann für die Bereitstellung des Themas und für die Möglichkeit zur Durchführung im Labor des Lehrstuhls für Gynäkologie.

Ebenso möchte ich mich bei PD Dr. Oliver Treeck und Dr. Georg Pfeiler für die sehr gute Betreuung während der Arbeit bedanken. Helena Houlihan, Gerhard Piendl und Angelika Vollmer möchte ich für das hervorragende Arbeitsklima und die Hilfe bei jeglichen Problemen im Labor danken.

Aus der Pathologie möchte ich Prof. Dr. Arndt Hartmann für die Markierung der HE-Schnitte und die Möglichkeit der Mikrodissektion an seinem Lehrstuhl danken.

Bei Monika Kerscher und Nina Niessl möchte ich mich für das Herstellen der Gewebeschnitte bedanken.

Für die Bestimmung der Blutserumwerte möchte ich mich beim Labor der klinischen Chemie bedanken.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meiner Familie und meinem Freund Alarich für ihre Unterstützung in jeglicher Art und Weise bedanken.