

**AUS DEM LEHRSTUHL FÜR FRAUENHEILKUNDE UND
GEBURTSHILFE
SCHWERPUNKT: FRAUENHEILKUNDE**

PROF. DR. OLAF ORTMANN

**DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**

**„Untersuchung von Polymorphismen in der Promotorregion des
Östrogenrezeptor- β -Gens bei Mammatumoren“**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Christina Anna Margarete Kriener

2010

**AUS DEM LEHRSTUHL FÜR FRAUENHEILKUNDE UND
GEBURTSHILFE**

SCHWERPUNKT: FRAUENHEILKUNDE

PROF. DR. OLAF ORTMANN

**DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**

**„Untersuchung von Polymorphismen in der Promotorregion des
Östrogenrezeptor- β -Gens bei Mammatumoren“**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Christina Anna Margarete Kriener

2010

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Weber

1. Berichterstatter: PD Dr. Oliver Treeck

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Rainer Straub

Tag der mündlichen Prüfung: 24.11.2010

I. Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1. Mammakarzinom.....	1
1.1.1. Epidemiologie.....	1
1.1.2. Ätiologie.....	1
1.1.3. Klassifikation.....	3
1.2. Ductales Carcinoma in situ (DCIS).....	6
1.3. Mastopathie.....	7
1.4. Fibroadenom.....	7
1.5. Östrogenrezeptoren.....	8
1.5.1. Mechanismen und Aufbau der Östrogenrezeptoren.....	10
1.5.2. Promotoren im Östrogenrezeptor- β -Gen.....	13
1.5.3. ER β -Isoformen.....	14
1.6. Single Nucleotid Polymorphismen (SNPs)	15
1.7. Ziel der Forschungsarbeit.....	16

2. Material und Methoden

2.1. Patientenkollektiv.....	18
2.2. Materialien.....	19
2.3. DNA-Isolation	20
2.4. SNP-Auswahl.....	20
2.5. PCR (Polymerase-Chain-Reaction)	21
2.6. Tetra-Primer ARMS-PCR.....	23
2.7. Agarosegelelektrophorese.....	26
2.8. Assoziationsstudien.....	28
2.9. Statistische Auswertung.....	28
2.9.1. Chi ² -Test.....	28
2.9.2. Odds Ratio.....	29
2.9.3. Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.....	30

3. Ergebnisse	
3.1. Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.....	31
3.2. Assoziation zwischen den Polymorphismen rs29879, rs3020449 und rs3020450 und klinisch-pathologischen Merkmalen der Mammakarzinom-Patientinnen.....	31
3.2.1. Assoziation der Genotypen der untersuchten SNPs mit der Tumorgröße.....	32
3.2.2. Assoziation der Genotypen der untersuchten SNPs mit dem Lymphknotenbefall der Mammakarzinom-Patientinnen.....	33
3.2.3. Assoziation der Genotypen der untersuchten SNPs mit der Tumordifferenzierung.....	33
3.2.4. Assoziation der Genotypen der untersuchten SNPs mit der HER-2-Expression.....	34
3.2.5. Assoziation der Genotypen der untersuchten SNPs mit dem Steroidhormonrezeptorstatus der Mammakarzinome.....	35
3.2.6. Assoziation der Genotypen der untersuchten SNPs mit dem Patientenalter.....	36
3.3. Vergleich der Patientinnen mit Mammakarzinom mit anderen Krankheitsentitäten der Mamma sowie Kontrollgruppen.....	37
3.3.1. Vergleich gesunde Kontrollgruppe mit Mammakarzinomen.....	37
3.3.2. Vergleich Mammakarzinome und DCIS.....	38
3.3.3. Vergleich Gesunde und DCIS.....	39
3.4. Haplotypenanalyse.....	39
4. Diskussion	
4.1. Mammakarzinome in Assoziation mit klinisch-pathologischen Kriterien.....	41
4.2. Vergleich der Gruppen untereinander.....	43
4.3. Methodik.....	46
4.4. Bedeutung und Aussichten.....	47
5. Zusammenfassung.....	49
6. Anhang	
6.1. Referenzen	
6.2. Tabellen	
6.3. Lebenslauf	
6.4. Publikation	

6.5. Danksagung

6.6. Eidstattliche Erklärung

II. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BRCA	BRest CAncer, Brustkrebsgen
C	Cytosin
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
DCIS	Ductales carcinoma in situ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	double stranded DNA, Doppelstrang-DNA
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER α/β	Östrogenrezeptor alpha/beta
ERE	Estrogen responsive element
FISH	fluorescence in situ hybridisation
G	Guanin
HER-2	human epidermal growth factor receptor 2, HER-2/neu, erb-B2, c-erbB2
HSP90	Hitzeschockprotein 90
H ₂ O	Wasser
IRS	Immunreaktiver Score
M	Molar
mA	milli Ampere
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mV	Millivolt
n	Probandenzahl
OR	Odds Ratio
p	Signifikanz, p-Wert, probability
PCR	Polymerasekettenreaktion
PR	Progesteronrezeptor
Primer	DNA-Oligonukleotid
s	Sekunde
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
ssDNA	single stranded DNA, Einzelstrang-DNA
T	Thymidin
Taq-Polymerase	Thermostabile Polymerase
TBE-Puffer	Tris-Borat-Na ₂ EDTA-Puffer
U	Unit, Einheit der Enzymaktivität
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
°C	Grad Celsius
μg	Mikrogramm, 10 ⁻⁶ g
μl	Mikroliter, 10 ⁻⁶ l

III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verteilung von ER α und ER β in verschiedenen Geweben im Menschen

Abbildung 2: Darstellung des klassischen Signalwegs von Östrogenrezeptoren

Abbildung 3: Struktureller Aufbau der Östrogenrezeptoren in ein und dreidimensionaler Darstellung

Abbildung 4: Darstellung des Domänenaufbaus der humanen ER α und ER β -Isoformen

Abbildung 5: Struktur der ER β mRNA-Isoformen 1-5

Abbildung 6: Lokalisation der untersuchten SNPs im ER β -Gen

Abbildung 7: Darstellung der exponentiellen Amplifizierung einer PCR

Abbildung 8: Schematische Abbildung der Tetra-Primer ARMS-PCR

Abbildung 9: Beispiel eines Gelelektrophoresebildes eines SNP rs3020449

IV. Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Aufzählung der wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung des Mammakarzinoms
- Tabelle 2: pTNM-Klassifikation des Mammakarzinoms 6. Auflage
- Tabelle 3: Stadiengruppierung nach FIGO- und UICC-Kriterien
- Tabelle 4: Einteilung der Risikokategorien von Mammakarzinomen
- Tabelle 5: Immunhistochemische Scores zur Hormonrezeptor-Bewertung bei Mammakarzinomen
- Tabelle 6: Van-Nuys-Prognose-Index (VNPI) für DCIS nach Silverstein 2003
- Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Reagenzien, Materialien und Geräte
- Tabelle 8: PCR Primer für die SNP-Analyse
- Tabelle 9: Überblick über die Basenpaargrößen der Estrogenrezeptor- β SNPs
- Tabelle 10: Alter, histologische Charakteristika und Rezeptorstatus der bearbeiteten Mammakarzinomfälle
- Tabelle 11: Assoziation der Genotypen der untersuchten SNPs mit der Größe der Mammakarzinome
- Tabelle 12: Assoziation der Genotypen der untersuchten SNPs mit dem Nodalstatus der Mammakarzinompatientinnen
- Tabelle 13: Assoziation der Genotypen der untersuchten SNPs mit der Tumordifferenzierung
- Tabelle 14: Assoziation der Genotypen der untersuchten SNPs mit dem HER-2-Status
- Tabelle 15: Assoziation der Genotypen der untersuchten SNPs mit dem ER α -Status
- Tabelle 16: Assoziation der Genotypen der untersuchten SNPs mit dem PR-Status
- Tabelle 17: Assoziation der Genotypen der untersuchten SNPs mit dem Alter
- Tabelle 18: Überblick über die Verteilung von Allel- und Genotypfrequenzen der einzelnen Gruppen
- Tabelle 19: Vergleich Gesunde und Karzinome
- Tabelle 20: Vergleich DCIS und Karzinome
- Tabelle 21: Vergleich Gesunde und DCIS
- Tabelle 22: Überblick über die Verteilung der häufigsten Haplotypen in den Gruppen
- Tabelle 23: Assoziation der Haplotypen mit den klinischen Daten der Karzinome
- Tabelle 24: Vergleich Gesunde und Fibroadenome
- Tabelle 25: Vergleich benigne Mammaveränderungen mit Karzinomen
- Tabelle 26: Vergleich Gesunde und Mastopathien

Tabelle 27: Vergleich Fibroadenome und Karzinome

Tabelle 28: Vergleich Mastopathien und Karzinome

Tabelle 29: Vergleich DCIS und Fibroadenome

Tabelle 30: Vergleich DCIS und Mastopathien

Tabelle 31: Vergleich Fibroadenome und Mastopathien

1. Einleitung

1.1. Mammakarzinom

1.1.1. Epidemiologie

Das Mammakarzinom stellt mit fast 60000 Neuerkrankungen und 17000 Todesfällen pro Jahr nach wie vor die häufigste bösartige Erkrankung bei Frauen dar und hat damit einen Anteil von 27,8% aller Malignomneuerkrankungen in Deutschland. Jede 8. bis 10. Frau erkrankt im Laufe ihres Lebens an dieser Tumorentität. Das durchschnittliche Risiko einer Frau liegt somit bei ca. 12%, wobei das durchschnittliche Erkrankungsalter bei etwa 62 Jahren liegt. Es wird geschätzt, dass etwa 57230 neue Mammakarzinomfälle pro Jahr auftreten. Sehr selten (<1%) kann das Mammakarzinom auch bei Männern auftreten.

Bezüglich der Sterblichkeit an Malignomen bei Frauen liegt das Mammakarzinom mit 17,8% an erster Stelle, gefolgt von den kolorektalen und den Bronchialkarzinomen. Bei Frauen im Alter zwischen 35 und 60 Jahren war jeder zweite Todesfall im Jahr 2005 krebsbedingt und 27% aller Krebstodesfälle bei Frauen in diesem Alter sind auf das Mammakarzinom zurückzuführen. Die 5-Jahres-Überlebensrate nach Diagnose liegt dank verbesserter Therapieverfahren aktuell bei etwa 83 % (Kreienberg, 2008).

1.1.2. Ätiologie

Bei der Entstehung eines Mammakarzinoms wird ein multifaktorielles Geschehen angenommen. Es ist eine Reihe von Faktoren bekannt, die das Risiko erhöhen, an einem Mammakarzinom zu erkranken. Als Wichtigste sind hierbei zunehmendes Lebensalter, benigne Brustkrankungen, die Exposition gegenüber endogenen und exogenen weiblichen Hormonen, diätetische Faktoren, und belastende Umweltfaktoren zu nennen.

Es wird vermutet, dass bestimmte genetische Prädispositionen für etwa 5-10% der Mammakarzinome verantwortlich sind. Zu den am häufigsten vererbten Genen gehören BRCA1, dem etwa in 20-40% der hereditären Mammakarzinome zu Grunde liegen und BRCA2, was in etwa 10-30% zu finden ist. Vor allem bei jungen Patientinnen spielen genetische Faktoren häufig eine entscheidende Rolle. Beispielsweise haben Frauen mit Keimbahnmutationen in einem der prädisponierenden Gene BRCA1 oder BRCA2 ein

Lebenszeitrisiko von 50–80%, an einem Mammakarzinom, von 60% an einem kontralateralen Mammakarzinom und 15-25% an einem Ovarialkarzinom zu erkranken (Goldberg und Borgen, 2006).

Besonders der Einfluss der Östrogene spielt sowohl bei der Entwicklung der Brustdrüse als auch bei der Entstehung und des Wachstums des Mammakarzinoms eine wichtige Rolle. Eine vermehrte Östrogenexposition, sowohl exogen als auch endogen, ist einer der wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung eines Mammakarzinoms. Eine vermehrte oder verlängerte Exposition durch endogene Östrogene entsteht zum Beispiel durch eine früh eintretende Menarche, späte Menopause, Nullipara oder späte erste Schwangerschaft, nicht Stillen oder Adipositas. Exogene Östrogene spielen hauptsächlich im Rahmen der postmenopausalen Hormonersatztherapie und in Form von Ovulationshemmern eine Rolle (Henderson et al, 1988; Key, 1999; Colditz et al, 1990). Hierbei ist zu erwähnen, dass das erhöhte Karzinomrisiko nur für die Zeit der aktuellen Östrogensubstitution besteht und nach Beendigung der Hormonersatztherapie wieder absinkt. Das Brustkrebsrisiko steigt dabei um etwa 4% pro Jahr während der Östrogensersatzbehandlung und liegt nach 10-jähriger Einnahme bei etwa 46%. Fünf Jahre nach Beendigung der Hormontherapie ist das Mammakarzinomrisiko aber als nicht mehr erhöht anzusehen (Gapstur et al, 1999). Das Risiko bei Einnahme von Ovulationshemmern wird allgemein kontrovers diskutiert.

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die wichtigsten Risikofaktoren des Mammakarzinoms.

Tabelle 1: Aufzählung der wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung des Mammakarzinoms (Haag P. et al, 2006; Stauber M. and Weyerstahl T., 2005)

- Fortgeschrittenes Alter
- Familiengeschichte, vermehrtes Krebsvorkommen in der Familie
- Genetische Vorbelastung (z. B. BRCA-1, BRCA-2)
- Östrogenvorkommen
- Frühe Menarche, späte Menopause, Nullipara, somit langer Östrogeneinfluss
- Exogenes Östrogen (orale Kontrazeptiva, Hormonsubstitutionstherapie)
- Höheres Alter bei erster Schwangerschaft (>30 Jahre)
- Gutartige Brusterkrankungen (Mastopathie)
- Vorangegangener Brustkrebs oder kontralaterales Mammakarzinom
- Therapeutische Bestrahlung des Brustraumes
- Fleisch- und fettreiche Ernährung
- Adipositas, besonders postmenopausal
- Vermehrter Alkoholkonsum
- Zigarettenrauchen

1.1.3. Klassifikation des Mammakarzinoms

Histologisch lassen sich die Mammakarzinome zunächst in invasive und in situ-Karzinome einteilen. Zu den in situ Karzinomen zählen das duktales Carcinoma in situ (DCIS), das lobuläre Carcinoma in situ (LCIS) und das gemischte intraduktales und lobuläre Carcinoma in situ.

Bei den invasiven Mammakarzinomen ist das invasive duktales Karzinom mit 40–75% der bei weitem häufigste Tumortyp. Die invasiven lobulären Karzinome machen ca. 5–15% der invasiven Mammakarzinome aus. Zu den selteneren Karzinomen gehören die medullären, muzinösen, papillären, tubulären, undifferenzierten und Paget-Karzinome.

Die klinische Stadieneinteilung des Mammakarzinoms erfolgt nach der FIGO- (*Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique*) bzw. TNM-Klassifikation. Diese Einteilung orientiert sich an den klinischen Befunden und der histopathologischen Untersuchung der entnommenen Proben und Lymphknoten des Operationspräparates. „T“ steht hierbei für den Tumorstatus, also die Größenausdehnung des Tumors, „N“ für den Nodalstatus, die Anzahl positiver Lymphknotenmetastasen. „M“ beschreibt die Verteilung von Metastasen außerhalb der Lymphbahnen und „V“ eine Invasion in Venen. Die 6. Auflage der TNM-Klassifikation sowie die Stadiengruppierung des Mammakarzinoms nach UICC (*Union internationale contre le cancer*) bzw. AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) -Kriterien sind in Tabelle 2 und 3 im Anhang dargestellt (Singletary und Greene, 2003).

Weiterhin wird zur exakten Einteilung des Risikos der Mammakarzinome die St.Gallener-Risikoeinteilung verwendet, welche die Karzinome in drei Risikokategorien (niedrig, mittel und hoch) einteilt (Tabelle 4).

Tabelle 4: Einteilung der Risikokategorien von Mammakarzinomen (Goldhirsch et al, 2007).

pN-Status	Niedrig	Mittel	Hoch
N0	alles erfüllt:	mind. 1 erfüllt:	
	pT≤2cm und G1 und V0 und ER+ oder PR+ und HER-2- und ≥ 35 Jahre	pT > 2 cm oder G2–3 oder V1 oder ER- und PR- oder HER-2+ oder Alter < 35 Jahre	
N+ (1-3 LK)		ER+ und/oder PR+ und HER-2-	ER- und PgR- oder HER-2+
N+(≥4 LK)			Immer

Zu den klinischen Prognosefaktoren zählen Tumorgröße, Lymphknotenbefall und Alter der Patientinnen. Neben der Tumorgröße wird auch noch das Grading, der Grad der Tumordifferenzierung nach Ellston und Ellis untersucht. Die Differenzierung des invasiven Karzinoms (G1=gut differenziert, G2=mäßig differenziert, G3=schlecht differenziert, G4=undifferenziert) beruht auf drei Kriterien (drüsige Differenzierung, Kernpleomorphie, Mitoserate). Je höher das Grading, desto aggressiver ist das Verhalten der Tumorzellen (Elston und Ellis, 2002).

Weiterhin ist im Rahmen der Primärdiagnostik von Mammakarzinomen die Bestimmung des Steroidhormonrezeptorstatus obligat, da gemäß dem St.Gallen-Konsens von 2005 zwischen hormonsensitiven und nicht-hormonsensitiven Mammakarzinomen unterschieden wird (Goldhirsch et al, 2005). Die Wirkung von Steroidhormonen, wie Östrogene und Progesteron, wird primär durch die Östrogenrezeptoren (ER) α und β sowie dem Progesteronrezeptor (PR) vermittelt. Bislang dient aber nur ER α als prognostischer Marker für das Mammakarzinom. Im Abschnitt 1.5. werden die ER genauer beschrieben.

Der Hormonrezeptorstatus von Mammakarzinomen gibt prognostische Informationen und ist ein wichtiger Vorhersagefaktor für das Ansprechen des Tumors auf eine endokrine Therapie (Murphy und Watson, 2006). So ist zum Beispiel die Höhe der ER α -Expression direkt proportional zu einem Ansprechen auf eine endokrine Therapie (Rastelli und Crispino, 2008). Auch der PR-Status ist, unabhängig von der Expression des ER α , mit einer besseren Überlebensrate assoziiert. So haben Patienten mit einem ER-positiven/PR-positiven Karzinom eine bessere Prognose als Patienten mit einem ER-positiven/PR-negativen Karzinom und diese wiederum eine bessere Prognose als ER-negative/PR-negative Karzinome (Bardou et al, 2003).

Etwa 70% von Mammakarzinomen sind sowohl ER α als auch PR positiv. Die Abwesenheit des ER α und PR spricht für ein höheres Rezidivrisiko und eine kürzere Überlebenszeit, während ein Nachweis der Rezeptoren die Wahrscheinlichkeit für das Ansprechen einer endokrinen Therapie erhöht und mit einer geringeren Sterblichkeit einhergeht (Dunnwald et al, 2007).

Die Angabe des Prozentsatzes immunhistochemisch positiv angefärbter Tumorzellkerne wird durch den international akzeptierten Allred-Score (Harvey et al, 1999) oder den immunreaktiven Score (IRS) nach Remmele und Stegner (Remmele und Stegner, 1987) angegeben. Einen Überblick zu diesen Scores gibt Tabelle 5.

Tabelle 5: Immunhistochemische Scores zur Hormonrezeptor-Bewertung bei Mammakarzinomen

Prozentsatz positiver Zellkerne		Färbeintensität		Score
Immunreaktiver Score nach Remmele et al. 1987				
Keine positiven Kerne	0 Punkte	keine Farbreaktion	0 Punkte	0–12 Punkte
< 10 % positive Kerne	1 Punkt	schwache Färbereaktion	1 Punkt	
10–50 % positive Kerne	2 Punkte	mässige Färbereaktion	2 Punkte	
51–80 % positive Kerne	3 Punkte	starke Färbereaktion	3 Punkte	
> 80 % positive Kerne	4 Punkte			
Allred-Score nach Harvey et al. 1999				
Keine positiven Kerne	0 Punkte	keine Farbreaktion	0 Punkte	0–8 Punkte
< 1 % positive Kerne	1 Punkt	schwache Färbereaktion	1 Punkt	
1–10 % positive Kerne	2 Punkte	mässige Färbereaktion	2 Punkte	
11–33 % positive Kerne	3 Punkte	starke Färbereaktion	3 Punkte	
34–66 % positive Kerne	4 Punkte			
> 66 % positive Kerne	5 Punkte			

Um einen internationalen Standard zu erreichen, wird jedoch mittlerweile der Allred-Score empfohlen (Payne et al, 2008). So wurde bisher für die Positivität als Grenzwert ein Score von größer als 2 angegeben (Gown, 2008).

Im aktuellen St. Gallen-Konsens von 2009 wurde beschlossen, dass jegliche positive Anfärbung eines Östrogen- und Progesteronrezeptors in Tumorzellkernen eine endokrine Therapie rechtfertigt (Goldhirsch et al, 2009).

Als zusätzlicher Prognoseparameter dient die Bestimmung des HER-2-Proteins (human epidermal growth factor receptor 2, HER-2/neu, erb-B2, c-erbB2). Der HER-2 Status zählt im Rahmen der Prognoseabschätzung bei Mammakarzinompatienten zu den wichtigsten Parametern. In etwa 25% der invasiven Mammakarzinome findet sich eine Überexpression des HER-2/neu-Onkoproteins. Der HER-2/neu-Status wird durch immunhistochemische Färbungen, FISH (fluorescence in situ hybridisation) oder CISH (chromogenetic in situ hybridisation) bestimmt (Goldhirsch et al, 2009). Eine Überexpression von Her-2/neu zeigt eine mögliche höhere Rezidiv- und Metastasierungsrate und somit eine schlechtere Prognose mit höherer Letalität an. In Studien konnte gezeigt werden, dass eine Her-2/neu-Überexpression mit einer geringeren Ansprechrate und einer kürzeren Ansprehdauer einer Hormontherapie eines Mammakarzinoms einhergeht (Houston et al, 1999; Rastelli und Crispino, 2008).

Andererseits dient das Onkogenprodukt (HER-2-Rezeptor) als Ziel für eine spezifische Antikörpertherapie mit dem humanisierten Antikörper Trastuzumab.

Weitere etablierte Faktoren mit ungünstiger Prognose bei Mammakarzinomen sind der Urokinase-Plasminogenaktivator (uPA) und der Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1 (PAI-1) (Annecke et al, 2008).

1.2. Duktales Carcinoma in situ (DCIS)

Das DCIS ist als intraduktale neoplastische Läsion definiert, welche durch folgende Eigenschaften charakterisiert wird: erhöhte epitheliale Proliferation, subtile bis starke zelluläre Atypien sowie eine inhärente aber nicht unbedingt obligate Tendenz der Progression zu einem invasivem Karzinom (WHO World Health Organization Classification of Tumours., 2003). Es handelt sich beim DCIS um dysplastische Zellen, die aber die Basalmembran des Milchgangs noch nicht durchbrochen haben (*in situ*). Retrospektive Langzeitbeobachtungen haben gezeigt, dass es sich bei einem DCIS um eine Präkanzerose handelt (Burstein et al, 2004). Das Risiko einer Entartung eines nicht behandelten DCIS liegt bei 30-50% (Lagios, 1995; Lebeau, 2006). Seit der Einführung des Mammographiescreenings in Deutschland wird die Diagnose DCIS immer häufiger gestellt. So liegt die DCIS-Rate bei neu diagnostizierten Mammakarzinomen bei etwa 30-40%.

Da das DCIS keine homogene Entität ist, können, wie bei den invasiven Karzinomen, anhand der Tumorzellen Merkmale wie Differenzierungsgrad (Grading) und Hormonrezeptorstatus festgelegt werden. Hinsichtlich des Rezidivrisikos kommt der operativen Entfernung mit ausreichendem Sicherheitsabstand des DCIS zu gesundem Gewebe die größte Bedeutung zu. An zweiter Stelle steht das Grading, dessen Grundlage derzeit sowohl das Graduierungsschema nach WHO (WHO 2003) als auch die Van-Nuys-Klassifikation sein kann (Tabelle 6) (Silverstein, 2003). Eine Festlegung auf eines der beiden Graduierungssysteme lässt sich derzeit nicht ausreichend durch Daten belegen (Kreienberg, 2008).

Tabelle 6: Van-Nuys-Prognose-Index für DCIS nach Silverstein 2003. Jeder prognostische Parameter (Größe, Rand, Grading) wird mit 1-3 Punkten eingestuft und addiert, so dass sich Indexwerte von mind. 3 bis max. 9 ergeben.

Scorewert	1	2	3
Größe (mm)	≤ 15	16-40	≥ 41
Abstand vom Resektionsrand (mm)	≥ 10	1-9	< 1
Pathomorphologische Klassifikation	non-highgrade, ohne Nekrosen	non-high grade mit Nekrosen	high grade mit/ohne Nekrose
Alter (Jahre)	> 60	40-60	< 40
VNPI = Scorewert (Größe + Resektionsrand + Pathologische Klassifikation + Alter)			
VNPI (Summenscore)	Rezidivrisiko		Therapieempfehlung
4-6	Niedrig		Exzision
7-9	Intermediär		Exzision und Bestrahlung
10-12	Hoch		Mastektomie

1.3. Mastopathie

Unter dem Begriff Mastopathie werden verschiedene proliferativ-hyperplastische oder regressive Umbauvorgänge der Brustdrüse zusammengefasst. Es finden sich Veränderungen ausgehend vom Drüsenepithel (Adenose) oder duktale Hyperplasien sowie vermehrte Sekretion durch Milchgangsektasien. Ursächlich sind häufig endokrine Dysregulationen die besonders im Klimakterium auftreten oder genetische Dispositionen. Sie kann sich aber auch im Rahmen metabolischer Störungen entwickeln, wie zum Beispiel die diabetische Mastopathie. Vermutlich handelt es sich vorrangig um eine Verschiebung im Östrogen-Progesteron-Gleichgewicht. Die Mastopathie ist die häufigste gutartige Veränderung der Brust, fast die Hälfte aller Frauen sind davon betroffen. Ein Altersgipfel liegt im 40.-50. Lebensjahr, was etwa dem Beginn des Klimakteriums entspricht. Meist bilden sich die mastopathischen Veränderungen nach dem Klimakterium zurück.

Aus diagnostischen und prognostischen Gründen können drei Formen der Mastopathie eingeteilt werden (nach Prechtel 1972):

- Grad I: Einfache Mastopathie ohne Epithelproliferationen (70% der Mastopathien)
- Grad II: Mastopathie mit Epithelproliferationen, aber ohne Zellatypien (20%)
- Grad III: Mastopathie mit atypischer Epitheldysplasie (=Präkanzerose), aber ohne die als Carcinoma in situ definierten Kriterien (ca. 10%)

Das Entartungsrisiko einer Mastopathie Grad III ist gegenüber der einfachen Mastopathie 3 bis 4-fach erhöht (Prechtel, 1991).

1.4. Fibroadenom

Die Fibroadenome sind mit etwa 75% die häufigsten benignen Tumoren der Mamma. Sie treten vorwiegend als juvenile Fibroadenome bei jungen Frauen auf und können sich schon während der Pubertät entwickeln. Es gibt zwei Altersgipfel, einer liegt zwischen dem 20. und dem 24. Lebensjahr, ein zweiter zwischen dem 40. und dem 44. Lebensjahr.

Das Wachstum wird durch Östrogene und Progesteron stimuliert sowie während der Schwangerschaft und Stillzeit. Postmenopausal verringert sich die Inzidenz oder es zeigen sich regressive Veränderungen in Form von Verkalkungen. Meist treten Fibroadenome als solitär tastbare, 1-3cm große, nicht schmerzhaft Knoten in der Brust auf. In 10% der Fälle

treten sie multipel auf und in 5-10% sind beide Mammae betroffen. Sie liegen peri-oder interkanalikulär in einer Bindegewebskapsel.

Unter Einnahme oraler Kontrazeption werden Fibroadenome bei Frauen weniger beobachtet, während postmenopausale Frauen unter Östrogensubstitutionstherapie ein erhöhtes Risiko haben, ein Fibroadenom zu entwickeln.

Eine maligne Entartung der Fibroadenome ist selten, obwohl es Studien gibt, in denen beschrieben wurde, dass Patienten mit Fibroadenomen ein leicht erhöhtes Risiko (< 1%) haben ein Mammakarzinom zu entwickeln (Kuijper et al, 2001; Greenberg et al, 1998).

1.5. Östrogenrezeptoren (ER)

Ende der 50er Jahre wurde erstmals die Existenz eines Rezeptormoleküls, das 17 β -Estradiol binden kann, beschrieben. 1986 folgte die Klonierung des ersten ER (Green et al, 1986; Greene et al, 1986). Zehn Jahre später, 1996, wurde von Kuiper et al. ein zweiter ER in der Prostata von Ratten beschrieben, woraufhin der erste ER α und der neue entdeckte ER β genannt wurden (Kuiper et al, 1996). Bald darauf wurde dieser auch beim Menschen nachgewiesen (Mosselman et al, 1996). Seitdem wird versucht ihren Wert als prognostische und prädiktive Faktoren, unter anderem beim Mammakarzinom, zu definieren.

ER α und ER β haben verschiedene biologische Funktionen, sowohl überlappende als auch unterschiedliche Rollen im Östrogensignalweg, was durch Genexpressionsstudien gezeigt wurde (Zhao et al, 2008). Beide Rezeptoren können in einer Vielzahl von Geweben nachgewiesen werden und sind meist koexprimiert. Sie kommen unter anderem im zentralnervösen und kardiovaskulären System, im Urogenitaltrakt, in der Brustdrüse und im Knochen vor (Abbildung 1) (Fuqua et al, 2003). Im Uterus und der Brustdrüse ist ER α ein wichtiger Östrogenrezeptor und häufiger exprimiert als ER β . ER α ist außerdem in der Leber zu finden, während im Gastrointestinaltrakt nur ER β exprimiert wird.

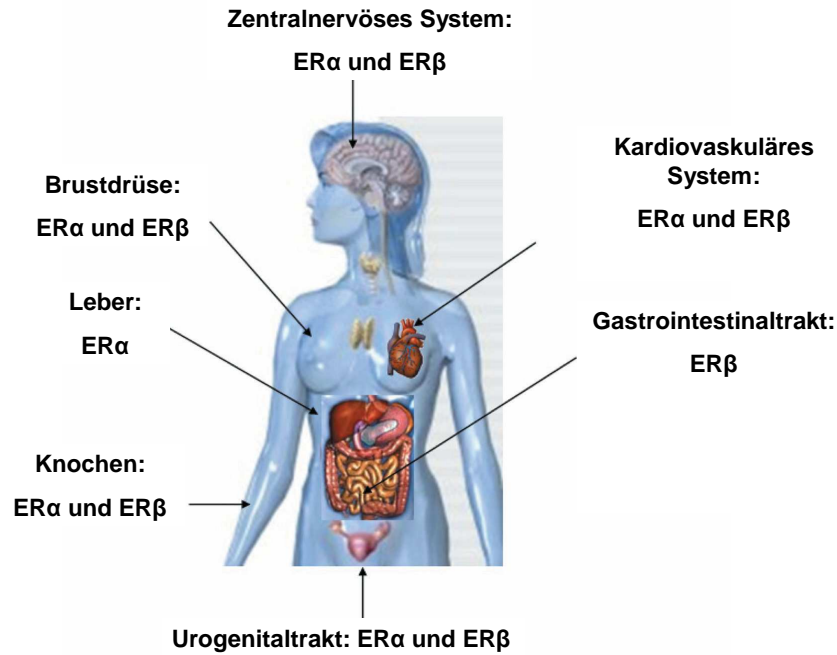


Abbildung 1: Verteilung von ERα und ERβ in verschiedenen Geweben im Menschen (nach Bai 2009).

In einigen Organen ist somit der eine oder der andere Subtyp dominant oder es kommt vor, dass beide Subtypen im gleichen Gewebe vorkommen, dort aber in verschiedenen Zelltypen (Dahlman-Wright et al, 2006; Fuqua et al, 2003; Heldring et al, 2007). Es gibt Modelle welche beide Rezeptoren agonistisch beschreiben, indem sie funktionelle Heterodimere bilden. Andere Modelle zeigen, dass ERβ eine hemmende Funktion auf ERα hat, wenn die beiden koexprimiert werden (Matthews und Gustafsson, 2003).

ERβ wird in gesundem Brustdrüsengewebe wie auch in Brusttumoren exprimiert, welche Rolle der Rezeptor aber genau spielt, ist noch nicht vollständig erforscht. Während der Karzinogenese kommt es zu einer Verminderung der ERβ-Expression, während die Expression von ERα zunimmt (Roger et al, 2001; Park et al, 2003). Diese "Downregulation" von ERβ im Mammakarzinom legt eine Rolle als Tumorsuppressor nahe. Es wurde beschrieben, dass diese Downregulation durch das epigenetische Phänomen der Methylierung des ERβ-Promotors erfolgt (Skliiris et al, 2003; Zhao et al, 2003).

Durch in vitro Studien konnte gezeigt werden, dass ERβ ein wichtiger Modulator der Proliferation von Mammakarzinomzellen ist, was die Hypothese stützt, dass der Verlust der ERβ-Produktion einer der führenden Vorgänge ist, der zur Mammakarzinomentwicklung führt (Lazennec et al, 2001).

Allgemein korreliert das Vorkommen von ER mit einer höheren Ansprechrate auf Hormontherapien und einer besseren Prognose, denn ER sind das primäre Ziel für endokrine Therapien von Brustkrebs (Ali and Coombes, 2002). Eine erhöhte Expression von ER β wurde mit einem besseren Ansprechen auf endokrine Therapien in Verbindung gebracht (Herynk and Fuqua, 2004).

1.5.1. Mechanismus und Aufbau der Östrogenrezeptoren

ER sind Proteine, die zur Superfamilie der Steroidrezeptoren gehören und als Transkriptionsfaktoren die Expression Östrogen-sensibler Elemente des Genoms induzieren. Die ER können sowohl intrazellulär als auch membranständig vorkommen und Liganden-abhängig (klassischer Weg) als auch unabhängig aktiviert werden. Im Folgenden soll kurz der klassische Signalweg beschrieben werden.

Östrogen (17 β -Estradiol=E2) diffundiert aufgrund seiner Struktur frei durch die Zellmembran und bindet an den ER, der zunächst inaktiviert als Komplex verbunden mit einem Hitzeschockprotein (HSP90) und dem Immunophilin-FK-Bindeprotein 52 (FKBP52) vorliegt. Durch die Bindung kommt es zur Trennung von HSP90 und FKBP52, wodurch der ER in seine aktive Form versetzt wird. Es folgt eine Konformationsänderung des ER mit nachfolgender Dimerisierung. Dabei können sich Homodimere (ER α /ER α oder ER β /ER β) oder Heterodimere (ER α /ER β) bilden. Die Dimere interagieren dann mit „estrogen response elements“ (EREs) in den Zielgenen und es kommt zur Bindung von Koaktivatoren, wodurch nachfolgend die Transkription östrogenabhängiger Gene aktiviert wird (Abbildung 2).

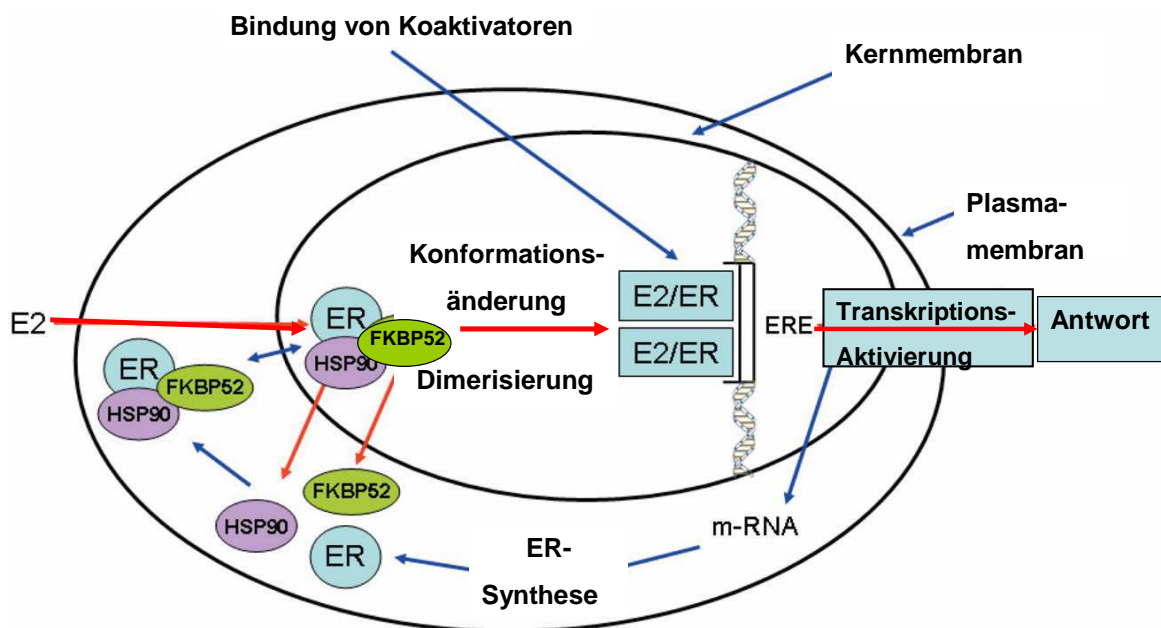


Abbildung 2: Darstellung des klassischen Signalwegs von Östrogenrezeptoren (ER). E2=17 β -Estradiol, HSP90=Hitzeschockprotein 90, FKBP52=Immunophilin-FK-Bindeprotein 52, ERE=estrogen response element (nach Bai 2009).

Durch sogenannte Domänen in den Rezeptoren werden die jeweiligen Funktionen organisiert. In Abbildung 3 ist der Aufbau der Östrogenrezeptoren dargestellt.

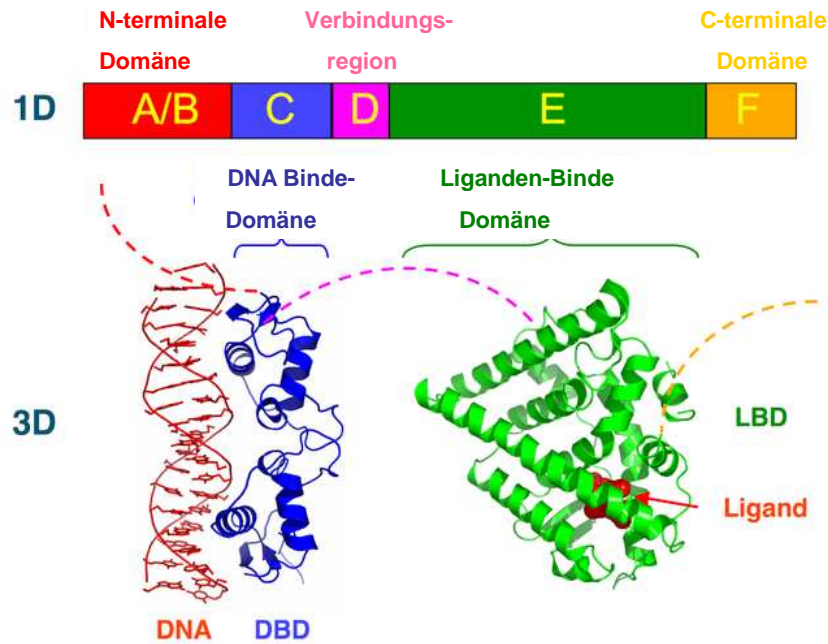


Abbildung 3: Struktureller Aufbau der Östrogenrezeptoren in ein- und dreidimensionaler Darstellung. DBD-DNA Binde-Domäne, LBD-Liganden Binde-Domäne (nach Bai 2009).

ER sind aus sechs funktionellen Domänen (A bis F) aufgebaut. ER α und ER β unterscheiden sich prozentual in den Aminosäuresequenzen der Domänen (Hanstein et al, 1999).

Am N-terminalen Ende befindet sich die A/B-Domäne. Diese Region ist nur gering konserviert und kann am meisten variieren. ER α und ER β stimmen in dieser Aminosäuresequenz weniger als 20% überein. Sie enthält die Aktivierungsfunktion-1 (AF-1), welche über Interaktionen mit anderen nukleären Proteinen die promotorspezifische und ligandenunabhängige Transkriptionsaktivität des ER vermittelt und somit eine Aufgabe bei der Aktivierung der Genexpression erfüllt. Der MAP-Kinase-Regulationsweg (Mitogen aktivierte Proteinkinase) zielt auf die A/B-Region ab, wodurch eine Verknüpfung zwischen der Signalvermittlung durch Wachstumsfaktoren und Steroidhormonen auf Rezeptorebene ermöglicht wird.

Die zentrale C-Domäne ist die DNA-Bindedomäne (DBD), da sie die Erkennung und Bindung von DNA ermöglicht und an der Dimerisierung der Rezeptoren beteiligt ist. ER α und ER β teilen hier eine Aminosäurenübereinstimmung von etwa 95%.

Die D-Domäne kann als flexibles Verbindungspeptid (englisch: hinge) zwischen der DBD und der LBD betrachtet werden. Sie ist nur zu 30% zwischen ER α und ER β konserviert und beinhaltet ein nukleäres Lokalisierungssignal. Sie spielt somit eine Rolle bei der nukleären Translokation.

Die E-Domäne wird auch Ligandenbindedomäne (LBD) genannt und enthält die hormonabhängige Aktivierungsfunktion-2 (AF-2). In dieser Region finden komplexe Funktionen, wie Ligandenbindung, Assoziation mit Hitzeschockproteinen, ligandenabhängige Transaktivierung und Ausbildung von ER-Dimeren statt. ER α und ER β teilen in etwa 55% Aminosäurenübereinstimmung in dieser Domäne. Über die LBD kann Östradiol an den Rezeptor binden, wodurch es zu einer Konformationsänderung in dieser Domäne kommt. Der dadurch aktivierte Rezeptor reagiert nachfolgend mit einer gesteigerten Transkription der Zielgene.

Am C-Terminus findet sich die nur wenig konservierte F-Region, deren genaue Funktion bislang unklar ist und weniger als 20% Aminosäurenübereinstimmung zwischen den beiden ER-Subtypen aufweist (Mitter et al, 2005; Zhao et al, 2008).

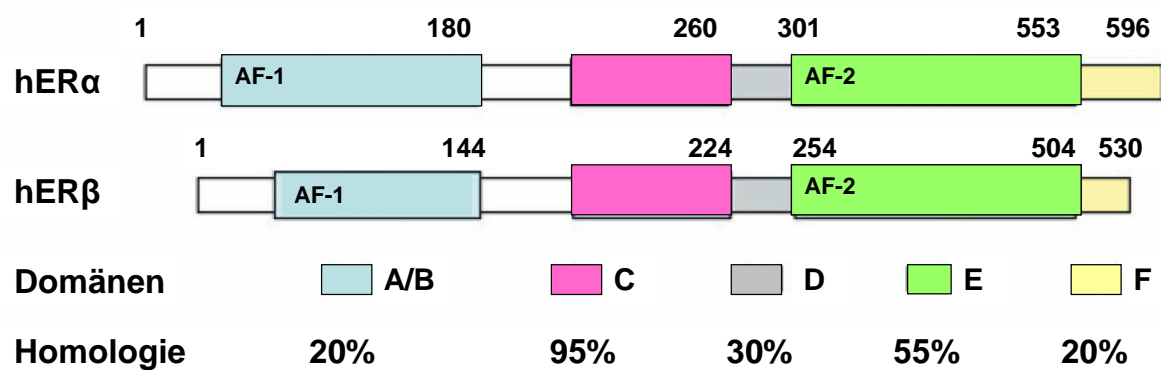


Abbildung 4: Darstellung des Domänenaufbaus der humanen ER α und ER β Isoformen. AF-1=Aktivierungsfunktion-1, AF-2=Aktivierungsfunktion-2 (nach Bai 2009).

Die beiden Rezeptoren ER α und ER β liegen auf unterschiedlichen Chromosomen. ER α befindet sich auf Chromosom 6q25.1, während ER β auf 14 q23.2 liegt (Enmark et al, 1997; Menasce et al, 1993; Nilsson et al, 2001). Gemessen an der Anzahl an Aminosäuren zeigen die beiden Rezeptoren eine große Ähnlichkeit. Das ER α -Protein besteht aus 596 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 66 kDa. Das ER β -Protein ist mit 530 Aminosäuren etwas kürzer und wiegt 59 kDa (Fuqua et al, 1999; Moore et al, 1998; Ogawa et al, 1998; Wilkinson et al, 2002).

1.5.2. Promotoren im Östrogenrezeptor β -Gen

Ein Promotor ist ein Abschnitt auf der DNA, der die regulierte Expression eines Gens ermöglicht. Die Promotorsequenz ist ein essentieller Bestandteil eines Gens. Er ist ein Kontrollabschnitt auf der DNA am 5'-Ende, der sich vor jedem Gen befindet und somit vor dem RNA-kodierenden Bereich liegt. Ein Gen ohne Promotor kann nicht transkribiert und das zugehörige Protein somit nicht exprimiert werden.

Die Promotorregion des ER β -Gens ist komplex und besteht aus mehreren gewebespezifischen Promotoren und verschiedenen Exons am 5'-Ende, diese Region ist aber noch nicht vollständig erforscht. Bisher wurden für ER β zwei Promotoren beschrieben, ON und OK (Li et al, 2000) (Zhao et al, 2003).

Es ist möglich, dass weitere noch nicht identifizierte Promotoren die Expression der ERs regulieren (Dahlman-Wright et al, 2006).

1.5.3. ER β -Isoformen

In den letzten Jahren wurden verschiedene ER β -Isoformen beschrieben, die sich durch Exondeletionen (Lu et al, 1998), Insertionen oder Splicevarianten am C-Terminus (Hanstein et al, 1999; Moore et al, 1998) unterscheiden. Zu den wichtigsten und bis jetzt am besten untersuchten Isoformen gehören ER β 1 (Wildtyp), ER β 2 (entspricht ER β cx), ER β 3, ER β 4 und ER β 5 (Nilsson et al, 2001; Palmieri et al, 2002; Speirs et al, 2002; Speirs et al, 2004). (Abbildung 5). Sie haben unterschiedliche Expressionsraten in humanen Zellen, aber allgemein ist noch wenig über ihre biologische Rolle bekannt. ER β 2-5 sind identisch mit dem Wildtyp ER β 1 in den Exons 1-7, unterscheiden sich aber in Exon 8 (Moore et al, 1998; Ogawa et al, 1998). Die verschiedenen Splicevarianten haben unterschiedliche Funktionen, können aber auch durch Heterodimerisierung interagieren, wenn sie gemeinsam in derselben Zelle vorhanden sind (Enmark et al, 1997). So blockieren z.B. ER β 1, 2 und 5 die Transkriptionsaktivität von ER α am ERE. ER β 1 hat dagegen alleinige Transkriptionsaktivität (Peng et al, 2003). In Studien mit Zelllinien wurde gezeigt, dass eine Induktion der Expression von ER β in ER α -positiven Brustkrebszellen deren Wachstum hemmen kann (Paruthiyil et al, 2004; Strom et al, 2004). Die Aktivität dieser Isoformen scheint promotorspezifisch zu sein und es wird überlegt ob die Isoformen unterschiedliche Bedeutung bei der Modulierung einer Östrogenantwort haben (Peng et al, 2003). ER β -Isoformen wurden

auch in Geweben nachgewiesen die ER α negativ waren, was auf ER α -unabhängige Funktionen von ER β hinweist (Mitter et al, 2005).

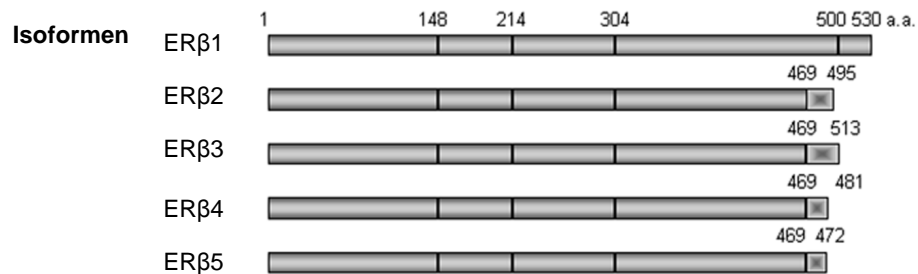


Abbildung 5: Struktur der ER β mRNA-Isoformen 1-5 (nach Zhao 2008). Die Zahlen geben die Anzahl an Basenpaaren an (nach Mitter 2005).

1.6. Single Nucleotid Polymorphismen (SNPs)

Im humanen Genom treten etwa alle 300-1000 Basenpaare Punktmutationen, so genannte „Single Nucleotid Polymorphismen“ (SNPs) auf. Diese sind Variationen von einzelnen Basenpaaren im DNA-Strang, die unter anderem zu individuellen Krankheitsdispositionen und unterschiedlichen Reaktionen auf Therapien beitragen. Die große Dichte und Mutationsstabilität der SNPs macht sie zu nützlichen Markern für die Populationsgenetik und für die Suche nach vererbten Genen bei komplexen Erkrankungen.

Im Genom bestehen für einen SNP mindestens zwei Allele, so kann zum Beispiel ein A oder ein G an einer bestimmten Position im Genom stehen. Somit kann ein Individuum unterschiedliche Genotypen haben, z.B. homozygot A, heterozygot AG oder homozygot G. Diese Polymorphismen können in kodierenden Regionen, den sogenannten Exons, nicht kodierenden Regionen den sogenannten Introns, oder in regulatorischen Genabschnitten wie z. B. den Promotorbereichen, lokalisiert sein.

Abhängig davon, wo sie auftreten, haben sie unterschiedliche Auswirkungen auf der Ebene der Phänotypen. SNPs in kodierenden Regionen von Genen, welche Funktion oder Struktur von Proteinen regeln, sind meist der Grund für bekannte rezessiv oder dominant vererbte monogene Erkrankungen. Diese SNPs werden routinemäßig zu diagnostischen Zwecken analysiert. SNPs, welche Primärstruktur eines Proteins verändern und somit den Medikamentenmetabolismus stören, sind eine weitere interessante Gruppe. Die meisten SNPs

kommen allerdings in nicht-kodierenden Regionen im Genom vor und haben keinen bekannten direkten Einfluss auf den Phänotypen eines Individuums.

Mit Hilfe eines Computerprogramms kann DNA-Abschnitte von verschiedenen Patienten verglichen werden, indem es die Unterschiede in der Nukleotidsequenz der Patienten identifiziert. Anschließend können die SNPs experimentell validiert werden, um zu untersuchen, ob in der Population tatsächlich mindestens zwei Allele an der Stelle des Polymorphismus stehen (Nelson et al, 2004).

In der SNP-Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) waren im November 2009 25.003.333 SNPs für Homo sapiens gelistet. Um einzelne SNPs immer genau zu identifizieren, bekommt jeder eine Identitätsnummer. Neu registrierte, in der Datenbank noch nicht gelistete SNPs werden mit „rs“ („reference SNP“) markiert. Diese Nomenklatur wird auch in dieser Arbeit verwendet.

Weiterhin werden SNPs in derselben Region auf einem Chromosom nicht einzeln vererbt, sondern formen Haplotypblöcke, z.B. TT-AT-GG. Sowohl Korrelationen mit einzelnen SNPs als auch der Haplotypen können interessante Ergebnisse hinsichtlich der Entstehung von Erkrankungen geben.

Einige Studien haben zum Beispiel die Rolle von ER β Polymorphismen bei Essstörungen (Rosenkranz, 1998 200 /id; Eastwood, 2002 202 /id}, Menstruationsstörungen (Sundarrajan et al, 2001) oder Morbus Alzheimer (Lambert et al, 2001) genauer betrachtet.

Im Bereich von gynäkologischen Erkrankungen gibt es aktuell Studien, die versuchten, Assoziationen zwischen ER β -SNPs und Uterusfibromen (Fischer et al, 2009) oder Leiomyomen (Zhai et al, 2009) zu finden. In beiden Studien konnten aber keine signifikanten Unterschiede gefunden werden.

In dieser Arbeit wurden Single Nucleotid Polymorphismen (SNPs) in der Promotorregion des Östrogenrezeptors β bei Mammakarzinomen untersucht, da Polymorphismen in dieser Region möglicherweise das Brustkrebsrisiko beeinflussen, abhängig davon, an welcher funktionellen Domäne sie im Gen auftreten.

1.7. Ziel der Forschungsarbeit

Da das Mammakarzinom eine hormonell abhängige Erkrankung ist, stellt sich die Hypothese, dass SNPs in Genen des Steroidhormon-Signalwegs oder -Stoffwechsels einen Einfluss auf die Entstehung des Mammakarzinoms haben.

In dieser Arbeit wurden die Häufigkeiten verschiedener SNP-Allele bei Patienten mit Mammakarzinom und gesunden Frauen verglichen, sowie mit Patienten anderer pathologischer Veränderungen des Mammagewebes, wie DCIS, Fibroadenom und Masthopathie. Dabei wurden SNPs in der Promotorregion des ER β -Gens untersucht, da man davon ausgeht, dass diese einen besonderen Einfluss auf die Expression von Östrogenrezeptoren haben. Eine Phänotyp-Genotyp-Assoziation sollte die Frage beantworten, ob bestimmte SNP-Allele einen potentiellen Risikofaktor darstellen.

Weiterhin wurden die SNP-Allele bei Patientinnen mit Mammakarzinom im Hinblick auf klinisch-pathologische Faktoren wie Tumorstatus, Nodalstatus, Differenzierungsgrad, Steroidhormonrezeptorstatus, HER-2-Status und dem Diagnosealter der Patientinnen verglichen, um zu prüfen ob es einen Zusammenhang zwischen den untersuchten SNPs und den Charakteristika des Mammakarzinoms gibt. Mit dieser Fragestellung sollte untersucht werden, ob sich diese SNPs als prädiktive Marker für den Verlauf der Erkrankung eignen könnten.

2. Material und Methoden

2.1. Patientenkollektiv

Insgesamt wurden Blutproben von 183 Patientinnen mit histologisch gesichertem Mammakarzinom, 46 Patientinnen mit DCIS, 49 Patientinnen mit Fibroadenomen, 54 Patientinnen mit Mastopathie und 151 Kontrollen gesunder Frauen ohne bekanntes Malignom und in etwa gleichem Alter bearbeitet. Das Durchschnittsalter (Alter zum Diagnosezeitpunkt) des Mammakarzinomkollektivs betrug 59,3 Jahre (Standardabweichung +/- 13,332 Jahre). Die Proben der Mammakarzinompatientinnen wurden durch das Institut für Pathologie der Universität Regensburg anonymisiert zur Verfügung gestellt. In der Zeit von 2002 bis 2007 wurden Mammakarzinompatientinnen prospektiv in die Studie aufgenommen, bei denen die Information über bestimmte klinisch-pathologische Parameter vorlagen (Alter, Grading, Tumorgröße, Nodalstatus, ER α -, PR- und HER-2-Rezeptorstatus). Einen Überblick dazu gibt Tabelle 9 im Ergebnisteil. Alle Patientinnen sowie die Kontrollgruppe stammen aus der Region um Regensburg, Oberpfalz, Deutschland.

Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Universität Regensburg zugelassen. Bei allen Patientinnen lag eine schriftliche Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie vor.

Für die Einteilung der Mammakarzinomproben anhand der T-Stadien wurden die Frühkarzinome T1 getrennt von Karzinomen in fortgeschrittenen Stadien T2-T4 betrachtet. Anhand des Nodalstatus wurde eine nodalpositive und eine nodalnegative Gruppe gebildet. Für das Grading wurden die gut differenzierten (G1) und mäßig differenzierten (G2) Karzinome in einer Gruppe zusammengefasst und den schlecht differenzierten (G3) Karzinomen gegenübergestellt.

Bezüglich der Einteilung des HER-2-Status folgte eine Einteilung in eine HER-2 negative und eine HER-2 positive Gruppe. Ebenso wurde anhand des Steroidrezeptorstaus in positive und negative Gruppen eingeteilt. Die Hormonrezeptor negative Gruppe umfasste die Karzinome mit einem IRS Score von 0 bis 2. Als ER- bzw. PR-positiv wurden Mammakarzinome mit einem IRS Score von 3 bis 12 gewertet.

Für die Assoziation der Mammakarzinome mit dem Alter wurden die Patientinnen anhand des durchschnittlichen Diagnosealters in eine jüngere Gruppe (<59 Jahre) und eine ältere Gruppe (\geq 59 Jahre) eingeteilt.

2.2. Materialien

In Tabelle 7 sind die verwendeten Materialien und Geräte zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Reagenzien, Materialien und Geräte.

Reagenzien	Hersteller, Ort
PCR-Puffer: GoTaq Puffer 0,5% Tween 20 10mAU Proteinase K	Promega, Madison, US Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D Merck, Darmstadt, D
Lysepuffer: 1% v/v Triton X 0,01 M Tris (pH 7,5) 5 mM MgCl ₂ 0,32 M Sucrose	Calbiochem, San Diego, US Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
SNP Primer	Metabion, Martinsried, D
dNTP-Mix (0,25ml von 100mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Go Taq Polymerase	Promega, Madison, US
Ladepuffer: Glycerol 5ml Na ₂ EDTA 0,37g Natriumdodecylsulfat 0,1g Bromphenolblau 0,01g Deionisiertes H ₂ O zu 10ml	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D Flucha Chemie, Buchs, D Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Biozym LE Agarose	Biozym scientific GmbH, Oldendorf, D
50 bp Längenstandard: Leiterkonzentrat 1,5µl Ladepuffer 2 µl H ₂ O 16,5 µl	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
1x TBE Puffer: 100mM Tris 83 mM Borsäure 1 mM EDTA	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D Calbiochem, San Diego, US
Ethidiumbromid-Lösung 1%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Geräte und Materialien	
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, D
Pipetten	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, D
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus SEPATECH, Hanau, D
Heizplatte und Magnetrührer Stuart heat stir SB 162	Bibby Sterilin Ltd., Startfordshire, UK
UV-Transluminator	MWG Biotech AG, Ebersberg, D
Spannungsgerät PSP 304	GIBCO BRL, Life Technologies, Gaithersburg, US
Thermocycler T3	Biometra, Göttingen, D
MS2 Minishaker	IKA, Staufen, D
Gelkammern	Armin Baack Labortechnik, Schwerin, D
Pipettenspitzen	Biozym scientific GmbH, Oldendorf, D
QIAshredder (250)	Quiagen, Hilden, D
Waage	Sartorius AG, Göttingen, D
PCR- Softstrips 0,2 ml/1,5ml	Biozym scientific GmbH, Oldendorf, D
UV- Photometer Gene Ray	Biometra, Göttingen, D
Software: Microsoft Word, Microsoft Excel	Microsoft, Unterschleißheim, D
SPSS Version 12.0	IBM, Chicago, US

2.3. DNA-Isolation

Für die DNA Isolation wurden 100µl EDTA-Blut in ein Eppendorfgefäß pipettiert, 300 µl Lysepuffer zugegeben und anschließend für 30s bei 13000 U/min in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und zu dem verbleibenden Pellet wurden 50µl MPCR-Puffer pipettiert und über Nacht bei 50°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Temperatur für 10 min auf 95°C erhöht, um eine Inaktivierung der Enzyme zu erreichen. Nach photometrischer Bestimmung der DNA-Konzentration wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.4. SNP-Auswahl

In dieser Arbeit wurden zunächst 3 SNPs in der ON-Promotor Region des ERβ-Gens mit Hilfe der Internetseiten www.genecards.org und www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP identifiziert. Die Grundlage der SNP Auswahl war deren Lokalisation in der 5´Region, angrenzend an den Transkriptionsstart des ERβ-Gens, da davon ausgegangen wurde, dass gerade SNPs in der Promotorregion eines Gens interessante Einblicke in die Genexpression geben können. Der SNP rs2987983 (C/T) ist an der Position 63833406 des Chromosoms 14 lokalisiert, rs3020450 (A/G) an der Position 63838055 und der SNP rs3020449 (A/G) (früher rs8004842) an der Position 63843145 des Chromosoms 14 (siehe Abbildung 6).

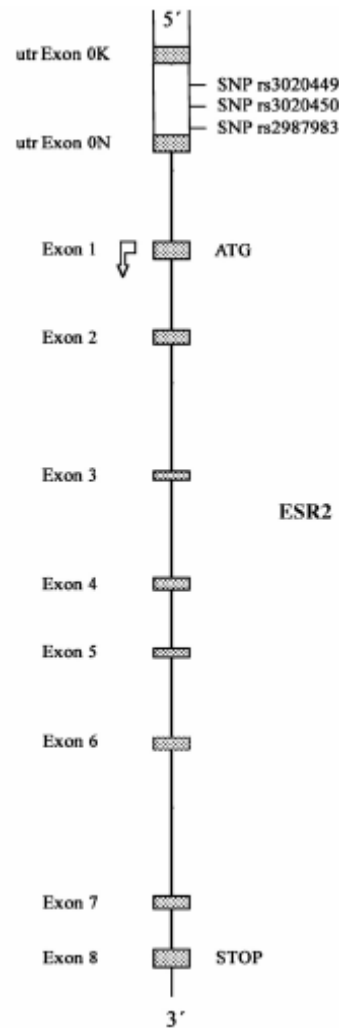


Abbildung 6: Lokalisation der untersuchten SNPs im ER β -Gen (Treeck et al, 2009).

2. 5. PCR (Polymerase-Chain-Reaction)

Die Polymerasekettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction* = PCR) ist eine in vitro Methode zur enzymatischen Amplifikation bestimmter Nukleinsäure-Sequenzen. Es lassen sich einzelne DNA-Abschnitte selektiv vermehren, die dann als Matrize für die weitere Synthese dienen. Bei dieser Technik wird der natürliche Replikationsmechanismus einer Zelle nachempfunden, der sich bei jedem Zyklus der Zellteilung wiederholt. In vitro erfolgt die Replikation aber viel schneller und häufiger. Es werden folgende drei Schritte zyklisch wiederholt:

1. Denaturierung: Um die beiden komplementären DNA-Stränge (dsDNA) zu trennen, wird das Reaktionsgemisch auf 94 °C erhitzt und einzelne DNA-Stränge (ssDNA) gebildet. Dieser Schritt ist für die Anlagerung der Primer und die nachfolgende Elongation notwendig.

2. Annealing: Die Temperatur wird auf 50 °C bis 72 °C abgekühlt, damit zwei Primer an die ssDNA-Stränge hybridisieren können. Das Temperaturoptimum ist abhängig von Länge, Art und Basenzusammensetzung der Primer. Dies sind synthetische Oligonukleotide, welche die Eigenschaft haben, komplementär an die Enden des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes zu hybridisieren. Meistens genügen Zeiten von weniger als einer Minute. Die Primer sind dem Ansatz im Überschuss zugegeben und somit verbinden sich die DNA-Stränge vorwiegend mit diesen.

3. Elongation: Bei diesem Schritt werden die beiden Einzelstränge mit Hilfe einer *Taq*-Polymerase zum Doppelstrang komplementiert (Mullis et al, 1992). Die Anzahl der durchzuführenden Reaktionszyklen hängt von der Ausgangsmenge der Matrize ab. In der Regel genügen 30 bis 35 Zyklen, um eine ausreichende Produktausbeute zu erzielen.

Die *Taq*-Polymerase, die aus thermophilen Bakterien wie z. B. *Thermus aquaticus* stammt, addiert enzymatisch Nukleotide an einen Primer, der an die DNA gebunden ist. Die DNA wird durch die Orientierung der Oligonukleotide in die Richtung des jeweils anderen Primers synthetisiert. Nach jedem Zyklus liegt eine vollständige Kopie des ursprünglichen Doppelstranges vor. Theoretisch verdoppelt sich bei jedem Zyklus der DNA Gehalt. Nach etwa 35 Zyklen ist eine milliardenfache Zunahme erreicht (Abbildung 7).

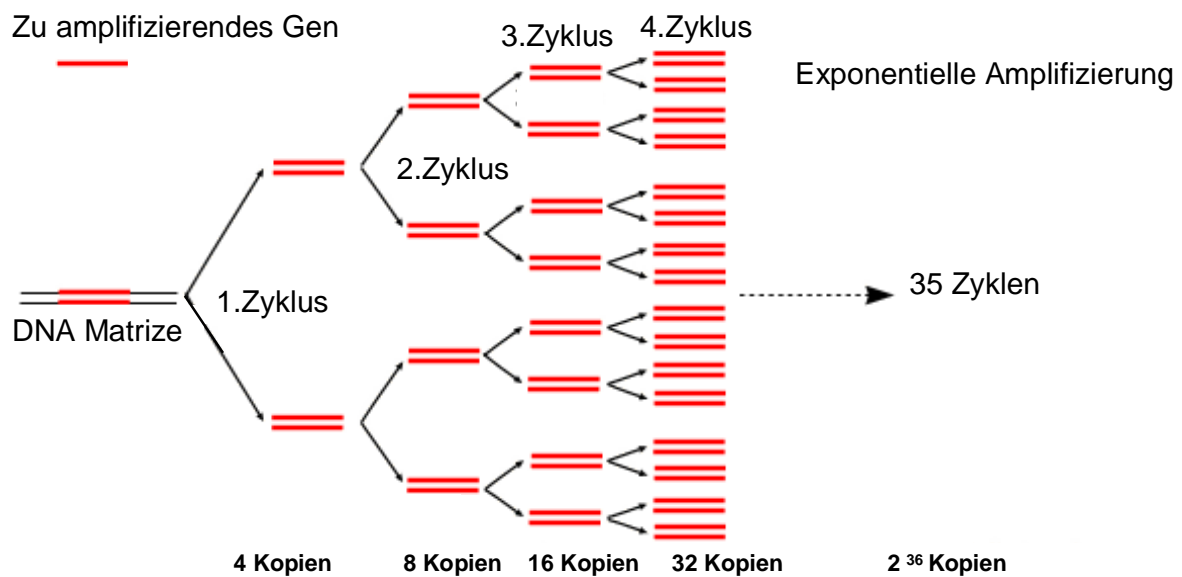


Abbildung 7: Darstellung der exponentiellen Amplifizierung einer PCR.

2.6. Tetra-Primer ARMS-PCR

Sind Polymorphismen bzw. Punktmutationen bekannt, kann eine Modifikation der PCR-Technik, die Tetra-Primer ARMS (*Amplification Refractory Mutation System*)-PCR, eingesetzt werden. Hierbei werden zwei allelspezifische Amplifikate unter Verwendung von zwei Primerpaaren, einem inneren und einem äußeren, erzeugt (siehe Abbildung 5). Hierfür sind weder Restriktionsenzyme, noch Sequenzierungsanalysen der PCR-Produkte notwendig. Die Zusammensetzung der Primer ermöglicht es, in einem Genabschnitt eine Punktmutation oder eine kleine Deletion zu differenzieren. Das Erkennen eines homo- oder heterozygoten Genotyps nach Auftrennung der Reaktionsprodukte in der Gelelektrophorese ist somit möglich. Die Vorteile dieser Methode liegen in der Schnelligkeit, der Reproduzierbarkeit, dem Auskommen ohne Radioaktivität und der automatisierbaren, kostengünstigen Durchführung.

Ein äußerer „vorwärts-Primer“ und ein innerer „rückwärts-Primer“, der an das Wildtyp-Allel des SNPs bindet, bilden ein Amplifikat, welches das Wildtyp-Allel repräsentiert. Der innere „vorwärts-Primer“, der durch ein Mismatch der zwischen seiner 3'-terminalen Base und des Wildtyp-Allels des SNP gekennzeichnet ist, und der äußere „rückwärts-Primer“ bilden ein Amplifikat mit dem Mutations-Allel. Um die Allelspezifität zu verbessern, wurde eine zweite

Fehlpaarung an der zweiten Position des 3'-terminalen Endes der beiden inneren Primer eingeführt. Durch die Anlagerung der beiden äußeren Primer in unterschiedlichen Entfernungen von dem polymorphen Nukleotid unterscheiden sich die beiden allelspezifischen Amplifikate in ihrer Länge und sind mit Hilfe einer Gelelektrophorese auftrennbar und unterscheidbar (Ye et al, 2001). In Abbildung 8 wird diese Methode veranschaulicht.

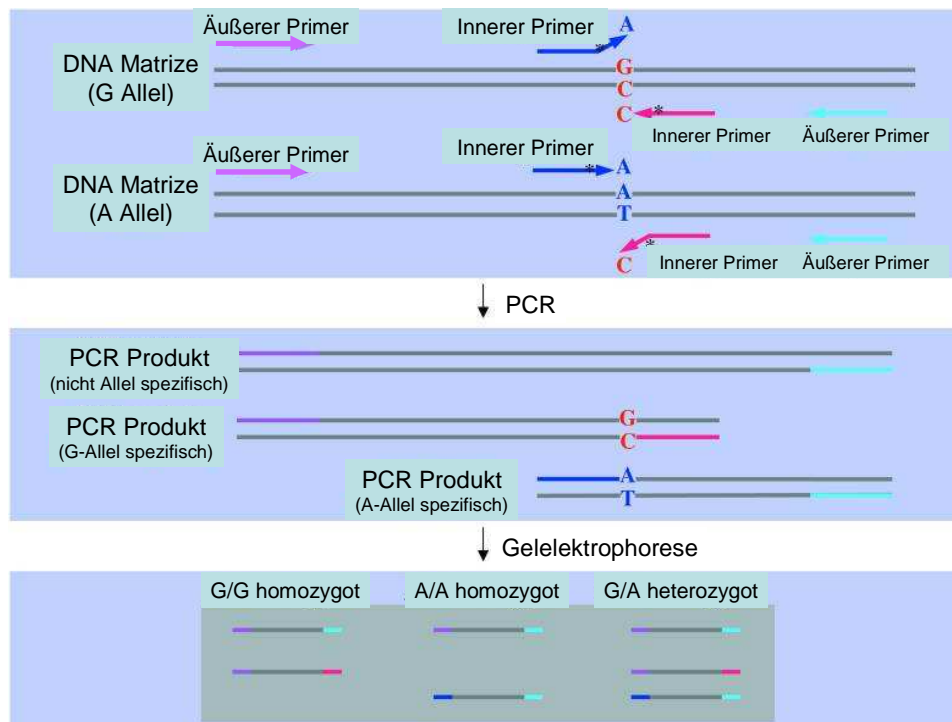


Abbildung 8: Schematische Abbildung der Tetra-Primer ARMS-PCR. Der SNP in diesem Beispiel führt zu einem Austausch von $G \rightarrow A$. Zwei allelspezifische Amplifikate werden durch die Verwendung von zwei Primerpaaren erzeugt. Dabei bildet ein Primerpaar (violette und rote Pfeile) ein Amplifikat mit dem G-Allel und das andere Primerpaar (türkisfarbene und blaue Pfeile) ein Amplifikat mit dem A-Allel. Durch ein Mismatch zwischen der 3'-terminalen Base eines inneren Primers und der DNA-Matrize entsteht die Allelspezifität. Ein zweites Mismatch (mit Sternchen gekennzeichnet) wird an Position -2 von dem 3'-Ende aus in die inneren Primer eingebaut (nach Ye et al. 2001). G= Guanin, A= Adenin.

Für die Tetra-Primer-ARMS-PCR in dieser Arbeit wurden SNP-spezifische Primer entwickelt, deren Sequenz in Tabelle 8 dargestellt wird.

Tabelle 8: PCR Primer für die SNP-Analyse. OP=outer primer, IP=inner primer.

Polymorphismus	Primer	Sequenz
rs2987983	IP1	TCACAATTCAGGTAGAATTGGAATAATAAC
	IP2	CCTGGTTTAATGCAGAGTGGAGATGA
	OP1	ATTGTAGGATATTTTGGAGACAGGCAG
	OP2	TTATTATACAAGGAAACCTCACTGCAGG
rs3020449	IP1	GCATTGTCCTTTTTACATATTGTTAGGGTA
	IP2	AATTCTCAAGGAAATTTTAGCAAAGCC
	OP1	TAGATTTTGTCAAACACTTTTGGTGGAT
	OP2	CCAAATGATTAAGGAGAAATAACAGCAG
rs3020450	IP1	TAGTTTCCTTGTGTTCTCTGTTCTCTACG
	IP2	GGGAGAAGAGAGCCCAGGATTTTCGAT
	OP1	CAACTAGGAAGTGTGTTGCTGAAAACC
	OP2	GTCTCTTCTGAATTACACAGGTGCATGG

Um bei der Genotypisierung der einzelnen SNPs ein optimales Ergebnis zu erzielen, ist es nötig, den PCR-Ansatz für jeden Polymorphismus individuell anzupassen. Daher wurden zu Beginn der Arbeit die Ansätze in verschiedenen Rezepturen getestet, bis der optimale Ansatz für jeden SNP gefunden wurde.

Für jede PCR-Reaktion erfolgte dann zunächst die Herstellung eines Reaktionsansatzes entsprechend der Probenanzahl. Es wurde jeweils ein 8µl Ansatz aus folgenden Komponenten zusammen gestellt:

Ansatz für SNP rs3020450		Ansatz für SNP rs3020449		Ansatz für SNP rs2987983	
0,2 µl	dNTP Mix (10mM)	0,2 µl	dNTP Mix (10mM)	0,2 µl	dNTP Mix (10mM)
0,2 µl	Primer SNP450 IP1	0,2 µl	Primer SNP449 IP1	0,5 µl	Primer SNP983 IP1
0,2 µl	Primer SNP450 IP2	0,8 µl	Primer SNP449 IP2	0,2 µl	Primer SNP983 IP2
0,2 µl	Primer SNP450 OP1	0,2 µl	Primer SNP449 OP1	0,2 µl	Primer SNP983 OP1
0,2 µl	Primer SNP450 OP2	0,2 µl	Primer SNP449 OP2	0,2 µl	Primer SNP983 OP2
1,0 µl	10x Go Taq-Puffer	1,0 µl	10x Go Taq-Puffer	1,0 µl	10x Go Taq-Puffer
0,1 µl	Go Taq Polymerase	0,1 µl	Go Taq Polymerase	0,1 µl	Go Taq Polymerase
5,9 µl	H2O	5,3 µl	H2O	5,6 µl	H2O

Dieser Ansatz wurde anschließend in ein 0,2ml PCR-Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gelagert. Daraufhin erfolgte die Zugabe von jeweils 2µl DNA, entsprechend 100ng genomischer DNA.

Nach kurzem Anzentrifugieren wurden die Reaktionsgefäße in einen Thermocycler gestellt, in dem die PCR nach folgendem Programm ablief:

Initiale Denaturierung: 10 min bei 94°C

Denaturierung für 30 s bei 94°C

Annealing für 30 s bei 56°C

Elongation für 60 s bei 72°C

} repetitiver Reaktionszyklus 38mal

Finale Reaktionszeit für 5 min bei 72°C

Die Deckelheizung war dabei auf 105°C temperiert. Nach Abschluss der Reaktionszyklen wurden die Amplifikationsprodukte bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Als Negativkontrolle wurde bei jedem Programmablauf ein Ansatz ohne DNA-Zugabe eingesetzt und als Qualitätskontrolle in jedem Lauf drei bekannte DNA-Proben mitgeführt (2x homozygot, 1x heterozygot). Für das spätere Auftragen auf ein Agarosegel für die elektrophoretische Auftrennung wurden zu jedem PCR-Produkt noch 2µl Ladepuffer gegeben.

2.7. Agarosegelelektrophorese

Zur analytischen und präparativen Trennung von Nukleinsäuren werden horizontale Agarosegele verwendet. Das Prinzip der DNA-Gelelektrophorese beruht darauf, dass die DNA-Moleküle mit ihren negativ geladenen Phosphatgruppen in einer bestimmten Geschwindigkeit durch eine aus Agarosegel bestehende Matrix wandern. Abhängig von der Größe der DNA und dem gewünschten Trennbereich werden unterschiedliche Agarosekonzentrationen verwendet. Es entstehen Gele mit verschiedenen Porengrößen durch welche negativ geladene Nukleinsäure nach Anlegen einer Spannung im Laufpuffer zum positiven Pol wandert. Zur Anfärbung der DNA unter UV-Licht wird dem Gel Ethidiumbromid zugesetzt, welches in den Nukleinsäurestrang eingelagert wird. Durch gleichzeitiges Auftragen eines Größen- oder Mengenstandards können Größe und Konzentration der DNA bestimmt werden.

In dieser Arbeit wurde für die Analyse der PCR-Produkte ein 1,5% Agarosegel hergestellt. Hierfür wurden 2,7g Agarose in 180 ml 1x TBE Puffer [100mM Tris, 83mM Borsäure, 1mM EDTA] aufgekocht und anschließend unter ständigem Rühren auf einem Magnetrührer auf

circa 50°C abgekühlt und mit 9µl Ethidiumbromidlösung versetzt. Dieses 1,5%-ige Agarosegel wurde in einen Gelträger gegossen und die Gelkämme eingesteckt. Nach völligem Erkalten wurde das Gel in die mit 1x TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt und die Kämme entfernt. Es wurden 12µl des PCR-Volumens (10µl PCR-Volumen + 2µl Ladepuffer) in je eine Geltasche pipettiert und als Orientierung ein 50bp-DNA-Längenstandard aufgetragen. Die Auftrennung der Proben erfolgte durch Anlegen einer Gleichstromspannung von 170mA/300V für etwa 80 Minuten.

Nach abgeschlossener Elektrophorese wurde das Agarosegel auf einen UV-Transluminator gelegt, wobei durch Anregung mit UV-Licht das mit der DNA interkalierende Ethidiumbromid fluoreszierte und so die Länge der DNA-Fragmente durch den Molekulargewichtsstandard bestimmt werden konnte (Abbildung 9 und Tabelle 9).

Eine erfolgreiche Genotypisierung konnte in 96,5% erreicht werden.

Tabelle 9: Überblick über die Basenpaargrößen der Estrogenrezeptor β SNPs

<u>rs2987983</u>	<u>rs3020450</u>	<u>rs3020449</u>
C-Allel: 180 bp	A-Allel: 156 bp	A-Allel: 231 bp
T-Allel: 258 bp	G-Allel: 212 bp	G-Allel: 193 bp
Max. Prod.: 382 bp	Max.Prod.: 313 bp	Max.Prod.: 367 bp

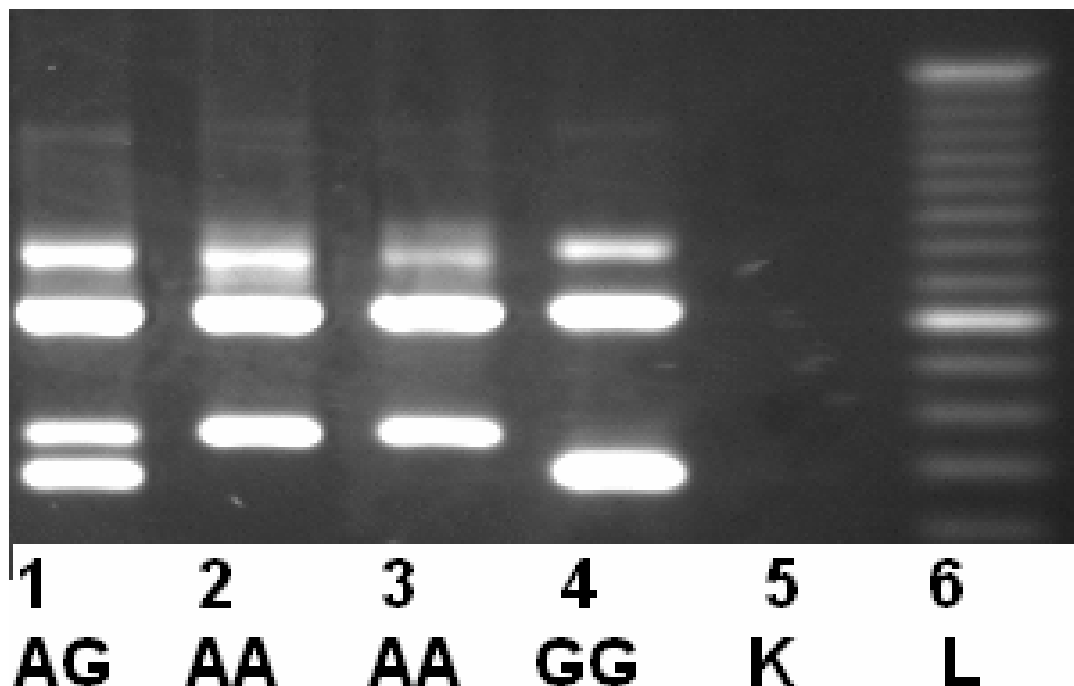


Abbildung 9: Beispiel eines Gelelektrophoresebildes eines SNP rs3020449. Bahn 1: heterozygot A/G, Bahn 2+3: homozygot A/A, Bahn 4: homozygot G/G, Bahn 5: Wasserkontrolle, Bahn 6: 50 bp Längenstandard.

2.8. Assoziationsstudien

SNPs können zu Assoziationsstudien herangezogen werden. Dabei wird untersucht, ob Unterschiede in der Häufigkeit eines SNP-Allels in Studiengruppen mit unterschiedlichen Phänotypen, z. B. bei Mammakarzinompatienten und bei gesunden Kontrollpersonen existieren.

Es wird davon ausgegangen, dass ein bestimmter SNP in keiner Beziehung zum untersuchten quantitativen Merkmal steht und es wird von einer vergleichbaren Verteilung der Allele in allen Bereichen der SNP-Ausprägung ausgegangen. Die Häufigkeit der einzelnen Allele eines SNPs sollte sich also nicht zwischen Individuengruppen mit Unterschieden in der SNP-ausprägung unterscheiden.

Eine zu- oder abnehmende Häufigkeit von bestimmten Allelen eines SNP mit zu- oder abnehmender Ausprägung des untersuchten SNP ist hingegen ein Hinweis auf eine Assoziation dieses Markers zum untersuchten Merkmal.

2.9. Statistische Auswertung

Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Programms SPSS 12.0 durchgeführt. Unterschiede in den Häufigkeiten der Allele, Genotypen und Haplotypen bei Patienten und Kontrollen wurden mittels des zweiseitigen χ^2 -Tests verglichen. Dabei wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0.05$ festgelegt, p-Werte zwischen $p = 0,05-0,1$ wurden als Trend gewertet. Nach der Prüfung auf das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (siehe 2.9.3.) wurden Allelfrequenz, Allelpositivität und Genotypfrequenz ermittelt.

2.9.1. Chi²-Test

Für die Prüfung der Assoziationen zwischen dem Mammakarzinomrisiko und den einzelnen SNPs wurde der χ^2 (Chi²)-Test verwendet. Dieser Test untersucht die Unabhängigkeit von zwei Merkmalen und wird deshalb auch Chi²-Unabhängigkeitstest genannt. Man betrachtet also zwei Alternativmerkmale, in unserem Fall einerseits das entsprechende Allel und andererseits den Krankheitsstatus, bezogen auf das Mammakarzinom.

Die Nullhypothese H_0 besagt, dass die Ereignisse bzw. Merkmale unabhängig voneinander sind, wohingegen die Alternativhypothese H_1 von einer Abhängigkeit ausgeht. Beim Chi²-Test werden die beobachteten Häufigkeiten mit denjenigen Häufigkeiten verglichen, die unter der Nullhypothese zu erwarten sind. Dazu wird die Prüfgröße Chi² mit der Formel

$$\text{Chi}^2 = \frac{n \times (ad-bc)^2}{(a+b)(a+c)(c+d)(b+d)}$$

berechnet.

Unter der Nullhypothese würden alle beobachteten mit den erwarteten Häufigkeiten übereinstimmen, d. h. es wäre $\text{Chi}^2=0$. Je weiter die beobachteten von den erwarteten Häufigkeiten abweichen, desto größer ist die Prüfgröße Chi². Liegt nun der Wert der Prüfgröße innerhalb des Intervalls $[0, \text{Chi}^2_{1;1-\alpha}]$ wird die Nullhypothese auf dem α -Niveau beibehalten, d. h. es wird angenommen, dass keine Abhängigkeit der beiden Merkmale vorliegt. Für $\alpha=0.05$ wäre $\text{Chi}^2_{1;0,95}=3.841$. Ist der Wert der errechneten Prüfgröße höher als dieser $\text{Chi}^2_{1;0,95}$ -Wert, wird die Nullhypothese verworfen und die Alternativhypothese angenommen, nämlich dass es eine Abhängigkeit, also eine Assoziation zwischen den beiden Merkmalen gibt.

2.9.2. Odds Ratio

Zusätzlich wurden Odds Ratio (OR) und Konfidenzintervall (CI) berechnet. Die OR ist ein Maß für die Stärke der Beziehung zwischen zwei Variablen.

In dieser Arbeit gibt die OR an, um welchen Faktor das Erkrankungsrisiko einer Person steigt, wenn sie Träger eines bestimmten Allels oder Genotypen ist. Um die Genauigkeit der Odds Ratio beurteilen zu können, wurde das zugehörige Konfidenzintervall (CI) angegeben. Das Konfidenzintervall ist der Wertebereich, der mit einer vorgegebenen Sicherheit der Schätzung $(1-\alpha)$ die approximierte wahre OR enthält. Da als Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ gewählt wurde, wurde jeweils das 95% CI angegeben. Ein enges CI spricht bei einer definierten Stichprobengröße für eine geringe Standardabweichung der Daten. Ein großes CI spricht für eine starke Variabilität der Daten.

2.9.3. Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE) beschreibt die Genotyphäufigkeiten aus den Anteilen der verschiedenen Allele eines Gens in einer Population. Mit dieser Formel lassen sich die Häufigkeiten der drei möglichen Genotypen (homozygot Allel 1; heterozygot Allel 1 und Allel 2; homozygot Allel 2) in einer Population mit Hilfe der experimentell bestimmten Allelfrequenz berechnen. Die berechneten Genotypfrequenzen sollten mit den experimentell gefundenen Häufigkeiten übereinstimmen.

Abweichungen von den errechneten Häufigkeiten können auf eine Verletzung der dem Gleichgewicht zugrunde liegenden Annahmen hinweisen, z. B. zu kleine Stichprobengrößen, Auftreten von Neumutationen oder auch auf Unstimmigkeiten bei der Durchführung der Genotypisierung (Strachan und Read 1999).

In dieser Arbeit wurde zur Berechnung des HWE die DeFinetti-Software verwendet, welche öffentlich im Internet auf der Homepage des Institut für Humangenetik der GSF – Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit (<http://ihg.gsf.de>) verfügbar ist.

Als Signifikanzniveau α wurde 0,05 gewählt, p-Werte $<0,05$ bedeuteten somit eine signifikante Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $<5\%$.

3. Ergebnisse

3.1. Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

In der vorliegenden Promotionsarbeit wurde die Verteilung der Genotypen von drei typisierten Polymorphismen bei Patienten und Kontrollen bezüglich einer Abweichung vom Hardy-Weinberg-Equilibrium untersucht. Es zeigte sich, dass in der Fallpopulation der gesunden Kontrollgruppe die Verteilung der Genotypen des SNP rs2987983 vom Hardy-Weinberg-Equilibrium abwich ($p=0,036$). Auch in der Gruppe der jüngeren Mammakarzinom-Patientinnen (<59 Jahren) wurde eine Abweichung festgestellt (p -Wert = 0,048). In allen übrigen Gruppen war keine Abweichung vorhanden.

3.2. Assoziation zwischen den Polymorphismen rs2987983, rs3020449 und rs3020450 und klinisch-pathologischen Merkmalen bei Mammakarzinom-Patientinnen

In diesem ersten Abschnitt wurden die 183 Mammakarzinome auf die Expression der SNPs rs2987983, rs3020449 und rs3020450 hin untersucht und im Hinblick auf prognostische Faktoren mit den zuvor erhobenen klinisch-pathologischen Daten korreliert. Eine eventuelle Abweichung von der Gesamtzahl der Patientinnen ist jeweils auf mangelnde Genotypisierung zurückzuführen. Tabelle 10 gibt einen Überblick über die Verteilung der Daten.

Tabelle 10: Alter, histologische Charakteristika und Rezeptorstatus der bearbeiteten Mammakarzinomfälle (n=183).

X = Kriterium nicht bekannt.

Merkmal		Patientenanzahl n (%)
Größe	pT1	97 (53%)
	pT2-4	82 (45%)
	pTx	4 (2%)
Alter	<59 Jahre	76 (42%)
	≥59 Jahre	107 (58%)
Grading	G1	15 (8%)
	G2	98 (54%)
	G3	68 (37%)
	Gx	2 (1%)
Nodalstatus	N0	100 (55%)
	N1-3	69 (38%)
	x	14 (7%)
ERα-Status	neg	24 (13%)
	pos	154 (84%)
	x	5 (3%)
PR-Status	neg	50 (27%)
	pos	123 (67%)
	x	10 (6%)
HER-2-Status	neg	103 (56%)
	pos	31 (17%)
	x	49 (27%)

3.2.1. Assoziation der Genotypen der untersuchten SNPs mit der Tumorgroße

Bei der Assoziationsanalyse der untersuchten Genotypen mit dem Tumorstatus der Mammakarzinome wurden die Frühkarzinome im Stadium T1 mit fortgeschrittenen Karzinomen in den Stadien T2-T4 verglichen. Es zeigten sich hinsichtlich der Verteilung der Allele der drei untersuchten SNPs keine signifikanten Unterschiede zwischen den T-Stadien. Einen Überblick über die Verteilung der Genotypen gibt Tabelle 11.

Tabelle 11: Assoziation der Genotypen der untersuchten SNPs mit der Größe der Mammakarzinome. T- Thyrosin, C- Cytosin, A- Adenin, G- Guanin.

SNP	Allelfrequenz		Allelpositivität		Genotypfrequenz		
	T	C	CC+CT	TT+CT	TT	CC	CT
rs2987983							
T1	135 (69,6%)	59 (30,4%)	50 (51,5%)	88 (90,7%)	47 (48,5%)	9 (9,3%)	41 (42,2%)
T2-T4	117 (71,3%)	47 (28,7%)	41 (50,0%)	76 (92,6%)	41 (50,0%)	6 (7,3%)	35 (42,7%)
p		0,717	0,836	0,637			0,714
rs3020449	A	G	GG+AG	AA+AG	AA	GG	AG
T1	120 (61,9%)	74 (38,1%)	58 (59,8%)	81 (83,5%)	39 (40,2%)	16 (16,5%)	42 (43,3%)
T2-T4	97 (61,4%)	61 (38,6%)	50 (63,3%)	68 (86,1%)	29 (36,7%)	11 (13,9%)	39 (49,4%)
p		0,929	0,635	0,637			0,930
rs3020450	A	G	AA+AG	GG+AG	AA	GG	AG
T1	65 (33,5%)	129 (66,5%)	53 (54,6%)	85 (87,6%)	12 (12,4%)	44 (45,4%)	41 (42,2%)
T2-T4	48 (29,3%)	116 (70,7%)	42 (51,2%)	76 (92,7%)	6 (7,3%)	40 (48,8%)	36 (43,9%)
p		0,390	0,647	0,262			0,391

3.2.2. Assoziation der Genotypen der untersuchten SNPs mit dem Lymphknotenbefall der Mammakarzinom-Patientinnen

Beim Vergleich der Mammakarzinom-Patientinnen mit negativem Lymphknotenstatus und Patientinnen mit Lymphknotenmetastasen konnte kein Unterschied in der Verteilung der Genotypen der untersuchten SNPs gefunden werden. Tabelle 12 gibt einen Überblick über die Verteilung der Genotypen.

Tabelle 12: Assoziation der Genotypen der untersuchten SNPs mit dem Nodalstatus der Mammakarzinom-Patientinnen. T- Thyrosin, C- Cytosin, A- Adenin, G- Guanin.

SNP	Allelfrequenz		Allelpositivität		Genotypfrequenz		
	T	C	CC+CT	TT+CT	TT	CC	CT
rs2987983							
N neg	138 (69,0%)	62 (31,0%)	52 (52,0%)	90 (90%)	48 (48,0%)	10 (10,0%)	42 (42,0%)
N pos	99 (71,7%)	39 (28,3%)	35 (50,7%)	65 (90,3%)	34 (49,3%)	4 (5,8%)	31 (44,9%)
p		0,589	0,870	0,329			0,582
rs3020449	A	G	GG+AG	AA+AG	AA	GG	AG
N neg	124 (62,6%)	74 (37,4%)	58 (58,6%)	83 (83,8%)	41 (41,4%)	16 (16,2%)	42 (42,4%)
N pos	80 (59,7%)	54 (40,3%)	44 (65,7%)	56 (83,6%)	23 (34,3%)	10 (14,9%)	34 (50,8%)
p		0,646	0,357	0,829			0,597
rs3020450	A	G	AA+AG	GG+AG	AA	GG	AG
N neg	64 (32,0%)	136 (68,0%)	52 (52,0%)	88 (88,0%)	12 (12,0%)	48 (48,0%)	40 (40,0%)
N pos	43 (31,2%)	95 (68,8%)	38 (55,1%)	64 (92,7%)	5 (7,2%)	31 (44,9%)	33 (47,9%)
p		0,870	0,693	0,312			0,870

3.2.3. Assoziation der Genotypen der untersuchten SNPs mit der Tumordifferenzierung

Die Ergebnisse dieser Genotyp-Phänotyp-Assoziationsstudie zeigen keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Allelen der ER β SNPs und dem klinischen Phänotypen hinsichtlich des Tumordgradings. Die Einteilung beschränkte sich auf Tumoren mit der Tumordifferenzierung G1-3. G4-Tumore waren im Kollektiv nicht vorhanden. Tabelle 13 gibt einen Überblick über die Verteilung der Genotypen.

Tabelle 13: Assoziation der Genotypen der untersuchten SNPs mit der Tumordifferenzierung. T- Thyrosin, C- Cytosin, A- Adenin, G- Guanin. G 1+2/3 entspricht der Differenzierung (Grading).

SNP	Allelfrequenz		Allelpositivität		Genotypfrequenz		
	T	C	CC+CT	TT+CT	TT	CC	CT
rs2987983							
G 1+2	154 (68,1%)	72 (31,9%)	60 (53,1%)	101 (89,4%)	53 (46,9%)	12 (10,6%)	48 (42,5%)
G 3	98 (72,1%)	38 (27,9%)	34 (50,0%)	64 (94,1%)	34 (50,0%)	4 (5,9%)	30 (44,1%)
p		0,433	0,686	0,276			0,428
rs3020449							
G 1+2	134 (60,4%)	88 (39,6%)	68 (61,2%)	91 (82,0%)	43 (38,8%)	20 (18,0%)	48 (43,2%)
G 3	83 (61,9%)	51 (38,1%)	43 (64,2%)	59 (88,0%)	24 (35,9%)	8 (11,9%)	35 (52,2%)
p		0,767	0,697	0,280			0,769
rs3020450							
G 1+2	77 (34,0%)	149 (66,0%)	63 (55,8%)	99 (87,6%)	14 (12,4%)	50 (44,2%)	49 (43,4%)
G 3	39 (28,7%)	97 (71,3%)	35 (51,5%)	64 (94,1%)	4 (5,9%)	33 (48,5%)	31 (45,6%)
p		0,287	0,580	0,156			0,283

3.2.4. Assoziation der Genotypen der untersuchten SNPs mit der HER-2-Expression

Auch bei der Assoziation der Mammakarzinome in Bezug auf den HER-2-Status konnte kein signifikantes Ergebnis gezeigt werden.

Im Vergleich der HER-2-positiven mit den HER-2-negativen Mammakarzinomen zeigte sich aber ein Trend bei der Betrachtung des SNP rs2987983.

Hinsichtlich der Allelfrequenz zeigte sich, dass das T-Allel häufiger bei den HER-2-positiven Mammakarzinomen (79%) auftritt als bei HER-2-negativen Mammakarzinomen (66%) (p-Wert 0,052, OR 0,515 [95% C.I.: 0,262-1,013]). Die CC- und CT-Genotypen waren unter den HER-2-negativen Mammakarzinomen (11,7% bzw. 44,6%) häufiger als bei den HER-2-positiven (3,2% bzw. 35,5%), während der TT-Genotyp häufiger bei HER-2-positiven Mammakarzinomen (61,3%) als bei den HER-2-negativen (43,7%) zu finden war.

Darüber hinaus sprach das Vorhandensein des selteneren C-Allels, ob in homo- oder heterozygotem Zustand, tendentiell für einen HER-2-negativen Status (p-Wert 0,085, OR 0,490 [95% C.I.: 0,216-1,114]).

Für die beiden anderen untersuchten SNPs konnte kein Unterschied in Assoziation zum HER-2-Status gezeigt werden.

Tabelle 14 gibt den Überblick über die Genotypverteilung.

Tabelle 14: Assoziation der Genotypen der untersuchten SNPs mit dem HER-2-Status. T- Thyrosin, C- Cytosin, A- Adenin, G- Guanin.

SNP	Allelfrequenz		Allelpositivität		Genotypfrequenz		
	T	C	CC+CT	TT+CT	TT	CC	CT
rs2987983							
HER-2 neg	136 (66,0%)	70 (34,0%)	58 (56,3%)	91(88,3%)	45 (43,7%)	12 (11,7%)	46 (44,6%)
HER-2 pos	49 (79,0%)	13 (21,0%)	12 (38,7%)	30 (96,8%)	19 (61,3%)	1 (3,2%)	11 (35,5%)
p	0,052		0,085	0,164			0,053
rs3020449	A	G	GG+AG	AA+AG	AA	GG	AG
HER-2 neg	121 (60,5%)	79 (39,5%)	63 (63,0%)	84 (84,0%)	37 (37,0%)	16 (16,0%)	47 (47,0%)
HER-2 pos	41 (66,1%)	21 (33,9%)	18 (58,1%)	28 (90,3%)	13 (41,9%)	3 (9,7%)	15 (48,4%)
p		0,425	0,621	0,382			0,424
rs3020450	A	G	AA+AG	GG+AG	AA	GG	AG
HER-2 neg	73 (35,4%)	133 (64,6%)	59 (57,3%)	89 (86,4%)	14 (13,6%)	44 (42,7%)	45 (43,7%)
HER-2 pos	17 (27,4%)	45 (72,6%)	15 (48,3%)	29 (93,5%)	2 (6,5%)	16 (51,6%)	13 (41,9%)
p		0,241	0,382	0,282			0,248

3.2.5. Assoziation der Genotypen der untersuchten SNPs mit dem Steroidrezeptorstatus der Mammakarzinome

Die Analyse der Assoziation zwischen Östrogenrezeptor α (ER α) positiven und negativen Mammakarzinomen sowie Progesteronrezeptor (PR) positiven und negativen Karzinomen konnte keine unterschiedliche Verteilung der Genotypen zeigen. Einen Überblick über die Verteilung der Genotypen geben die Tabellen 15 und 16.

Tabelle 15: Assoziation der Genotypen der untersuchten SNPs mit dem ER α -Status. T- Thyrosin, C- Cytosin, A- Adenin, G- Guanin.

SNP	Allelfrequenz		Allelpositivität		Genotypfrequenz		
	T	C	CC+CT	TT+CT	TT	CC	CT
rs2987983							
ER α neg	36 (69,2%)	16 (30,8%)	15 (57,6%)	25 (96,2%)	11 (42,4%)	1 (3,8%)	14 (53,8%)
ER α pos	205 (70,2%)	87 (29,8%)	74 (50,7%)	140 (90,9%)	72 (49,3%)	13 (8,9%)	61 (41,8%)
p		0,887	0,510	0,384			0,885
rs3020449	A	G	GG+AG	AA+AG	AA	GG	AG
ER α neg	29 (55,8%)	23 (44,2%)	19 (73,1%)	22 (84,6%)	7 (26,9%)	4 (15,4%)	15 (57,7%)
ER α pos	179 (58,9%)	107 (41,1%)	85 (59,4%)	128 (84,8%)	58 (40,6%)	22 (15,3%)	63 (44,1%)
p		0,358	0,188	1,0			0,358
rs3020450	A	G	AA+AG	GG+AG	AA	GG	AG
ER α neg	17 (32,7%)	35 (67,3%)	16 (61,5%)	25 (96,2%)	1 (3,8%)	10 (38,5%)	15 (57,7%)
ER α pos	92 (31,5%)	200 (68,5%)	76 (52,1%)	136 (88,9%)	16 (11,0%)	70 (47,9%)	60 (41,1%)
p		0,865	0,371	0,262			0,358

Tabelle 16: Assoziation der Genotypen der untersuchten SNPs mit dem PR-Status. T- Thyrosin, C- Cytosin, A- Adenin, G- Guanin.

SNP	Allelfrequenz		Allelpositivität		Genotypfrequenz		
	T	C	CC+CT	TT+CT	TT	CC	CT
rs2987983							
PR neg	83 (72,8%)	31 (27,2%)	28 (49,1%)	54 (94,7%)	29 (50,9%)	3 (5,3%)	25 (43,8%)
PR pos	160 (69,0%)	72 (31,0%)	61 (52,6%)	111 (90,2%)	55 (47,4%)	11 (9,5%)	50 (43,1%)
P		0,462	0,668	0,338			0,454
rs3020449							
PR neg	69 (61,6%)	43 (38,4%)	35 (62,5%)	48 (85,7%)	21 (37,5%)	8 (14,3%)	27 (48,2%)
PR pos	141 (61,8%)	87 (38,2%)	69 (60,5%)	102 (84,3%)	45 (39,5%)	18 (15,8%)	51 (44,7%)
P		0,966	0,804	0,797			0,967
rs3020450							
PR neg	31 (27,2%)	83 (72,8%)	28 (49,1%)	54 (94,7%)	3 (5,3%)	29 (50,9%)	25 (43,8%)
PR pos	78 (33,6%)	154 (66,4%)	64 (55,2%)	108 (87,8%)	14 (12,1%)	52 (44,8%)	50 (43,1%)
P		0,226	0,453	0,157			0,225

3.2.6. Assoziation der Genotypen der untersuchten SNPs mit dem Patientenalter

Für die Assoziation der Genotypen mit dem Alter (Alter bei Erstdiagnose) wurden die Patientinnen in eine jüngere (<59 Jahren) und eine ältere Gruppe (≥ 59 Jahre) eingeteilt. Bei der Untersuchung des SNP rs3020450 zeigte sich hinsichtlich der G-Allelpositivität, dass das G-Allel insgesamt häufiger bei der jüngeren Patientengruppe zu finden ist (96% vs. 86%) (p-Wert 0,024, OR 0,252 [95% C.I.: 0,070-0,904]). Somit ist die Abwesenheit des A-Allels bei den Jüngeren häufiger als bei den Älteren. Homozygot für das A-Allel sind 4% der jüngeren und 14% der älteren Patientinnen. Die jüngere Patientengruppe wich bei der Genotypenverteilung dieses SNP mit einem p-Wert = 0,048 vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ab.

Hinsichtlich des SNP rs2987983 zeigte sich ein Trend bei der T-Allelpositivität. Somit ist das T-Allel in hetero- oder homozygotem Zustand tendentiell häufiger bei der jüngeren Patientengruppe (96,1%) zu finden als bei den Älteren (87,4%) (p-Wert 0,052, OR 0,297 [95% C.I.: 0,082-1,082]).

Für den SNP rs3020449 konnte keine Assoziation zum Patientenalter gezeigt werden.

Einen Überblick über die Verteilung der Genotypen gibt Tabelle 17.

Tabelle 17: Assoziation der Genotypen der untersuchten SNPs mit dem Alter. T- Thyrosin, C- Cytosin, A- Adenin, G- Guanin.

SNP	Allelfrequenz		Allelpositivität		Genotypfrequenz		
	T	C	CC+CT	TT+CT	TT	CC	CT
rs2987983							
< 59 Jahre	110 (72,4%)	42 (27,6%)	39 (51,3%)	73 (96,1%)	37 (48,7%)	3 (3,9%)	36 (47,4%)
≥ 59 Jahre	146 (68,2%)	68 (31,8%)	55 (51,4%)	52 (87,9%)	52 (48,6%)	13 (12,1%)	42 (39,3%)
p		0,394	0,990	0,052			0,390
rs3020449	A	G	GG+AG	AA+AG	AA	GG	AG
< 59 Jahre	97 (64,7%)	53 (35,3%)	45 (60,0%)	67 (89,3%)	30 (40,0%)	8 (10,7%)	37 (49,3%)
≥ 59 Jahre	124 (59,0%)	86 (41,0%)	66 (62,8%)	85 (81%)	39 (37,2%)	20 (19,0%)	46 (43,8%)
p		0,280	0,697	0,126			0,286
rs3020450	A	G	AA+AG	GG+AG	AA	GG	AG
< 59 Jahre	44 (28,9%)	108 (71,1%)	41 (54,0%)	73 (96,0%)	3 (4,0%)	35 (46,0%)	38 (50,0%)
≥ 59 Jahre	72 (33,6%)	142 (66,4%)	57 (53,3%)	92 (86,0%)	15 (14,0%)	50 (46,7%)	42 (39,3%)
p		0,341	0,927	0,024			0,338

Eine initiale Aufteilung der Patientinnen in Gruppen anhand des mittleren Menopausenalters in Deutschland (52 Jahre) konnte keine statistisch signifikanten Ergebnisse zeigen.

3.3. Vergleich der Patientinnen mit Mammakarzinom mit anderen Krankheitsentitäten der Mamma sowie Kontrollgruppen

In diesem Abschnitt wurden die Patientinnen mit Mammakarzinom, DCIS, Fibroadenom und Mastopathie sowie die gesunde Kontrollgruppe anhand der SNP rs2987983, rs3020449 und rs3020450 genotypisiert und untereinander verglichen. Tabelle 18 gibt einen Überblick über die Verteilung der Genotypen und Allelfrequenzen aller Gruppen.

Tabelle 18: Überblick über die Verteilung von Allel- und Genotypfrequenzen der einzelnen Gruppen. T- Thyrosin, C- Cytosin, A- Adenin, G- Guanin.

SNP	Allelfrequenz		Genotypfrequenz		
	T	C	TT	CC	CT
rs2987983					
Gesund	192 (64,4%)	106 (35,6%)	56 (37,6%)	13 (8,7%)	80 (53,7%)
Karzinom	256 (69,9%)	110 (30,1%)	89 (48,6%)	16 (8,7%)	78 (42,6%)
DCIS	55 (67,1%)	27 (32,9%)	19 (46,3%)	5 (12,2%)	17 (41,5%)
Fibroadenom	67 (68,4%)	31 (31,6%)	23 (46,9%)	5 (10,2%)	21 (42,9%)
Mastopathie	78 (72,2%)	30 (27,8%)	28 (51,9%)	4 (7,4%)	22 (40,7%)
rs3020449	A	G	AA	GG	AG
Gesund	163 (55,4%)	131 (44,6%)	45 (30,6%)	29 (19,7%)	73 (49,7%)
Karzinom	221 (61,4%)	139 (38,6%)	69 (38,3%)	28 (15,6%)	83 (46,1%)
DCIS	44 (48,9%)	46 (51,1%)	8 (17,8%)	9 (20,0%)	28 (62,2%)
Fibroadenom	54 (58,7%)	38 (41,3%)	14 (30,4%)	6 (13,1%)	26 (56,6%)
Mastopathie	61 (56,5%)	47 (43,5%)	17 (31,5%)	10 (18,5%)	27 (50,0%)
rs3020450	A	G	AA	GG	AG
Gesund	106 (35,3%)	194 (64,7%)	17 (11,3%)	61 (40,7%)	72 (48,0%)
Karzinom	116 (31,7%)	250 (68,3%)	18 (9,8%)	85 (46,4%)	80 (43,8%)
DCIS	36 (39,1%)	56 (60,9%)	6 (13,0%)	16 (34,8%)	24 (52,2%)
Fibroadenom	29 (30,2%)	67 (69,8%)	3 (6,3%)	22 (45,8%)	23 (47,9%)
Mastopathie	36 (34,0%)	70 (66,0%)	5 (9,4%)	22 (41,5%)	26 (49,1%)

3.3.1. Vergleich gesunde Kontrollgruppe mit Mammakarzinomen

Im Vergleich der Gruppe der Mammakarzinome mit der gesunden Kontrollgruppe hinsichtlich der Genotypenverteilung der drei untersuchten SNPs ergab sich ein statistisch signifikantes Ergebnis bei der Untersuchung des SNP rs2987983 und der C-Allelpositivität (p-Wert 0,043, OR 0,636 [95% C.I.: 0,409-0,988]). Das Vorhandensein eines C-Allels ist hier signifikant häufiger bei den Gesunden (62,4%) als bei den Karzinompatienten (51,4%). Allerdings weicht die gesunde Kontrollgruppe vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ab, $p=0,036$. Hinsichtlich der Genotypfrequenzen ist der homozygote Genotyp CC gleich häufig (8,7%) bei Gesunden und Karzinomen zu finden.

Es konnte keine Assoziation des Mammakarzinomrisikos mit den beiden anderen SNP gesehen werden. (Tabelle 19)

Tabelle 19: Vergleich Gesunde und Karzinome. T- Thyrosin, C- Cytosin, A- Adenin, G- Guanin.

SNP	Allelfrequenz		Allelpositivität		Genotypfrequenz		
	T	C	TT+CT	CC+CT	TT	CC	CT
rs2987983							
Gesund	192 (64,4%)	106 (35,6%)	136 (91,3%)	93 (62,4%)	56 (37,6%)	13 (8,7%)	80 (53,7%)
Karzinom	256 (69,9%)	110 (30,1%)	167 (91,3%)	94 (51,4%)	89 (48,7%)	16 (8,7%)	78 (42,6%)
P		0,131	0,995	0,043			0,114
rs3020449	A	G	AA+AG	GG+AG	AA	GG	AG
Gesund	163 (55,4%)	131 (44,6%)	118 (80,3%)	102 (69,4%)	45 (30,6%)	29 (19,7%)	73 (49,7%)
Karzinom	221 (61,4%)	139 (38,6%)	152 (84,4%)	111 (61,7%)	69 (38,3%)	28 (15,6%)	83 (46,1%)
P		0,124	0,322	0,144			0,127
rs3020450	A	G	AA+AG	GG+AG	AA	GG	AG
Gesund	106 (35,3%)	194 (64,7%)	89 (59,3%)	133 (88,7%)	17 (11,3%)	61 (40,7%)	72 (48,0%)
Karzinom	116 (31,7%)	250 (68,3%)	98 (53,6%)	165 (90,2%)	18 (9,8%)	85 (46,4%)	80 (43,7%)
P		0,322	0,657	0,290			0,314

3.3.2. Vergleich Mammakarzinome und DCIS

Im Vergleich der Mammakarzinome mit DCIS zeigte sich hinsichtlich des SNP rs 3020449, dass das seltenere A-Allel häufiger beim Karzinom (61,4%) auftritt als bei DCIS (48,9%) (p-Wert 0,031, OR=0,602 [95% K.I.: 0,378-0,957]). Das G-Allel, ob in homo- oder heterozygotem Zustand, kam statistisch signifikant häufiger bei DCIS vor als bei Mammakarzinomen (p-Wert 0,009, OR=0,348 [95% C.I.: 0,153-0,791]). Der Genotyp AA war signifikant häufiger bei den Karzinomen (38,3%) als bei DCIS (17,8%), während der Genotyp GG bei DCIS häufiger nachzuweisen war (20% vs. 15,6%).

Für die beiden anderen SNPs zeigten sich keine signifikanten Ergebnisse.

Tabelle 20: Vergleich DCIS und Karzinome. T- Thyrosin, C- Cytosin, A- Adenin, G- Guanin.

SNP	Allelfrequenz		Allelpositivität		Genotypfrequenz		
	T	C	TT+CT	CC+CT	TT	CC	CT
rs2987983							
DCIS	55 (67,1%)	27 (32,9%)	36 (87,8%)	22 (53,6%)	19 (46,3%)	5 (12,2%)	17 (41,5%)
Karzinom	256 (69,9%)	110 (30,1%)	167 (91,3%)	94 (51,4%)	89 (48,6%)	16 (8,7%)	78 (42,6%)
p		0,610	0,493	0,790			0,610
rs3020449							
DCIS	44 (48,9%)	46 (51,1%)	26 (57,8%)	37 (82,2%)	8 (17,8%)	9 (20,0%)	28 (62,2%)
Karzinom	221 (61,4%)	139 (38,6%)	152 (84,4%)	111 (61,7%)	69 (38,3%)	28 (15,6%)	83 (46,1%)
p		0,031	0,471	0,009			0,029
rs3020450							
DCIS	36 (39,1%)	56 (60,9%)	30 (65,2%)	40 (87,0%)	6 (13,0%)	16 (34,8%)	24 (52,2%)
Karzinom	116 (31,7%)	250 (68,3%)	98 (53,6%)	165 (90,2%)	18 (9,8%)	85 (46,4%)	80 (43,7%)
p		0,176	0,525	0,154			0,170

3.3.3. Vergleich Gesunde und DCIS

Im Vergleich der Gesunden mit DCIS konnte bei Betrachtung des SNP rs3020449 ein Trend festgestellt werden (Tabelle 20).

Es zeigte sich, dass das Vorhandensein eines G-Allels, ob in homo- oder heterozygoten Zustand, das Risiko für ein DCIS im Vergleich zu den Gesunden tendentiell erhöht (p-Wert 0,091, OR=2,040 [95% C.I.: 0,880-4,730]).

Für die beiden anderen SNPs konnte keine Signifikanz ermittelt werden.

Tabelle 21: Vergleich Gesunde und DCIS. T- Thyrosin, C- Cytosin, A- Adenin, G- Guanin.

SNP	Allelfrequenz		Allelpositivität		Genotypfrequenz		
	T	C	TT+CT	CC+CT	TT	CC	CT
rs2987983							
Gesund	192 (64,4%)	106 (35,6%)	136 (91,3%)	93 (62,4%)	56 (37,6%)	13 (8,7%)	80 (53,7%)
DCIS	55 (67,1%)	27 (32,9%)	36 (87,8%)	22 (53,6%)	19 (46,3%)	5 (12,2%)	17 (41,5%)
p		0,657	0,501	0,309			0,635
rs3020449							
Gesund	163 (55,4%)	131 (44,6%)	118 (80,3%)	102 (69,4%)	45 (30,6%)	29 (19,7%)	73 (49,7%)
DCIS	44 (48,9%)	46 (51,1%)	26 (57,8%)	37 (82,2%)	8 (17,8%)	9 (20,0%)	28 (62,2%)
p		0,275	0,968	0,091			0,260
rs3020450							
Gesund	106 (35,3%)	194 (64,7%)	89 (59,3%)	133 (88,7%)	17 (11,3%)	61 (40,7%)	72 (48,0%)
DCIS	36 (39,1%)	56 (60,9%)	30 (65,2%)	40 (87,0%)	6 (13,0%)	16 (34,8%)	24 (52,2%)
p		0,507	0,474	0,752			0,494

Im Vergleich der weiteren Gruppen untereinander konnte weder ein signifikantes Ergebnis noch ein Trend ermittelt werden. Tabellen der Aufteilung der Genotypen in den verschiedenen Gruppen sind im Tabellenverzeichnis aufgelistet.

3.4. Haplotypenanalyse

Insgesamt zeigte sich, dass die Haplotypen TT-AA-GG (rs2987983=TT, rs3020449=AA und rs3020450=GG) und CT-AG-AG (rs2987983=CT, rs3020449=AG und rs3020450=AG) am häufigsten auftraten. Der Haplotyp TT-AA-GG zeigte sich bei 35,5% (n= 65) der Fälle und CT-AG-AG bei 32,2% (n= 59) von insgesamt 183 Mammakarzinomen. Die weitere statistische Analyse wurde deshalb auf diese beiden Haplotypen beschränkt, ohne jedoch eine Assoziation mit dem Mammakarzinom, DCIS, Fibroadenom oder Mastopathie zu zeigen. Die Haplotypen waren in den Gruppen jeweils ähnlich verteilt.

Einen Überblick über die Verteilung der häufigsten Haplotypen gibt Tabelle 22.

Tabelle 22: Überblick über die Verteilung der häufigsten Haplotypen in den Gruppen. T- Thyrosin, C- Cytosin, A- Adenin, G- Guanin.

	TT-AA-GG	CT-AG-AG	TT-AG-GG	CC-GG-AA	CT-GG-AG
Gesunde	35 (31,3%)	53 (47,4%)	11 (9,8%)	6 (5,4%)	7 (6,3%)
Karzinom	65 (39,4%)	59 (35,8%)	17 (10,3%)	13 (7,9%)	11 (6,6%)
DCIS	8 (26,6%)	11 (36,6%)	5 (16,7%)	4 (13,4%)	2 (6,7%)
Fibroadenom	9 (26,5%)	13 (38,2%)	8 (23,5%)	2 (5,9%)	2 (5,9%)
Mastopathie	15 (32,6%)	20 (43,5%)	5 (10,9%)	4 (8,7%)	2 (4,3%)

Bei der Analyse der Haplotypen in Assoziation mit den klinisch-pathologischen Charakteristika der Mammakarzinompatienten konnte kein statistisch interessantes Ergebnis ermittelt werden. Auch hier zeigte sich eine ähnlich gleiche Verteilung der Haplotypen. Hierzu gibt Tabelle 23 einen Überblick.

Tabelle 23: Assoziation der Haplotypen und den klinischen Daten der Karzinome. T- Thyrosin, C- Cytosin, A- Adenin, G- Guanin.

Klinische Daten	TT-AA-GG	CT-AG-AG	P
T1	36 (55,4%)	29 (44,6%)	0,554
T2 – T4	28 (50,0%)	28 (50,0%)	
G 1+2	41 (54,0%)	35 (46,0%)	0,512
G3	22 (47,8%)	24 (52,2%)	
N neg	38 (55,9%)	30 (44,1%)	0,398
N pos	22 (47,8%)	24 (52,2%)	
ER pos	55 (55,0%)	45 (45,0%)	0,133
ER neg	6 (30,0%)	11 (70,0%)	
PR pos	42 (53,2%)	37 (46,8%)	0,847
PR neg	20 (51,3%)	19 (48,7%)	
Her-2 pos	13 (59,1%)	9 (40,9%)	0,357
Her-2 neg	33 (47,8%)	36 (52,2%)	

4. Diskussion

SNPs in Genen des Metabolismus oder Signalweges von Steroidhormonen sind potentielle Faktoren, die das Karzinomrisiko in hormonabhängigen Geweben beeinflussen können (Cribb et al, 2006). Seit der Entdeckung des ER β -Gens und seines Produkts ER β im Jahr 1996 haben einige Studiengruppen dessen Expressionsmuster charakterisiert, aber nur wenige haben mögliche Zusammenhänge zwischen ER β -Polymorphismen und Risiken, ein Mammakarzinom zu entwickeln, untersucht.

SNPs in der Promotorregion zahlreicher Gene wurden bereits mit dem Risiko, verschiedene Erkrankungen zu entwickeln, in Verbindung gebracht, beispielsweise mit Asthma und Morbus Alzheimer. Zu beiden Erkrankungen wurden Polymorphismen in einer Promotorregion mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko beschrieben (Gao et al, 2006) (Capurso et al, 2004).

Weiterhin gibt es Untersuchungen zu einem möglichen Zusammenhang von Promotorpolymorphismen und der Vererbung von Erkrankungen. Eine chinesische Studie hat SNPs in der Promotorregion des BRCA1-Gens untersucht und eine Veränderung der Promotoraktivität beschrieben, welche Vererbung von Mammakarzinomen beeinflussen kann (Chan et al, 2009).

In der hier vorgelegten Arbeit sollte geprüft werden, ob Polymorphismen im ER β -Gen mit einem erhöhten Mammakarzinomrisiko in Verbindung stehen.

Für diese Studie fokussierten wir uns auf drei Polymorphismen, die in der Promotorregion des ER β -Gens liegen und somit eine mögliche funktionelle Bedeutung bei der Proteinbildung haben.

Nachfolgend sollen die Ergebnisse dieser Arbeit im Spiegel der Literatur diskutiert werden.

4.1. Mammakarzinome in Assoziation mit klinisch-pathologischen Kriterien

Im ersten Teil dieser Studie wurde der mögliche Zusammenhang zwischen den Genotypen der drei untersuchten SNPs und klinisch-pathologischen Daten bei den Mammakarzinompatientinnen untersucht.

Assoziation mit pathologischen Kriterien

Die Ergebnisse dieser Genotyp-Phänotyp Assoziationsstudie zeigten keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Allelen der ER β -SNPs oder deren Haplotypen und dem klinischen Phänotyp hinsichtlich des Tumorstatus, des Lymphknotenbefalls oder des Tumorgradings.

Auch in der Literatur wurde bisher keine statistisch signifikante Assoziation von Tumorausprägung oder Differenzierung mit SNPs im ER β -Gen beschrieben.

Bei der Assoziation des HER-2-Status der Mammakarzinome mit dem SNP rs2987983 zeigten die statistischen Analysen eine Tendenz, die das T-Allel als möglichen Risikofaktor für eine HER-2-Überexpression darlegen. Statistische Signifikanz konnte allerdings nicht erreicht werden. Auch in der Assoziation mit den Haplotypen konnte kein Zusammenhang gefunden werden.

Bei der Untersuchung auf Assoziation mit dem Hormonrezeptorstatus des Östrogenrezeptors α und des Progesteronrezeptors konnte weder ein statistisch signifikanter Zusammenhang mit den untersuchten Genotypen noch den Haplotypen gezeigt werden.

Der Grenzwert für Positivität wurde hier durch einen IRS-Score von größer als 2 angegeben. Dieser Wert diente bislang als Einteilung in Rezeptor positive und negative Karzinome (Gown, 2008). Eine alternative Einteilung, bei der nur die Karzinome mit einem Scorewert von 0 als negativ gewertet wurden, konnte auch keine positive Assoziation mit einem SNP-Allel zeigen (Daten nicht gezeigt). Diese Einteilung wurde bedacht, da nach dem aktuellen St.Gallen-Konsens von 2009 jede immunhistochemische Reaktion des ER eines Mammakarzinoms eine hormonelle Therapie rechtfertigt (Goldhirsch et al, 2009).

Bei der Haplotypenuntersuchung in dieser Arbeit konnte für keine der Tumorcharakteristika ein Zusammenhang mit einem erhöhtem Karzinomrisiko dargestellt werden.

Auch in einer Studie von Cox et al. konnte in einer Haplotypenanalyse des ER β -Gens keine Assoziation mit dem ER α - oder PR-Status nachgewiesen werden (Cox et al, 2008).

Assoziation mit dem Alter

Bei der Betrachtung der Assoziation des Patientenalters zum Zeitpunkt der Erstdiagnose mit den Genotypen der SNPs wurde die Studienpopulation in zwei Gruppen eingeteilt. Die jüngere Gruppe (<59 Jahre) erfüllte dabei knapp nicht das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Hinsichtlich der G-Allelpositivität war das G-Allel im SNP rs3020450 häufiger bei der jüngeren Patientengruppe zu finden als bei den Älteren, oder anders interpretiert ist die Abwesenheit des A-Allels häufiger bei der jüngeren Gruppe als bei der älteren. Dieses

Ergebnis ist kritisch zu bewerten, da zum einen die Gruppe der Jüngeren nicht das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht erfüllt, zum anderen in Anbetracht der Allelfrequenz oder Genotypfrequenzen sich keinerlei Unterschied zwischen den Altersgruppen zeigte.

Eine Tendenz ergab sich bei der T-Allelpositivität des SNPs rs2987983, wonach das T-Allel häufiger in der jüngeren Gruppe zu finden ist. Da aber Allelfrequenz und Genotypfrequenz keinen Trend oder eine Signifikanz zeigten, ist auch dieses Ergebnis zurückhaltend zu bewerten, was seine klinische Aussagekraft betrifft.

Die Einteilung in die Altersgruppen ergab sich aus dem durchschnittlichen Diagnosealter (59 Jahre) aller Patientinnen die in dieser eingeschlossen waren. Eine in anderen Studien teilweise gewählte Einteilung in eine postmenopausale und eine prämenopausale Gruppe war nicht möglich, da keine Primärdaten zum Menopausenalter zur Verfügung standen.

Eine alternative Aufteilung der Patientinnen anhand des mittleren Menopausenalters in Deutschland (52 Jahre) konnte auch keine statistisch signifikanten Ergebnisse zeigen.

Das mittlere Diagnosealter der Studienpopulation ist vergleichbar dem Diagnosealter einer großen Studie (5789 Fälle und 7761 Kontrollen) des „National Cancer Institute Breast and Prostate Cancer Cohort Consortium“. In dieser Arbeit konnte ein Haplotyp im ER β -Gen als Risikofaktor nur bei jüngeren Patientinnen (jünger als 63 Jahre) gefunden werden (Cox et al, 2008).

In einer großen Studie aus China (1459 Fälle) konnte eine schwache Assoziation eines ER β -SNP (rs1256054) mit einem erhöhten Mammakarzinomrisiko bei postmenopausalen Patientinnen, die eine verlängerte Östrogenexposition aufgrund später Menopause hatten, gezeigt werden (Zheng et al, 2003).

4.2. Vergleich der Gruppen untereinander

In einem zweiten Teil dieser Arbeit wurden neben den Mammakarzinomen auch eine gesunde Kontrollgruppe (n=151), Patienten mit DCIS (n=46), Mastopathie (n=54) und Fibroadenomen (n=49) anhand der drei SNPs genotypisiert und miteinander verglichen.

Mammakarzinome und Kontrollen

Im Vergleich der Mammakarzinome mit der gesunden Kontrollgruppe zeigte sich anhand der C-Allelpositivität bei SNP rs2987983 eine Häufung des C-Allels bei den Gesunden. Allerdings erfüllte die gesunde Kontrollgruppe nicht das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht und

auch in Betrachtung der Allelfrequenz konnte kein Unterschied in der Verteilung der Genotypen gesehen werden. Der homozygote CC-Genotyp ist bei beiden Gruppen sogar gleich häufig vorhanden, so dass dieses Ergebnis schwer zu interpretieren ist und eher als Zufallsereignis gewertet werden kann.

In der späteren Analyse unserer Studiengruppe mit der höheren Fallzahl wurde im Gegensatz dazu beschrieben, dass ein homozygoter CC Genotyp des SNP rs2987938 ein Risikofaktor für die Mammakarzinomentstehung sein könnte. Die Analyse der Allelfrequenzen bekräftigte diese Aussage, da eine höhere C-Allelfrequenz dieses Polymorphismus in Frauen mit Mammakarzinom gezeigt wurde. Auch anhand der Allelpositivität konnte gesehen werden, dass eine reine Präsenz des C-Allels ein erhöhtes Mammakarzinomrisiko bedingt (Treeck et al, 2009).

Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit Analysen an Patienten mit Prostatakarzinom, in denen der SNP rs2987983 in einer großen schwedischen Studie mit 1415 Prostatakarzinomen und 801 Kontrollen analysiert und der CC sowie TC Genotyp als Risikofaktor für dieses Karzinom beschrieben wurde (Thellenberg-Karlsson et al, 2006).

Auch bei nicht malignen Erkrankungen konnte dieses Allel als Risikofaktor beschrieben werden. So konnte in einer anderen schwedischen Studie (354 Fälle und 380 Kontrollen) das C-Allel im SNP rs2987983 als Risikoallel für Hypospadie beschrieben werden (Beleza-Meireles et al, 2007).

Für die Assoziation der SNP rs3020450 und rs3020449 und dem Mammakarzinomrisiko konnten keine signifikanten Ergebnisse in der Verteilung der einzelnen SNPs oder den Haplotypen ermittelt werden. Dies stimmt mit einer großen Studie überein, in der insgesamt 528173 SNPs bei 1145 postmenopausalen Mammakarzinompatienten und eben so viele Kontrollen genotypisiert wurden. Dort konnte unter anderem gezeigt werden, dass es keinen Zusammenhang zwischen dem SNP rs3020450 und einem erhöhten Mammakarzinomrisiko gibt (Hunter et al, 2007).

In einer anderen Studie wurde dieser SNP auf das Risiko für Ovarialkarzinome untersucht. Es konnte keine Assoziation der SNP-Genotypen mit einem Risiko für ein Ovarialkarzinom gefunden werden (Lurie et al, 2009).

In einer Studie aus Finnland, in der 219 sporadische Mammakarzinomfälle und 248 Kontrollen anhand von sechs SNPs genotypisiert wurden, zeigte sich ebenso kein Unterschied in der Allelverteilung (Forsti et al, 2003).

2004 untersuchte eine Studiengruppe aus den USA acht SNPs im ER β -Gen und fand ein erhöhtes Mammakarzinomrisiko bei einer Population von jüdischen Frauen in der Haplotypenanalyse, aber keine Assoziation bei den einzelnen SNPs (Gold et al, 2004).

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich in einer größeren schwedischen Studie, in der die Genotypisierung von 723 Mammakarzinomfällen und 480 Kontrollen anhand drei ER β -SNPs erfolgte und ein Haplotyp beschrieben werden konnte, der mit einem statistisch signifikant erhöhten Mammakarzinomrisiko assoziiert ist. Aber auch in dieser Studie zeigten die einzelnen SNPs keine Assoziation mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko (Maguire et al, 2005).

Daher stimmen unsere Ergebnisse mit der bis jetzt veröffentlichten Literatur überein und die untersuchten SNPs scheinen keinen Risikofaktor für das Mammakarzinom darzustellen.

DCIS und Kontrollen

Bei der Assoziation der DCIS-Gruppe mit der Kontrollgruppe zeigte sich für die G-Allelpositivität des SNP rs3020449 eine Tendenz. Insgesamt war das G-Allel, ob in homo- oder heterozygotem Zustand, häufiger bei DCIS zu finden als bei den Kontrollen. Da aber die Kontrollgruppe auch hier nicht das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht erfüllt, muss dieses Ergebnis vorsichtig interpretiert werden, da sich auch bei der Allelfrequenz und der Genotypfrequenz im Vergleich der DCIS-Gruppe mit den gesunden Kontrollen keine statistische Signifikanz oder ein Trend zeigte.

Diese Assoziation des G-Allels im SNP rs3020449 zu DCIS konnte aber auch im Vergleich der Karzinomgruppe mit der DCIS-Gruppe bekräftigt werden. In diesem Vergleich war das G-Allel signifikant häufiger bei DCIS als bei den Karzinomen. Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied in der Allelfrequenz, Genotypfrequenz und der G-Allelpositivität für diesen SNP.

Im Überblick dieser Ergebnisse wäre es interessant die Untersuchung mit einer größeren Fallpopulation zu wiederholen um zu sehen, ob sich das G-Allel im SNP rs3020449 als Risikoallel für ein DCIS bestätigen lässt.

Für die beiden anderen SNP rs2987983 und rs3020450 konnte kein Unterschied in der Verteilung der Genotypen gefunden werden. Auch die Haplotypenanalyse brachte keine Ergebnisse.

In der Literatur wurden bisher noch keine Assoziationstudien dieser ER β Polymorphismen und einem Risiko für DCIS beschrieben.

Vergleich der restlichen Gruppen

Die Vergleiche von Mastopathie und Fibroadenom mit den anderen Gruppen ergaben keine statistisch relevanten Ergebnisse. Auch in der Literatur finden sich bislang keine Studien dazu. Da es sich bei der Mastopathie und Fibroadenomen um benigne Veränderungen der Brustdrüse handelt, wurden diese bei der Analyse auch in einer Gruppe zusammengefasst, um eine größere Fallzahl zu erreichen und mit den Genotypen der Mammakarzinome verglichen (Tabelle 24 im Anhang). Diese Analyse erbrachte aber keine relevanten Ergebnisse.

4.3. Methodik

Genomweite SNP-Analysen gehören mittlerweile zum Goldstandard bei der Suche nach genetischen Variationen, die das Risiko für weit verbreitete Erkrankungen erhöhen können. In dieser Arbeit wurde für die Genotypisierung die Methode der Tetra-Primer ARMS-PCR gewählt. In den meisten SNP-Studien werden derzeit andere Methoden zu SNP-Analyse angewendet, die aber teils mit höheren Kosten verbunden sind, spezielle Arbeitsgeräte oder mehrere Arbeitsschritte benötigen. Hierzu gehören als Beispiel die RFLP (Restriktionsfragmentlängen Polymorphismus) oder der Tag Man assay (Livak, 1999; Hui et al, 2008). Eine zeitgemäße und effiziente Methode, eine größere Anzahl an SNPs zu genotypisieren, stellt die sog. matrix-assisted laser-desorption / ionisation time-of-flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF) dar.

Die hier angewandte Methode der Tetra-Primer ARMS-PCR ist eine effiziente, einfache und somit gut reproduzierbare Methode zur SNP-Genotypisierung, die sich im Rahmen von Arbeiten mit mittelgroßen Kollektiven gut eignet.

Einzig die Planung der Primer kann zeitaufwändig sein, was aber mit Hilfe eines über das Internet zugänglichen Programmes gut möglich ist: http://cedar.genetics.soton.ac.uk/public_html/primer1.html. (Ye et al, 2001).

Allgemein war die Fallpopulation in dieser Arbeit gerade bei den DCIS, Mastopathie und Fibroadenom Patientinnen kleiner als die der Mammakarzinome und der gesunden Kontrollen. Schon durch eine in etwa doppelt so große Fallzahl und Kontrollen können völlig gegensätzliche Ergebnisse erzielt werden. Dies ermutigt, die Arbeit mit größeren Kollektiven fortzusetzen.

Insgesamt ist zu beachten, dass bei der Durchführung von Assoziationsstudien eine offensichtliche Assoziation nicht unbedingt kausal relevant sein muss. Eine dem Anschein nach vorhandene Assoziation kann möglicherweise auf einem statistischen Fehler beruhen. Das bedeutet, dass bei einer genügend großen Menge an untersuchten Markern rein zufällig einer oder mehrere eine offensichtliche statistische Assoziation mit der Erkrankung zeigen. In unserer Studie wurden verschiedene Maßnahmen unternommen, um diesen Fehler zu vermeiden und um die gefundenen Assoziationen zu validieren.

4.4. Bedeutung und Aussichten

Die Einwirkung von endogenen und exogenen Steroidhormonen ist mit einem erhöhten Mammakarzinomrisiko assoziiert. Dieses Risiko kann hypothetisch durch Gene der Steroidhormonsynthese, deren Metabolismus oder Signalwege beeinflusst werden.

In der Therapie des Mammakarzinoms werden zunehmend Substanzen mit Angriff an Hormonrezeptoren verwendet und damit Einfluß auf hormonell gesteuerte Signalwege genommen. Dabei werden ER α und ER β gleichermaßen als Zielstruktur genutzt.

Der ER α -Status gilt mittlerweile als ein etablierter prädiktiver Marker für die Wirksamkeit einer endokrinen Therapie bei Mammakarzinomen (Ali and Coombes, 2002; Murphy and Watson, 2006).

Etwa ein Drittel der ER α -positiven Patientinnen ist aber initial resistent auf die Therapie. Andere entwickeln im Laufe der Therapie eine Resistenz. Eine mögliche Erklärung dafür ist eine Veränderung der Hormonrezeptoren. Somit ist die genaue Betrachtung der Expression der Hormonrezeptoren (ER α , ER β und PR) sowie deren genetische Struktur ein wichtiger und interessanter Faktor, der in Zukunft als prognostischer Indikator bei der Therapie des Mammakarzinoms dienen könnte.

So ist es Ziel, die Therapie des Mammakarzinoms noch spezifischer und individualisierter entwickeln zu können. Spezifische Zieltherapien auf ER α oder ER β könnten neue therapeutische Möglichkeiten bieten, um die bestehenden Therapien zu verbessern und möglicherweise unerwünschte Nebenwirkungen zu reduzieren (Ali und Coombes, 2002; Murphy und Watson, 2006). Beispiele solcher unerwünschter Nebenwirkungen sind die Proliferation des Uterus und der Brustdrüse über ER α -vermittelte Effekte.

Ziel dieser Untersuchung war es, einen weiteren Angriffspunkt der Hormontherapie sowie mögliche Einflussfaktoren zu finden. Bisher wurde bei der Untersuchung der Hormonrezeptoren nur gezielt der Status des ER α und des PR festgelegt. Eine selektive Teilung des ER β könnte zur Individualisierung beitragen. Dieser Ansatz wurde schon verschiedenen Studiengruppen verfolgt (Murphy und Watson, 2006).

Allgemein wird erst begonnen, die Funktion von ER β und seinen Splicevarianten im Mammakarzinom zu untersuchen. Seine prognostische Signifikanz und Relevanz als ein prädiktiver Faktor für das Ansprechen von endokrinen Therapien werden intensiv untersucht, aber eindeutige Daten sind noch nicht verfügbar.

Die bislang publizierten Daten legen nahe, dass ein SNP in der Promotorregion des ER β -Gens fähig ist, das Mammakarzinomrisiko zu beeinflussen.

Unsere Daten regen dazu an, weiterhin die Signifikanz von ER β -SNPs in Kombination mit anderen Genpolymorphismen, die das Mammakarzinomrisiko oder das DCIS-Risiko beeinflussen, zu untersuchen.

5. Zusammenfassung

Steroidhormone wie Östrogene beeinflussen das Wachstum und die Entwicklung, aber auch die Entstehung von benignen und malignen Veränderungen des Mammagewebes.

Vor dem Hintergrund, dass Polymorphismen in der Promotorregion des ER β -Gens einen Einfluss auf dessen Expression und somit auf den Östrogensignalweg haben, wurden in dieser Arbeit drei ER β -Promotor-SNPs untersucht.

Insgesamt konnte ein Kollektiv von 183 Mammakarzinom-Patientinnen, 151 gesunde Kontrollen, 46 Patientinnen mit DCIS, 49 Patientinnen mit Fibroadenomen und 54 Mastopathie-Patientinnen in die Studie aufgenommen werden.

Für die Gruppe der Mammakarzinome wurden klinisch-pathologische Daten wie Tumorstatus, Nodalstatus, Differenzierungsgrad, Steroidhormonrezeptorstatus, HER-2-Status und das Diagnosealter der Patientinnen erfasst.

Von allen Teilnehmern standen Blutproben zur Verfügung, aus denen zunächst DNA isoliert wurde. Es folgte eine Genotypisierung mit Hilfe der Tetra-Primer ARMS-PCR Methode anhand der Promotor-SNPs rs2987983, rs3020450 und rs3020449 im ER β -Gen.

Anschließend erfolgte eine Genotyp-Phänotyp-Assoziation der Gruppen untereinander und der Mammakarzinome mit den klinisch-pathologischen Daten.

Die Assoziation der Mammakarzinome mit den Allelen der ER β -SNPs oder deren Haplotypen und dem klinischen Phänotyp hinsichtlich des Tumorstatus, des Lymphknotenbefalls, des Steroidhormonrezeptorstatus oder des Tumorgradings ergaben keine statistisch signifikanten Ergebnisse. Die Assoziation mit dem HER-2-Status konnte nur eine Tendenz anhand eines SNP zeigen.

Bei der Assoziation mit dem Diagnosealter der Patientinnen konnte für einen SNP ein signifikanter Unterschied in der Allelpositivität gefunden werden, für einen weiteren SNP eine Tendenz.

In den Gruppenvergleichen konnte im Vergleich der Mammakarzinome mit den gesunden Kontrollen eine fragliche Assoziation mit der Allelpositivität eines SNPs gezeigt werden.

Einen weiteren Trend ergab der Vergleich von DCIS mit der Kontrollgruppe für einen SNP. Dieses Ergebnis konnte durch einen Vergleich von Karzinomen mit DCIS gestützt werden.

Um die Aktualität dieses Studienthemas zu verdeutlichen, wurden alle Ergebnisse mit der Literatur aufgearbeitet und verglichen. Dabei ergaben sich hinsichtlich der Assoziationen der Genotypen der Mammakarzinome mit den klinisch-pathologischen Daten Parallelen. Anhand

der Gruppenvergleiche, insbesondere der Mammakarzinome mit der Kontrollgruppe, stimmten die Ergebnisse teilweise nicht mit der Literatur überein.

Gerade aber die Ergebnisse des DCIS-Kollektivs ermutigen dazu, diese Untersuchung im Rahmen einer erweiterten Studie zu wiederholen, um Ergebnisse, die bislang nur als Trend beschrieben werden konnten, zu untermauern.

6. Anhang

6.1. Referenzen

Ali S, Coombes RC (2002). Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance. *Nat Rev Cancer* 2:101-112.

Annecke K, Schmitt M, Euler U, Zerm M, Paepke D, Paepke S, von MG, Thomssen C, Harbeck N (2008). uPA and PAI-1 in breast cancer: review of their clinical utility and current validation in the prospective NNBC-3 trial. *Adv Clin Chem* 45:31-45.

Bardou VJ, Arpino G, Elledge RM, Osborne CK, Clark GM (2003). Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. *J Clin Oncol* 21:1973-1979.

Beleza-Meireles A, Kockum I, Lundberg F, Soderhall C, Nordenskjold A (2007). Risk factors for hypospadias in the estrogen receptor 2 gene. *J Clin Endocrinol Metab* 92:3712-3718.

Burstein HJ, Polyak K, Wong JS, Lester SC, Kaelin CM (2004). Ductal carcinoma in situ of the breast. *N Engl J Med* 350:1430-1441.

Capurso C, Solfrizzi V, D'Introno A, Colacicco AM, Capurso SA, Capurso A, Panza F (2004). Interleukin 6-174 G/C promoter gene polymorphism and sporadic Alzheimer's disease: geographic allele and genotype variations in Europe. *Exp Gerontol* 39:1567-1573.

Chan KY, Liu W, Long JR, Yip SP, Chan SY, Shu XO, Chua DT, Cheung AN, Ching JC, Cai H, Au GK, Chan M, Foo W, Ngan HY, Gao YT, Ngan ES, Garcia-Barcelo MM, Zheng W, Khoo US (2009). Functional polymorphisms in the BRCA1 promoter influence transcription and are associated with decreased risk for breast cancer in Chinese women. *J Med Genet* 46:32-39.

Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, Hennekens CH, Rosner B, Speizer FE (1990). Prospective study of estrogen replacement therapy and risk of breast cancer in postmenopausal women. *JAMA* 264:2648-2653.

Cox DG, Bretsky P, Kraft P, Pharoah P, Albanes D, Altshuler D, Amiano P, Berglund G, Boeing H, Buring J, Burt N, Calle EE, Canzian F, Chanock S, Clavel-Chapelon F, Colditz GA, Feigelson HS, Haiman CA, Hankinson SE, Hirschhorn J, Henderson BE, Hoover R, Hunter DJ, Kaaks R, Kolonel L, LeMarchand L, Lund E, Palli D, Peeters PH, Pike MC, Riboli E, Stram DO, Thun M, Tjonneland A, Travis RC, Trichopoulos D, Yeager M (2008). Haplotypes of the estrogen receptor beta gene and breast cancer risk. *Int J Cancer* 122:387-392.

Cribb AE, Knight MJ, Dryer D, Guernsey J, Hender K, Tesch M, Saleh TM (2006). Role of polymorphic human cytochrome P450 enzymes in estrone oxidation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15:551-558.

Dahlman-Wright K, Cavailles V, Fuqua SA, Jordan VC, Katzenellenbogen JA, Korach KS, Maggi A, Muramatsu M, Parker MG, Gustafsson JA (2006). International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacol Rev* 58:773-781.

Dunnwald LK, Rossing MA, Li CI (2007). Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 9:R6.

Eastwood H, Brown KM, Markovic D, Pieri LF (2002). Variation in the ESR1 and ESR2 genes and genetic susceptibility to anorexia nervosa. *Mol Psychiatry* 7:86-89.

Elston CW, Ellis IO (2002). Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. C. W. Elston & I. O. Ellis. *Histopathology* 1991; 19; 403-410. *Histopathology* 41:151.

Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjöld M, Gustafsson JA (1997). Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* 82:4258-4265.

Fischer C, Juhasz-Boess I, Latruch C, Ortmann O, Treck O (2009). Estrogen receptor beta gene polymorphisms and susceptibility to uterine fibroids. *Gynecol Endocrinol* 11-6.

Forsti A, Zhao C, Israelsson E, hlman-Wright K, Gustafsson JA, Hemminki K (2003). Polymorphisms in the estrogen receptor beta gene and risk of breast cancer: no association. *Breast Cancer Res Treat* 79:409-413.

Fuqua SA, Schiff R, Parra I, Friedrichs WE, Su JL, McKee DD, Slentz-Kesler K, Moore LB, Willson TM, Moore JT (1999). Expression of wild-type estrogen receptor beta and variant isoforms in human breast cancer. *Cancer Res* 59:5425-5428.

Fuqua SA, Schiff R, Parra I, Moore JT, Mohsin SK, Osborne CK, Clark GM, Allred DC (2003). Estrogen receptor beta protein in human breast cancer: correlation with clinical tumor parameters. *Cancer Res* 63:2434-2439.

Gao J, Shan G, Sun B, Thompson PJ, Gao X (2006). Association between polymorphism of tumour necrosis factor alpha-308 gene promoter and asthma: a meta-analysis. *Thorax* 61:466-471.

Gapstur SM, Morrow M, Sellers TA (1999). Hormone replacement therapy and risk of breast cancer with a favorable histology: results of the Iowa Women's Health Study. *JAMA* 281:2091-2097.

Gold B, Kalush F, Bergeron J, Scott K, Mitra N, Wilson K, Ellis N, Huang H, Chen M, Lippert R, Halldorsson BV, Woodworth B, White T, Clark AG, Parl FF, Broder S, Dean M, Offit K (2004). Estrogen receptor genotypes and haplotypes associated with breast cancer risk. *Cancer Res* 64:8891-8900.

Goldberg JI, Borgen PI (2006). Breast cancer susceptibility testing: past, present and future. *Expert Rev Anticancer Ther* 6:1205-1214.

Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ (2005). Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. *Ann Oncol* 16:1569-1583.

Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ (2009). Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann Oncol* 20:1319-1329.

Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ (2007). Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007. *Ann Oncol* 18:1133-1144.

Gown AM (2008). Current issues in ER and HER2 testing by IHC in breast cancer. *Mod Pathol* 21 Suppl 2:S8-S15.

Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, Chambon P (1986). Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 320:134-139.

Greenberg R, Skornick Y, Kaplan O (1998). Management of breast fibroadenomas. *J Gen Intern Med* 13:640-645.

Greene GL, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y, Shine J (1986). Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science* 231:1150-1154.

Haag P., Hanhart N., Müller M. (2006) *Gynäkologie und Urologie für Studium und Praxis*.

Hanstein B, Liu H, Yancisin MC, Brown M (1999). Functional analysis of a novel estrogen receptor-beta isoform. *Mol Endocrinol* 13:129-137.

- Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC (1999). Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 17:1474-1481.
- Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Strom A, Treuter E, Warner M, Gustafsson JA (2007). Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev* 87:905-931.
- Henderson BE, Ross R, Bernstein L (1988). Estrogens as a cause of human cancer: the Richard and Hinda Rosenthal Foundation award lecture. *Cancer Res* 48:246-253.
- Herynk MH, Fuqua SA (2004). Estrogen receptor mutations in human disease. *Endocr Rev* 25:869-898.
- Houston SJ, Plunkett TA, Barnes DM, Smith P, Rubens RD, Miles DW (1999). Overexpression of c-erbB2 is an independent marker of resistance to endocrine therapy in advanced breast cancer. *Br J Cancer* 79:1220-1226.
- Hui L, DelMonte T, Ranade K (2008). Genotyping using the TaqMan assay. *Curr Protoc Hum Genet* Chapter 2:Unit.
- Hunter DJ, Kraft P, Jacobs KB, Cox DG, Yeager M, Hankinson SE, Wacholder S, Wang Z, Welch R, Hutchinson A, Wang J, Yu K, Chatterjee N, Orr N, Willett WC, Colditz GA, Ziegler RG, Berg CD, Buys SS, McCarty CA, Feigelson HS, Calle EE, Thun MJ, Hayes RB, Tucker M, Gerhard DS, Fraumeni JF, Jr., Hoover RN, Thomas G, Chanock SJ (2007). A genome-wide association study identifies alleles in FGFR2 associated with risk of sporadic postmenopausal breast cancer. *Nat Genet* 39:870-874.
- Key TJ (1999). Serum oestradiol and breast cancer risk. *Endocr Relat Cancer* 6:175-180.
- Kuijper A, Mommers EC, van der WE, van Diest PJ (2001). Histopathology of fibroadenoma of the breast. *Am J Clin Pathol* 115:736-742.
- Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:5925-5930.
- Lagios MD (1995). Heterogeneity of duct carcinoma in situ (DCIS): relationship of grade and subtype analysis to local recurrence and risk of invasive transformation. *Cancer Lett* 90:97-102.
- Lambert JC, Harris JM, Mann D, Lemmon H, Coates J, Cumming A, St-Clair D, Lendon C (2001). Are the estrogen receptors involved in Alzheimer's disease? *Neurosci Lett* 306:193-197.
- Lazennec G, Bresson D, Lucas A, Chauveau C, Vignon F (2001). ER beta inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells. *Endocrinology* 142:4120-4130.
- Lebeau A (2006). [Prognostic factors in ductal carcinoma in situ]. *Pathologie* 27:326-336.
- Li LC, Yeh CC, Nojima D, Dahiya R (2000). Cloning and characterization of human estrogen receptor beta promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 275:682-689.
- Livak KJ (1999). Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. *Genet Anal* 14:143-149.
- Lu B, Leygue E, Dotzlaw H, Murphy LJ, Murphy LC, Watson PH (1998). Estrogen receptor-beta mRNA variants in human and murine tissues. *Mol Cell Endocrinol* 138:199-203.
- Lurie G, Wilkens LR, Thompson PJ, McDuffie KE, Carney ME, Terada KY, Goodman MT (2009). Genetic polymorphisms in the estrogen receptor beta (ESR2) gene and the risk of epithelial ovarian carcinoma. *Cancer Causes Control* 20:47-55.
- Maguire P, Margolin S, Skoglund J, Sun XF, Gustafsson JA, Borresen-Dale AL, Lindblom A (2005). Estrogen receptor beta (ESR2) polymorphisms in familial and sporadic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 94:145-152.

- Matthews J, Gustafsson JA (2003). Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol Interv* 3:281-292.
- Menasce LP, White GR, Harrison CJ, Boyle JM (1993). Localization of the estrogen receptor locus (ESR) to chromosome 6q25.1 by FISH and a simple post-FISH banding technique. *Genomics* 17:263-265.
- Mitter D, Ortmann O, Treck O (2005). [Estrogen receptor Beta isoforms -- functions and clinical relevance in breast cancer]. *Zentralbl Gynakol* 127:228-234.
- Moore JT, McKee DD, Slentz-Kesler K, Moore LB, Jones SA, Horne EL, Su JL, Kliewer SA, Lehmann JM, Willson TM (1998). Cloning and characterization of human estrogen receptor beta isoforms. *Biochem Biophys Res Commun* 247:75-78.
- Mosselman S, Polman J, Dijkema R (1996). ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 392:49-53.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1992). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology* 24:17-27.
- Murphy LC, Watson PH (2006). Is oestrogen receptor-beta a predictor of endocrine therapy responsiveness in human breast cancer? *Endocr Relat Cancer* 13:327-334.
- Nelson MR, Marnellos G, Kammerer S, Hoyal CR, Shi MM, Cantor CR, Braun A (2004). Large-scale validation of single nucleotide polymorphisms in gene regions. *Genome Res* 14:1664-1668.
- Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JA (2001). Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev* 81:1535-1565.
- Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, Orimo A, Hosoi T, Ouchi Y, Muramatsu M (1998). Molecular cloning and characterization of human estrogen receptor betacx: a potential inhibitor of estrogen action in human. *Nucleic Acids Res* 26:3505-3512.
- Palmieri C, Cheng GJ, Saji S, Zelada-Hedman M, Warri A, Weihua Z, Van NS, Wahlstrom T, Coombes RC, Warner M, Gustafsson JA (2002). Estrogen receptor beta in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 9:1-13.
- Park BW, Kim KS, Heo MK, Ko SS, Hong SW, Yang WI, Kim JH, Kim GE, Lee KS (2003). Expression of estrogen receptor-beta in normal mammary and tumor tissues: is it protective in breast carcinogenesis? *Breast Cancer Res Treat* 80:79-85.
- Paruthiyil S, Parmar H, Kerekatte V, Cunha GR, Firestone GL, Leitman DC (2004). Estrogen receptor beta inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G2 cell cycle arrest. *Cancer Res* 64:423-428.
- Payne SJ, Bowen RL, Jones JL, Wells CA (2008). Predictive markers in breast cancer--the present. *Histopathology* 52:82-90.
- Peng B, Lu B, Leygue E, Murphy LC (2003). Putative functional characteristics of human estrogen receptor-beta isoforms. *J Mol Endocrinol* 30:13-29.
- Prechtel K (1991). [Mastopathy. Histological forms and long-term observations]. *Zentralbl Pathol* 137:210-219.
- R.Kreienberg IKUAHHBMWBDBUBAdBWBJDJEBEMGUHDHCJJKK (2008). Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. Informationszentrum für Standards in der Onkologie (ISTO) Deutsche Krebsgesellschaft e. V.
- Rastelli F, Crispino S (2008). Factors predictive of response to hormone therapy in breast cancer. *Tumori* 94:370-383.
- Remmele W, Stegner HE (1987). [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe* 8:138-140.

- Roger P, Sahla ME, Makela S, Gustafsson JA, Baldet P, Rochefort H (2001). Decreased expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors. *Cancer Res* 61:2537-2541.
- Rosenkranz K, Hinney A, Ziegler A, Hermann H, Fichter M, Mayer H, Siegfried W, Young JK, Remschmidt H, Hebebrand J (1998). Systematic mutation screening of the estrogen receptor beta gene in probands of different weight extremes: identification of several genetic variants. *J Clin Endocrinol Metab* 83:4524-4527.
- Silverstein MJ (2003). The University of Southern California/Van Nuys prognostic index for ductal carcinoma in situ of the breast. *Am J Surg* 186:337-343.
- Singletary SE, Greene FL (2003). Revision of breast cancer staging: the 6th edition of the TNM Classification. *Semin Surg Oncol* 21:53-59.
- 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. *J Pathol* 201:213-220.
- Speirs V, Carder PJ, Lane S, Dodwell D, Lansdown MR, Hanby AM (2004). Oestrogen receptor beta: what it means for patients with breast cancer. *Lancet Oncol* 5:174-181.
- Speirs V, Skliris GP, Burdall SE, Carder PJ (2002). Distinct expression patterns of ER alpha and ER beta in normal human mammary gland. *J Clin Pathol* 55:371-374.
- Stauber Manfred, Weyerstahl Thomas (2005) *Gynäkologie und Geburtshilfe*. Stuttgart: Thieme Verlag.
- Strom A, Hartman J, Foster JS, Kietz S, Wimalasena J, Gustafsson JA (2004). Estrogen receptor beta inhibits 17beta-estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:1566-1571.
- Sundarrajan C, Liao WX, Roy AC, Ng SC (2001). Association between estrogen receptor-beta gene polymorphisms and ovulatory dysfunctions in patients with menstrual disorders. *J Clin Endocrinol Metab* 86:135-139.
- Thellenberg-Karlsson C, Lindstrom S, Malmer B, Wiklund F, ugustsson-Balter K, Adami HO, Stattin P, Nilsson M, hlman-Wright K, Gustafsson JA, Gronberg H (2006). Estrogen receptor beta polymorphism is associated with prostate cancer risk. *Clin Cancer Res* 12:1936-1941.
- Treeck O, Elemenler E, Kriener C, Horn F, Springwald A, Hartmann A, Ortmann O (2009). Polymorphisms in the promoter region of ESR2 gene and breast cancer susceptibility. *J Steroid Biochem Mol Biol* 114:207-211.
- WHO World Health Organization Classification of Tumours. (2003). *Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs*. Tavasoli FA, Devilee P (eds). IARC Press, Lyon. p. 9-112.
- Wilkinson HA, Dahllund J, Liu H, Yudkovitz J, Cai SJ, Nilsson S, Schaeffer JM, Mitra SW (2002). Identification and characterization of a functionally distinct form of human estrogen receptor beta. *Endocrinology* 143:1558-1561.
- Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins AR, Day IN (2001). An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res* 29:E88.
- Zhai XD, Ye Y, Yang Y, Wang Z, Mo YN (2009). No association between estrogen receptor Beta polymorphisms and uterine leiomyoma. *DNA Cell Biol* 28:633-636.
- Zhao C, hlman-Wright K, Gustafsson JA (2008). Estrogen receptor beta: an overview and update. *Nucl Recept Signal* 6:e003.:e003.
- Zhao C, Lam EW, Sunters A, Enmark E, De Bella MT, Coombes RC, Gustafsson JA, hlman-Wright K (2003). Expression of estrogen receptor beta isoforms in normal breast epithelial cells and breast cancer: regulation by methylation. *Oncogene* 22:7600-7606.

Zheng SL, Zheng W, Chang BL, Shu XO, Cai Q, Yu H, Dai Q, Xu J, Gao YT (2003). Joint effect of estrogen receptor beta sequence variants and endogenous estrogen exposure on breast cancer risk in Chinese women. *Cancer Res* 63:7624-7629.

6.2. Tabellen

Tabelle 2: pTNM-Klassifikation des Mammakarzinoms 6. Auflage

UICC	Tumorausdehnung
pTX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
pT0	Kein Tumor nachweisbar
pTis	Carcinoma in situ, nicht invasiv
pT1	Der Tumor ist nicht größer als 2 cm
pT1mic	Mikroinvasion 0,1 cm oder kleiner
pT1a	> 0,1 bis 0,5 cm
pT1b	> 0,5 bis 1 cm
pT1c	> 1 bis 2 cm
pT2	Tumor mit einem Durchmesser von > 2 bis 5 cm
pT3	Der Tumor ist größer als 5 cm
pT4	Tumor jeder Größe mit Ausdehnung auf die Brustwand oder Haut
pT4a	mit Ausdehnung auf die Brustwand
pT4b	mit Ödem, Ulzeration der Brusthaut oder Satellitenmetastasen der Haut der gleichen Brust
pT4c	Kriterien 4a und 4b gemeinsam
pT4d	entzündliches (inflammatorisches) Karzinom
N (Nodes = Befallene Lymphknoten)	
pNX	regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
pN0	keine regionären Lymphknotenmetastasen
pN1	Metastase(n) in beweglichen ipsilateralen axillären Lymphknoten (nachgewiesen durch Wächterlymphknotenuntersuchung)
pN2	Metastase(n) in ipsilateralen axillären Lymphknoten, untereinander oder an andere Strukturen fixiert oder in klinisch erkennbaren ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna in <i>Abwesenheit</i> klinisch erkennbarer axillärer Lymphknotenmetastasen
pN2a	Metastase(n) in ipsilateralen axillären Lymphknoten, untereinander oder an andere Strukturen fixiert
pN2b	Metastase(n) in klinisch erkennbaren ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna in <i>Abwesenheit</i> klinisch erkennbarer axillärer Lymphknotenmetastasen (nachgewiesen durch Wächterlymphknotenuntersuchung)
pN3	Metastase(n) in ipsilateralen infraklavikulären Lymphknoten mit <i>oder</i> ohne Beteiligung der axillären Lymphknoten oder in klinisch erkennbaren ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna in Anwesenheit klinisch erkennbarer axillärer Lymphknotenmetastasen <i>oder</i> Metastasen in ipsilateralen supraklavikulären Lymphknoten mit oder ohne Beteiligung der axillären Lymphknoten oder der Lymphknoten entlang der A. mammaria interna
PN3a	Metastase(n) in ipsilateralen infraklavikulären Lymphknoten
pN3b	Metastase(n) in ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna in Anwesenheit axillärer Lymphknotenmetastasen (nachgewiesen durch Schildwächterlymphknotenuntersuchung)
PN3c	Metastase(n) in ipsilateralen supraklavikulären Lymphknoten
M (Fernmetastasen)	
pM X	Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
M0	keine Metastasierung in andere Organe
M1	Fern-Metastasen vorhanden, meist in Knochen, Lunge, Leber oder Gehirn

Tabelle 3: Stadiengruppierung nach FIGO- und UICC-Kriterien

Stadium	Tumorgröße nach UICC	Lymphknoten	Metastasen
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1mic, T1	N0	M0
Stadium IIA	T0, T1mic, T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Stadium IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Stadium IIIA	T0, T1mic, T1, T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
Stadium IIIB	T4	N0, N1, N2	M0
Stadium IIIC	Jedes T	N3	M0
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1

Tabelle 24: Vergleich Gesunde und Fibroadenome. T- Thyrosin, C- Cytosin, A- Adenin, G- Guanin.

SNP	Allelfrequenz		Allelpositivität		Genotypfrequenz		
	T	C	TT+CT	CC+CT	TT	CC	CT
rs2987983							
Gesund	192 (64,4%)	106 (35,6%)	136 (91,3%)	93 (62,4%)	56 (37,6%)	13 (8,7%)	80 (53,7%)
Fibroadenom	67 (68,4%)	31 (31,6%)	44 (89,8%)	26 (53,1%)	23 (46,9%)	5 (10,2%)	21 (42,9%)
p		0,477	0,754	0,240			0,446
rs3020449							
Gesund	163 (55,4%)	131 (44,6%)	118 (80,3%)	102 (69,4%)	45 (30,6%)	29 (19,7%)	73 (49,7%)
Fibroadenom	54 (58,7%)	38 (41,3%)	40 (90,9%)	32 (69,6%)	14 (30,4%)	6 (13,0%)	26 (56,5%)
p		0,583	0,304	0,981			0,574
rs3020450							
Gesund	106 (35,3%)	194 (64,7%)	89 (59,3%)	133 (88,7%)	17 (11,3%)	61 (40,7%)	72 (48,0%)
Fibroadenom	29 (30,2%)	67 (69,8%)	26 (54,2%)	45 (93,6%)	3 (6,3%)	22 (45,8%)	23 (47,9%)
p		0,357	0,527	0,309			0,339

Tabelle 25: Vergleich benigne Mammaveränderungen (Fibroadenom und Mastopathie) mit Karzinomen. T- Thyrosin, C- Cytosin, A- Adenin, G- Guanin.

SNP	Allelfrequenz		Allelpositivität		Genotypfrequenz		
	T	C	TT+CT	CC+CT	TT	CC	CT
rs2987983							
Benigne	145 (70,4%)	61 (29,6%)	94 (91,3%)	52 (50,5%)	51 (49,5%)	9 (8,7%)	43 (41,8%)
Karzinom	256 (69,9%)	110 (30,1%)	167 (91,3%)	94 (51,4%)	89 (48,6%)	16 (8,7%)	78 (42,6%)
p		0,911	0,998	0,886			0,911
rs3020449							
Benigne	115 (57,5%)	85 (42,5%)	84 (84,0%)	69 (69,0%)	31 (31,0%)	16 (16,0%)	53 (53,0%)
Karzinom	221 (61,4%)	139 (38,6%)	152 (84,4%)	111 (61,7%)	69 (38,3%)	28 (15,6%)	83 (46,1%)
p		0,368	0,922	0,219			0,365
rs3020450							
Benigne	65 (32,2%)	137 (67,8%)	65 (56,4%)	137 (92,1%)	8 (7,9%)	44 (43,6%)	49 (48,5%)
Karzinom	116 (31,7%)	250 (68,3%)	98 (53,6%)	165 (90,2%)	18 (9,8%)	85 (46,4%)	80 (43,7%)
p		0,905	0,640	0,592			0,903

Tabelle 26: Vergleich Gesunde und Mastopathie. T- Thyrosin, C- Cytosin, A- Adenin, G- Guanin.

SNP	Allelfrequenz		Allelpositivität		Genotypfrequenz		
	T	C	TT+CT	CC+CT	TT	CC	CT
rs2987983							
Gesund	192 (64,4%)	106 (35,6%)	136 (91,3%)	93 (62,4%)	56 (37,6%)	13 (8,7%)	80 (53,7%)
Mastopathie	78 (72,2%)	30 (27,8%)	50 (92,6%)	26 (48,1%)	28 (51,9%)	4 (7,4%)	22 (40,7%)
p		0,142	0,764	0,068			0,115
rs3020449	A	G	AA+AG	GG+AG	AA	GG	AG
Gesund	163 (55,4%)	131 (44,6%)	118 (80,3%)	102 (69,4%)	45 (30,6%)	29 (19,7%)	73 (49,7%)
Mastopathie	61 (56,5%)	47 (43,5%)	44 (81,5%)	37 (68,5%)	17 (31,5%)	10 (18,5%)	27 (50,0%)
p		0,852	0,847	0,905			0,851
rs3020450	A	G	AA+AG	GG+AG	AA	GG	AG
Gesund	106 (35,3%)	194 (64,7%)	89 (59,3%)	133 (88,7%)	17 (11,3%)	61 (40,7%)	72 (48,0%)
Mastopathie	36 (34,0%)	70 (66,0%)	31 (58,5%)	48 (90,6%)	5 (9,4%)	22 (41,5%)	26 (49,1%)
p		0,799	0,914	0,702			0,792

Tabelle 27: Vergleich Fibroadenome und Karzinome. T- Thyrosin, C- Cytosin, A- Adenin, G- Guanin.

SNP	Allelfrequenz		Allelpositivität		Genotypfrequenz		
	T	C	TT+CT	CC+CT	TT	CC	CT
rs2987983							
Fibroadenom	67 (68,4%)	31 (31,6%)	44 (89,8%)	26 (53,1%)	23 (46,9%)	5 (10,2%)	21 (42,9%)
Karzinom	256 (69,9%)	110 (30,1%)	167 (91,3%)	94 (51,4%)	89 (48,6%)	16 (8,7%)	78 (42,6%)
p		0,763	0,751	0,832			0,761
rs3020449	A	G	AA+AG	GG+AG	AA	GG	AG
Fibroadenom	54 (58,7%)	38 (41,3%)	40 (90,9%)	32 (69,6%)	14 (30,4%)	6 (13,0%)	26 (56,5%)
Karzinom	221 (61,4%)	139 (38,6%)	152 (84,4%)	111 (61,7%)	69 (38,3%)	28 (15,6%)	83 (46,1%)
p		0,634	0,670	0,321			0,634
rs3020450	A	G	AA+AG	GG+AG	AA	GG	AG
Fibroadenom	29 (30,2%)	67 (69,8%)	26 (54,2%)	45 (93,6%)	3 (6,3%)	22 (45,8%)	23 (47,9%)
Karzinom	116 (31,7%)	250 (68,3%)	98 (53,6%)	165 (90,2%)	18 (9,8%)	85 (46,4%)	80 (43,7%)
p		0,780	0,939	0,441			0,776

Tabelle 28: Vergleich Mastopathien und Karzinome. T- Thyrosin, C- Cytosin, A- Adenin, G- Guanin.

SNP	Allelfrequenz		Allelpositivität		Genotypfrequenz		
	T	C	TT+CT	CC+CT	TT	CC	CT
rs2987983							
Mastopathie	78 (72,2%)	30 (27,8%)	50 (92,6%)	26 (48,1%)	28 (51,9%)	4 (7,4%)	22 (40,7%)
Karzinom	256 (69,9%)	110 (30,1%)	167 (91,3%)	94 (51,4%)	89 (48,6%)	16 (8,7%)	78 (42,6%)
p		0,649	0,756	0,677			0,646
rs3020449	A	G	AA+AG	GG+AG	AA	GG	AG
Mastopathie	61 (56,5%)	47 (43,5%)	44 (81,5%)	37 (68,5%)	17 (31,5%)	10 (18,5%)	27 (50,0%)
Karzinom	221 (61,4%)	139 (38,6%)	152 (84,4%)	111 (61,7%)	69 (38,3%)	28 (15,6%)	83 (46,1%)
p		0,361	0,604	0,359			0,365
rs3020450	A	G	AA+AG	GG+AG	AA	GG	AG
Mastopathie	36 (34,0%)	70 (66,0%)	31 (58,5%)	48 (90,6%)	5 (9,4%)	22 (41,5%)	26 (49,1%)
Karzinom	116 (31,7%)	250 (68,3%)	98 (53,6%)	165 (90,2%)	18 (9,8%)	85 (46,4%)	80 (43,7%)
p		0,660	0,524	0,930			0,655

Tabelle 29: Vergleich DCIS und Fibroadenome. T- Thyrosin, C- Cytosin, A- Adenin, G- Guanin.

SNP	Allelfrequenz		Allelpositivität		Genotypfrequenz		
	T	C	TT+CT	CC+CT	TT	CC	CT
rs2987983							
DCIS	55 (67,1%)	27 (32,9%)	36 (87,8%)	22 (53,6%)	19 (46,3%)	5 (12,2%)	17 (41,5%)
Fibroadenom	67 (68,4%)	31 (31,6%)	44 (89,8%)	26 (53,1%)	23 (46,9%)	5 (10,2%)	21 (42,9%)
p		0,853	0,764	0,954			0,855
rs3020449	A	G	AA+AG	GG+AG	AA	GG	AG
DCIS	44 (48,9%)	46 (51,1%)	26 (57,8%)	37 (82,2%)	8 (17,8%)	9 (20,0%)	28 (62,2%)
Fibroadenom	54 (58,7%)	38 (41,3%)	40 (90,9%)	32 (69,6%)	14 (30,4%)	6 (13,0%)	26 (56,5%)
p		0,185	0,371	0,158			0,139
rs3020450	A	G	AA+AG	GG+AG	AA	GG	AG
DCIS	36 (39,1%)	56 (60,9%)	30 (65,2%)	40 (87,0%)	6 (13,0%)	16 (34,8%)	24 (52,2%)
Fibroadenom	29 (30,2%)	67 (69,8%)	26 (54,2%)	45 (93,6%)	3 (6,3%)	22 (45,8%)	23 (47,9%)
p		0,199	0,275	0,263			0,174

Tabelle 30: Vergleich DCIS und Mastopathien. T- Thyrosin, C- Cytosin, A- Adenin, G- Guanin.

SNP	Allelfrequenz		Allelpositivität		Genotypfrequenz		
	T	C	TT+CT	CC+CT	TT	CC	CT
rs2987983							
DCIS	55 (67,1%)	27 (32,9%)	36 (87,8%)	22 (53,6%)	19 (46,3%)	5 (12,2%)	17 (41,5%)
Mastopathie	78 (72,2%)	30 (27,8%)	50 (92,6%)	26 (48,1%)	28 (51,9%)	4 (7,4%)	22 (40,7%)
p		0,443	0,429	0,594			0,448
rs3020449	A	G	AA+AG	GG+AG	AA	GG	AG
DCIS	44 (48,9%)	46 (51,1%)	26 (57,8%)	37 (82,2%)	8 (17,8%)	9 (20,0%)	28 (62,2%)
Mastopathie	61 (56,5%)	47 (43,5%)	44 (81,5%)	37 (68,5%)	17 (31,5%)	10 (18,5%)	27 (50,0%)
p		0,286	0,852	0,118			0,257
rs3020450	A	G	AA+AG	GG+AG	AA	GG	AG
DCIS	36 (39,1%)	56 (60,9%)	30 (65,2%)	40 (87,0%)	6 (13,0%)	16 (34,8%)	24 (52,2%)
Mastopathie	36 (34,0%)	70 (66,0%)	31 (58,5%)	48 (90,6%)	5 (9,4%)	22 (41,5%)	26 (49,1%)
p		0,451	0,492	0,568			0,428

Tabelle 31: Vergleich Fibroadenome und Mastopathien. T- Thyrosin, C- Cytosin, A- Adenin, G- Guanin.

SNP	Allelfrequenz		Allelpositivität		Genotypfrequenz		
	T	C	TT+CT	CC+CT	TT	CC	CT
rs2987983							
Fibroadenom	67 (68,4%)	31 (31,6%)	44 (89,8%)	26 (53,1%)	23 (46,9%)	5 (10,2%)	21 (42,9%)
Mastopathie	78 (72,2%)	30 (27,8%)	50 (92,6%)	26 (48,1%)	28 (51,9%)	4 (7,4%)	22 (40,7%)
p		0,545	0,615	0,618			0,544
rs3020449	A	G	AA+AG	GG+AG	AA	GG	AG
Fibroadenom	54 (58,7%)	38 (41,3%)	40 (90,9%)	32 (69,6%)	14 (30,4%)	6 (13,0%)	26 (56,5%)
Mastopathie	61 (56,5%)	47 (43,5%)	44 (81,5%)	37 (68,5%)	17 (31,5%)	10 (18,5%)	27 (50,0%)
p		0,752	0,456	0,910			0,741
rs3020450	A	G	AA+AG	GG+AG	AA	GG	AG
Fibroadenom	29 (30,2%)	67 (69,8%)	26 (54,2%)	45 (93,6%)	3 (6,3%)	22 (45,8%)	23 (47,9%)
Mastopathie	36 (34,0%)	70 (66,0%)	31 (58,5%)	48 (90,6%)	5 (9,4%)	22 (41,5%)	26 (49,1%)
p		0,568	0,661	0,554			0,545

6.3. Lebenslauf

Christina Anna Margarete Kriener

Geburtsdatum: 09.11.1981
Geburtsort: Garmisch-Partenkirchen
Anschrift: Schillerstraße 48
39108 Magdeburg
Telefon: 0391/ 2420591
e-mail: c_kriener@hotmail.com

Berufserfahrung

Seit Januar 2010 Assistenzärztin in der Klinik St. Marienstift, Magdeburg,
Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

Universitäre Ausbildung

11/ 2002 Aufnahme des Medizinstudiums an der Otto-von-Guericke Universität
zu Magdeburg
04/ 2005 Physikum, Wechsel an die Universität zu Regensburg, Aufnahme des
klinischen Abschnittes des Medizinstudiums
06/ 2009 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
08/ 2009 Approbation als Ärztin

Praktisches Jahr

02-04/ 08 Department of Internal Medicine, University of Stellenbosch,
Cape Town, South Africa
05/ 08 Krankenhaus der Barmherzigen Brüder,
Klinik für Hämatologie und Onkologie, Regensburg
06-09/ 08 Caritas Krankenhaus St. Josef, Universität Regensburg,
Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, Regensburg
10-12/ 08 Stadtspital Waid, Universität Zürich, Klinik für Chirurgie, Zürich,
Schweiz

Famulaturen

08/ 2005 Klinik für Kardiologie, Altstadtkrankenhaus, Magdeburg
03/ 2006 Klinik für Chirurgie, Klinikum Garmisch-Partenkirchen
04/ 2006 Allgemeinmedizin, Gesundheitsdienst BMW AG, Dingolfing
03-04/ 2007 Department of Internal Medicine, Baylor University Medical Center,
Dallas, Texas, USA

6.4. Publikation

Treeck O, Elemenler E, Kriener C, Horn F, Springwald A, Hartmann A, Ortmann O.
Polymorphisms in the promotor region of ESR2 gene and breast cancer susceptibility. J
Steroid Biochem Mol Biol. 2009 Apr;114(3-5):207-11. Epub 2009 Mar 3.

6.5. Danksagung

Ich bedanke mich bei Allen, die zum erfolgreichen Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei Prof. Dr. Olaf Ortmann für die Bereitstellung des sehr interessanten Themas und die Möglichkeit, im Labor seines Institutes arbeiten zu dürfen.

Ein besonderer Dank gilt PD Dr. Oliver Treeck für die hervorragende Betreuung während der gesamten Arbeit.

Vielen Dank auch an Dr. Felicitas Horn, die mir besonders zu Beginn der Arbeit in klinischen Fragen zur Seite stand.

Ganz großer Dank geht an Angelika Vollmer, Helena Houlihan und Gerhard Piendl für das gute Arbeitsklima im Labor und ihre Hilfe bei sämtlichen Fragen rund um die Laborarbeit.

Schließlich möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern für die Unterstützung in jeglicher Hinsicht während dieser Arbeit und des gesamten Studiums bedanken.

Besonderen Dank auch an meinen Freund Michael für seine Motivation und Geduld während der Fertigstellung dieser Arbeit.

6.6. Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen.

Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den

Christina Anna Margarete Kriener