

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR FRAUENHEILKUNDE UND
GEBURTSHILFE
SCHWERPUNKT: FRAUENHEILKUNDE

PROF. DR. MED. OLAF ORTMANN

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

*GENOTYP-PHÄNOTYP-ASSOZIATIONSSTUDIE FÜR POLYMORPHISMEN
IM GEN DES G-PROTEIN-GEKOPPELTEN REZEPTOR 30
BEI MAMMATUMOREN*

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Maria Anna Margaretha Gieß-Baer

2012

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR FRAUENHEILKUNDE UND
GEBURTSHILFE
SCHWERPUNKT: FRAUENHEILKUNDE

PROF. DR. MED. OLAF ORTMANN

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

*GENOTYP-PHÄNOTYP-ASSOZIATIONSSTUDIE FÜR POLYMORPHISMEN
IM GEN DES G-PROTEIN-GEKOPPELTEN REZEPTOR 30
BEI MAMMATUMOREN*

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Maria Anna Margaretha Gieß-Baer

2012

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

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

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Olaf Ortmann

Tag der mündlichen Prüfung: 17. April 2013

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	S. 1
1.1	Mammakarzinom	S. 1
1.1.1	<i>Epidemiologie</i>	S. 1
1.1.2	<i>Allgemeine Risikofaktoren</i>	S. 2
1.1.3	<i>Genetische Risikofaktoren</i>	S. 3
1.1.4	<i>Einteilung des Mammakarzinoms</i>	S. 6
1.1.5	<i>Prognostische und prädiktive Faktoren</i>	S. 7
1.1.6	<i>Therapieansätze beim Mammakarzinom</i>	S. 10
1.2	Gutartige Veränderungen der Brust	S. 12
1.2.1	<i>Fibroadenom</i>	S. 12
1.2.2	<i>Mastopathie</i>	S. 13
1.3	G-Protein-gekoppelter Rezeptor 30 (GPR30)	S. 13
1.3.1	<i>Das Gen und sein Genprodukt</i>	S. 13
1.3.2	<i>Signaltransduktion und Liganden</i>	S. 14
1.3.3	<i>GPR30 und seine Bedeutung für das Mammakarzinom</i>	S. 16
1.4	Single Nucleotide Polymorphismen (SNPs)	S. 17
1.4.1	<i>SNPs beim Mammakarzinom</i>	S. 19
1.4.2	<i>Polymorphismen im GPR30 Gen</i>	S. 19
1.5	Zielsetzung der Arbeit	S. 19
2	Material und Methoden	S. 21
2.1	Studienteilnehmer	S. 21
2.2	Materialien und Geräte	S. 22
2.2.1	<i>Reagenzien und Chemikalien</i>	S. 22
2.2.2	<i>Enzyme</i>	S. 23
2.2.3	<i>Geräte und Verbrauchsmaterialien</i>	S. 24
2.2.4	<i>Software</i>	S. 25
2.3	SNP Analyse	S. 26
2.3.1	<i>DNA-Isolierung aus Blut und aus Zelllinien</i>	S. 26
2.3.2	<i>Polymerase-Kettenreaktion</i>	S. 26
2.3.3	<i>Agarosegelelektrophorese</i>	S. 29
2.4	Genexpressionsanalyse	S. 30
2.4.1	<i>Zellkultur</i>	S. 30
2.4.2	<i>Reverse Transkription</i>	S. 31
2.4.3	<i>Real-Time quantitative Polymerase-Kettenreaktion</i>	S. 31
2.5	Die untersuchten SNPs	S. 32
2.5.1	<i>SNP rs3808350</i>	S. 33
2.5.2	<i>SNP rs3808351</i>	S. 33
2.5.3	<i>SNP rs11544331</i>	S. 33
2.6	Statistische Verfahren	S. 34
2.6.1	<i>Fall-Kontroll-Assoziationsstudien</i>	S. 34
2.6.2	<i>Nullhypothese-Alternativhypothese</i>	S. 34

2.6.3	<i>Vierfeldertafel</i>	S. 35
2.6.4	<i>Chi-Quadrat Test</i>	S. 35
2.6.5	<i>Exakter Test nach Fisher</i>	S. 35
2.6.6	<i>Odds Ratio</i>	S. 35
2.6.7	<i>Hardy-Weinberg-Gleichgewicht</i>	S. 36
3	Ergebnisse	S. 37
3.1	Analyse der GPR30 Polymorphismen	S. 37
3.1.1	<i>Assoziation der SNPs mit dem Mammakarzinom</i>	S. 37
3.1.2	<i>Assoziation der SNPs mit verschiedenen Tumorcharakteristika</i>	S. 39
3.1.2.1	<i>SNP 350</i>	S. 39
3.1.2.2	<i>SNP 351</i>	S. 43
3.1.2.3	<i>SNP 331</i>	S. 48
3.1.3	<i>Haplotypenanalyse</i>	S. 54
3.1.4	<i>Genotypisierung von Mammakarzinom-Zelllinien</i>	S. 55
3.2	Genexpressionsanalyse	S. 56
4	Diskussion	S. 57
4.1	Assoziation der SNPs mit dem Mammakarzinom	S. 57
4.2	Assoziation der untersuchten SNPs mit Tumorcharakteristika des Mammakarzinoms und deren Bedeutung	S. 58
4.2.1	<i>Tumorgroße</i>	S. 58
4.2.2	<i>Grading</i>	S. 59
4.2.3	<i>Nodalstatus</i>	S. 60
4.2.4	<i>Östrogenrezeptorstatus</i>	S. 60
4.2.5	<i>Progesteronrezeptorstatus</i>	S. 61
4.3.	Ausblick	S. 63
5	Zusammenfassung	S. 65
6	Anhang	S. 67
6.1	Literaturverzeichnis	S. 67
6.2	Tabellen	S. 79

Eidesstattliche Erklärung

Danksagung

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Lokalisation von GPR30 auf dem kurzen Arm des Chromosom 7, 7p22.3 (nach www.genecards.org).....	S. 14
Abb. 2 Schematische Darstellung der Signaltransduktion durch GPR30 1 (Prossnitz et al. 2008).....	S. 15
Abb. 3 Struktur des selektiven GPR30 Liganden G1 (Bologa et al. 2006).....	S. 16
Abb. 4 Schematische Darstellung der Tetraprimer PCR (Ye et al. 2001).....	S. 27
Abb. 5 Foto einer Agarosegelelektrophorese für SNP rs3808351.....	S. 29
Abb. 6 Positionen der drei untersuchten SNPs im GPR30 Gen.....	S. 32
Abb. 7 SNP rs3808350 PR negativ versus PR positiv in der Homozygotenanalyse.....	S. 40
Abb. 8 SNP rs3808350 PR negativ versus ER & PR positiv in der Homozygotenanalyse.....	S. 40
Abb. 9 SNP rs3808350 PR negativ versus Gesunde in der Homozygotenanalyse.....	S. 40
Abb. 10 SNP rs3808350 PR negativ versus PR positive in der Heterozygotenanalyse.....	S. 41
Abb. 11 SNP rs3808350 PR negativ versus PR &ER positive in der Heterozygotenanalyse.....	S. 41
Abb. 12 SNP rs3808350 ER negativ versus PR & ER positiv in der Heterozygotenanalyse.....	S. 41
Abb. 13 SNP rs3808351 T>1 versus T1 in der Homozygotenanalyse.....	S. 44
Abb. 14 SNP rs3808351 T>1 versus T1 in der Heterozygotenanalyse.....	S. 44
Abb. 15 SNP rs3808351 T>1 versus Mastopathie in der Heterozygotenanalyse.....	S. 44
Abb. 16 SNP rs3808351 T>1 versus Nicht-Karzinom in der Heterozygotenanalyse.....	S. 45
Abb. 17 SNP rs3808351 T2 versus T1 in der Heterozygotenanalyse.....	S. 45

Abb. 18 SNP rs3808351 T>1 versus T1 in der Allelfrequenzanalyse.....	S. 45
Abb. 19 SNP rs3808351 T>1 versus Gesunde in der Allelfrequenzanalyse.....	S. 45
Abb. 20 SNP rs3808351 T>1 versus Fibroadenom in der Allelfrequenzanalyse.....	S. 46
Abb. 21 SNP rs3808351 T>1 versus Mastopathie in der Allelfrequenzanalyse.....	S. 46
Abb. 22 SNP rs3808351 T>1 versus Nicht-Karzinom in der Allelfrequenzanalyse.....	S. 46
Abb. 23 SNP rs3808351 G3 versus Gesunde in der Homozygotenanalyse.....	S. 46
Abb. 24 SNP rs3808351 G3 versus Nicht-Karzinom in der Homozygotenanalyse.....	S. 46
Abb. 25 SNP rs3808351 G3 versus Mastopathie in der Heterozygotenanalyse.....	S. 47
Abb. 26 SNP rs3808351 G3 versus G2 in der Allelfrequenzanalyse.....	S. 47
Abb. 27 SNP rs3808351 G3 versus Gesunde in der Allelfrequenzanalyse.....	S. 47
Abb. 28 SNP rs3808351 G3 versus Fibroadenom in der Allelfrequenzanalyse.....	S. 48
Abb. 29 SNP rs3808351 G3 versus Mastopathie in der Allelfrequenzanalyse.....	S. 48
Abb. 30 SNP rs3808351 G3 versus Nicht-Karzinom in der Allelfrequenzanalyse.....	S. 48
Abb. 31 SNP rs11544331 N>0 versus N0 in der Heterozygotenanalyse.....	S. 50
Abb. 32 SNP rs11544331 N>0 versus Gesunde in der Heterozygotenanalyse.....	S. 51
Abb. 33 SNP rs11544331 N>0 versus Mastopathie in der Heterozygotenanalyse.....	S. 51
Abb. 34 SNP rs11544331 N>0 versus Nicht-Karzinom in der Heterozygotenanalyse.....	S. 51
Abb. 35 SNP rs11544331 N>0 versus Gesunde in der Allelfrequenzanalyse.....	S. 51
Abb. 36 SNP rs11544331 N>0 versus Nicht-Karzinom in der Allelfrequenzanalyse.....	S. 52
Abb. 37 SNP rs11544331 G2 versus Gesunde in der Allelfrequenzanalyse.....	S. 52
Abb. 38 SNP rs11544331 G2 versus Nicht-Karzinom in der Allelfrequenzanalyse.....	S. 52
Abb. 39 SNP rs11544331 PR≤4 versus Gesunde in der Heterozygotenanalyse.....	S. 53
Abb. 40 SNP rs11544331 PR≤4 versus Mastopathie in der Heterozygotenanalyse.....	S. 53

Abb. 41	SNP rs11544331 PR \leq 4 versus Nicht-Karzinom in der Heterozygotenanalyse.....	S. 53
Abb. 42	SNP rs11544331 PR \leq 4 versus Gesunde in der Allelfrequenzanalyse.....	S. 53
Abb. 43	Vergleich der drei häufigsten Haplotypen bei Gesunden und Mammakarzinompatientinnen.....	S. 54

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Familiäre Risikofaktoren, die das Vorliegen einer erblichen Form von Brustkrebs wahrscheinlich machen (Nach Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF et al. 2012)	S. 4
Tabelle 2 Zehn Gene für erblichen Brustkrebs und ihre jeweilige Funktion.....	S. 4
Tabelle 3 WHO Klassifikation der invasiven Mammakarzinome (Nach Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF et al. 2012).....	S. 6
Tabelle 4 Überblick über die Liganden am GPR30 Rezeptor und ihre Wirkung an ER α	S. 16
Tabelle 5 Histopathologische Charakteristika und Rezeptorstatus der Brustkrebspatientinnen, die in diese Studie eingeschlossen waren (n=257)	S. 22
Tabelle 6 Standardprogramm einer PCR.....	S. 28
Tabelle 7 Untersuchte Zelllinien und deren Charakteristika.....	S. 30
Tabelle 8 Verwendete Oligonukleotid-Primer für die SNP Genotypisierung mittels Tetra Primer PCR und die Größe der PCR-Produkte in basepairs.....	S. 33
Tabelle 9 Genotyp- und Allelfrequenzen der drei untersuchten SNPs.....	S. 37
Tabelle 10 Analyse der GPR30 SNP Frequenzen bei Frauen mit Brustkrebs und gesunden Kontrollen	S. 38
Tabelle 11 SNP rs3808350 Hereditäres Mammakarzinom versus Kontrollen und Nicht-Karzinom	S. 79
Tabelle 12 SNP rs3808350 Mammakarzinom versus Mastopathie, Fibroadenom und Nicht-Karzinom	S. 80
Tabelle 13 SNP rs3808351 Hereditäres Mammakarzinom versus Gesunde und	

Nicht-Karzinom.....	S. 81
Tabelle 14 SNP rs3808351 Mammakarzinom versus Mastopathie, Fibroadenom und Nicht-Karzinom	S. 82
Tabelle 15 SNP rs11544331 Hereditäres Mammakarzinom versus Kontrollen und Nicht-Karzinom	S. 83
Tabelle 16 SNP rs11544331Mammakarzinom versus Mastopathie, Fibroadenom und Nicht-Karzinom	S. 84
Tabelle 17 Signifikante Ergebnisse für SNP rs3808350.....	S. 39
Tabelle 18 Signifikante Ergebnisse für SNP rs3808351.....	S. 42
Tabelle 19 Signifikante Ergebnisse für SNP rs11544331.....	S. 49
Tabelle 20 Haplotypenverteilung der sechs häufigsten Haplotypen in den verschiedenen Gruppen.....	S. 54
Tabelle 21 Genotypen der untersuchten Zelllinien für die drei SNPs.....	S. 55
Tabelle 22 Analyse der GPR30 SNP Frequenzen der Mammakarzinomzelllinien und der gesunden Kontrollen.....	S. 55
Tabelle 23 GPR30 Expression in den Mammakarzinomzelllinien im Vergleich zu einem Kalibrator.....	S. 56

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AC	Adenylatcyclase
AF	Allelfrequenz
AMP	Adenosinmonophosphat
AP	Allelpositivität
ApoEε4	Apolipoprotein E ε4
ATM	Ataxia teleangiectasia mutated
AWMF	Arbeitsgemeinschaft Wissenschaftlicher Medizinischer Fachgesellschaften
BRCA1	Breast Cancer 1
BRCA2	Breast Cancer 2
BRIP1	BRCA interacting protein 1
C	Cytosin
cDNA	complementary DNA
CHEK2	Checkpoint Kinase 2
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DCIS	Duktales Carcinoma in Situ
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythmidintriphosphat
dUTP	Desoxyuraciltriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy Nukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ERα/β	Östrogenrezeptor α/β
G	Grading oder Guanin (je nach Zusammenhang)
G1	GPR30 specific compound 1
G15	GPR30 specific compound 15
G36	GPR30 specific compound 36
GPR30	G-Protein-gekoppelter Rezeptor 30
HB-EGF	Heparin-bound Epidermal growth factor
Her2/neu	human epidermal growth receptor 2
HFE Gen	High iron Fe Gen (Hämochromatosegen)
ICI 182.780	ein kompetitiver Östrogenrezeptorantagonist
LK	Lymphknoten
N	Nodalstatus
NBS1	Nijmegen-Breakage-Syndrom 1 Gen
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OR	Odds Ratio
p53	Tumorsuppressor p53
PALB2	Partner and localizer of BRCA2

PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PR α/β	Progesteronrezeptor α/β
PTEN	Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10
rs	reference SNP
RAD50	Eucaryotic recombination and DNA repair protein 50
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	Rounds per minute
RT-PCR	Real-Time quantitative Polymerase Kettenreaktion
SERM	Selektiver Östrogenrezeptormodulator
SNP	Single nucleotide Polymorphism
T	Tumorgröße oder Thymin (je nach Zusammenhang)
WHO	World Health Organisation

1. Einleitung

1.1 Das Mammakarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das Mammakarzinom ist sowohl in Deutschland als auch weltweit die häufigste maligne Neubildung bei Frauen. Die Dachdokumentation Krebs des Robert Koch Instituts geht von einer jährlichen Inzidenz von 47.500 Neuerkrankungen in Deutschland aus (Robert Koch Institut 2005). Mit 27,8% macht der Brustkrebs mehr als ein Viertel aller Krebserkrankungen bei Frauen aus (Robert Koch Institut 2008). Die Inzidenz ist seit Beginn der Erfassung 1980 stetig gestiegen, von 69,4/100.000 Frauen im Jahr 1980 auf 104,2/100.000 Frauen im Jahr 2004 (Robert Koch Institut 2008). Im europäischen Vergleich ist die Brustkrebsinzidenz in Deutschland im Mittelfeld. Die höchste Inzidenz findet sich in Belgien, die niedrigste in Polen (Robert Koch Institut 2008).

Die Brustkrebsmortalität war laut Statistischem Bundesamt im Jahr 2009 mit 17.066 Frauen in Deutschland an erster Stelle der Krebstodesursachen und an vierter Stelle aller Todesursachen bei Frauen (Statistisches Bundesamt 2011). Im Gegensatz zur Inzidenz ist die Mortalität in Deutschland seit 1995 leicht gesunken (Robert Koch Institut 2005, Robert Koch Institut 2008), was wohl an den verbesserten Therapiemöglichkeiten einerseits und der Früherkennung andererseits liegt, wobei der jeweilige Anteil dieser beiden Faktoren an der Abnahme der Mortalität nicht geklärt ist.

Weltweit lag die Inzidenz des Mammakarzinoms im Jahr 2008 bei 1.38 Millionen Frauen, 458.000 verstarben im selben Jahr an einem Mammakarzinom, wobei die Inzidenz in Westeuropa mit 89,7/100.000 am höchsten und in Ostafrika mit nur 19,3/100.000 am niedrigsten war (Ferlay et al. 2010).

Für eine in Deutschland lebende Frau beträgt das Lebenszeitrisko, an Brustkrebs zu erkranken, 9,2%. Das heißt, jede elfte Frau erkrankt im Laufe ihres Lebens (Robert Koch Institut 2005). Die Häufigkeit der Neuerkrankungen ist jedoch nicht für alle Altersgruppen gleich hoch. Erst ab dem 40. und vor allem ab dem 50. Lebensjahr steigt die Inzidenz stark an, wobei das mittlere Erkrankungsalter bei etwa 63 Jahren und damit 4 Jahre unter dem für andere Malignome liegt (Robert Koch Institut 2005, Robert Koch Institut 2008).

Die 5-Jahres-Überlebensrate bei lokalisiertem Brustkrebs, ohne Lymphknotenmetastasen liegt bei 98%, während die 5-Jahres-Überlebensrate bei Fernmetastasen nur mit 27% angegeben wird (American Cancer Society 2008). Die durchschnittliche 5-Jahres-

Überlebensrate liegt heute zwischen 81 und 89% (Robert Koch Institut 2008, American Cancer Society 2008). Damit ist die Überlebensrate verglichen mit Magen- oder Bronchialkarzinom (31% respektive 15% 5-Jahres-Überlebensrate) relativ hoch (Robert Koch Institut 2005). Der Anstieg der Überlebensrate ist auf die besseren Behandlungsmöglichkeiten und vor allem auf die Früherkennungsmaßnahmen und die dadurch gehäuft diagnostizierten Frühstadien zurückzuführen.

1.1.2 Allgemeine Risikofaktoren

Ein oft vergessener wenngleich der wichtigste Risikofaktor, an Brustkrebs zu erkranken, ist das Geschlecht. Frauen sind weit häufiger betroffen, das Verhältnis wird mit etwa 163:1 (Frauen: Männern) angegeben (Jemal et al. 2003).

Eine Reihe von lebensstilbezogenen und allgemeinen Faktoren werden seit einigen Jahren für die Entstehung von Brustkrebs mitverantwortlich gemacht. Dazu gehören in erster Linie hormonelle Faktoren, wie eine frühe Menarche und eine späte Menopause, wobei hier vor allem die Länge der Zeit, in der die Frau den schwankenden Hormonspiegeln des Zyklus ausgesetzt ist, von Bedeutung zu sein scheint (Deutsches Krebsforschungszentrum 2010). Alter bei Menarche und bei Menopause sind im Wesentlichen genetisch festgelegt und daher kaum exogen beeinflussbar.

Ebenso in die Gruppe der hormonellen Faktoren gehört die Anzahl der Geburten und die Länge der Stillzeit. Jede Geburt eines Kindes, oder eine zumindest einige Monate dauernde Schwangerschaft, sowie eine Laktation von mindestens zwölf Monaten verringern das Risiko für eine Frau, an Brustkrebs zu erkranken um 7-10% bzw. 4-5% (Newcomb et al. 1994, Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer 2002). Bei Nulliparität entspricht das Risiko etwa dem von Frauen, die mit Ende zwanzig ihr erstes Kind bekommen (Brinton et al. 1983). Frauen, die erst nach dem 35. Lebensjahr ein Kind gebären haben ein etwa 3- bis 5-fach erhöhtes Risiko im Vergleich zu Frauen, die mit 18 Jahren ihr erstes Kind gebären (MacMahon et al. 1970, Brinton et al. 1983).

Die Verhütung mittels regelmäßiger Einnahme der *Pille* genauso wie eine Hormonbehandlung in Klimakterium und Postmenopause, sind ebenfalls zu den hormonellen Risikofaktoren zu zählen. Diesen wird eine eher risikosteigernde Wirkung nachgesagt, wobei vor allem beim Einsatz der *Pille*, deren Vorteile als sicherste Methode der Empfängnisverhütung und ihr risikosenkender Effekt etwa auf das Ovarialkarzinom gegen den nicht einheitlich bestätigten negativen Effekt auf das Brustkrebsrisiko abgewogen werden müssen (Deutsches Krebsforschungszentrum 2010). Die CARE-(Contraceptive and Reproductive Experiences-)

Studie (Marchbanks et al. 2002) konnte keinen Zusammenhang zwischen der aktuellen oder zurückliegenden Einnahme von Kontrazeptiva und dem Risiko für ein Mammakarzinom bestätigen, ebenso die CASH- (Cancer and Steroid Hormone-) Studie (The Cancer and Steroid Hormone Study of the Centers for Disease Control and the National Institute of Child Health and Human Development 1986). Eine Metaanalyse aus 54 epidemiologischen Studien der Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer 1996) kam zu dem Ergebnis, dass Frauen, die aktuell Kontrazeptiva einnehmen, ein gering erhöhtes Risiko für Brustkrebs gegenüber Frauen haben, die nie Kontrazeptiva eingenommen haben, dass dieses Risiko jedoch nach Beendigung der Einnahme oraler Kontrazeptiva stetig abnimmt und nach zehn Jahren den gleichen Stand erreicht, wie bei den Frauen, die nie orale Kontrazeptiva eingenommen hatten.

Weitere Faktoren, die das Risiko, an einem Mammakarzinom zu erkranken, erhöhen, sind ein dichter Drüsenkörper (Boyd et al. 1998) und das Vorliegen atypischer Hyperplasien (Dupont et al. 1993). Dabei gibt es keinen Zusammenhang zwischen fibrozystischen Veränderungen der Brustdrüse ohne Proliferation und dem Mammakarzinomrisiko.

Lebensstilbezogene, und damit auch beeinflussbare, Faktoren sind Bewegungsmangel und Übergewicht, besonders postklimakterisch, sowie die Aufnahme von Phytoöstrogenen über die Nahrung oder als Nahrungsergänzungsmittel und Alkoholkonsum, durch deren Vermeidung das Risiko gesenkt werden kann (Deutsches Krebsforschungszentrum 2010). Diese Faktoren scheinen allerdings verglichen mit den hormonellen und genetisch bedingten Risikofaktoren eher eine untergeordnete Rolle zu spielen.

1.1.3 Genetische Risikofaktoren

Ein Zusammenhang zwischen bestimmten Genen und der Entstehung von Brustkrebs wurde in den letzten Jahren viel diskutiert. Es wird vermutet, dass etwa 5-10% aller Mammakarzinome erblich bedingt sind, wobei der Prozentsatz bei jungen Patientinnen höher sein dürfte und etwa die Hälfte der erblichen Mammakarzinome über den Vater vererbt werden (Beckmann et al. 1997, Greene 1997). In Deutschland gibt es Einschlusskriterien, bei deren Erfüllung eine Patientin mit einer Wahrscheinlichkeit von über 10% eine erbliche Form von Brustkrebs hat. Bei Vorliegen dieser Einschlusskriterien sollte eine genetische Beratung und Testung in spezialisierten Zentren angeboten werden.

Tabelle 1 Familiäre Risikofaktoren, die das Vorliegen einer erblichen Form von Brustkrebs wahrscheinlich machen

In der Familie der Patientin ist/sind
mindestens 3 Frauen an Brustkrebs erkrankt
mindestens 2 Frauen an Brustkrebs erkrankt, davon 1 vor dem 51. Lebensjahr
mindestens 1 Frau an Brustkrebs und 1 Frau an Eierstockkrebs erkrankt
mindestens 2 Frauen an Eierstockkrebs erkrankt
mindestens 1 Frau an Brust- und Eierstockkrebs erkrankt
mindestens 1 Frau mit 35 Jahren oder jünger an Brustkrebs erkrankt
mindestens 1 Frau mit 50 Jahren oder jünger an bilateralem Brustkrebs erkrankt
mindestens 1 Mann an Brustkrebs und eine Frau an Brust- oder Eierstockkrebs erkrankt
Nach Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF et al. 2012.

Im Jahr 1990 wurde durch J. M. Hall das Gen BRCA1 entdeckt und dessen Assoziation mit Brustkrebs gezeigt (Hall et al. 1990). Diesen Erkenntnissen folgten vielfältige weitere Studien zu einzelnen Genen und ihrer Relevanz für die Entwicklung von Brustkrebs, sodass heute eine ganze Reihe von Genen als „Brustkrebsgene“ bekannt sind (Walsh und King 2007).

Tabelle 2 Zehn Gene für erblichen Brustkrebs und ihre jeweilige Funktion

NAME	FUNKTION
BRCA1	Doppelstrangbruch Reparatur
BRCA2	Tumorsuppressorgen
p53	Tumorsuppressorgen
PTEN	Tumorsuppressorgen
CHEK2	Tumorsuppressorgen
ATM	DNA Reparaturgen
NBS1	Tumorsuppressorgen
RAD50	Tumorsuppressorgen
BRIP1	BRCA1 interacting helicase
PALB2	BRCA2 interacting protein

Dabei können diese Gene je nach ihrer Risikosteigerung für Brustkrebs unterteilt werden. Die beiden bekanntesten Gene BRCA1 und BRCA2 sind zugleich diejenigen, für die die stärkste Risikosteigerung beschrieben ist. So ist für Frauen mit BRCA1-Gendefekt das Risiko, an Brustkrebs zu erkranken, bis zum 70. Lebensjahr über 65-82%, also fast um den Faktor zehn höher, als in der Normalbevölkerung (Beckmann et al. 1997, Antoniou et al. 2003). Beim BRCA2-Gen wird das Lebenszeitrisiko für Brustkrebs mit etwa 45% angegeben (Antoniou et al. 2003) und es wird insbesondere mit der Entstehung von Brustkrebs bei Männern in Verbindung gebracht (Ford et al. 1998, Martin und Weber 2000).

Mutationen im BRCA1 Gen, dem eine Rolle in der Zellzykluskontrolle und bei DNA-Reparaturmechanismen zugeschrieben wird, sind für etwa 30-40% der vererbten Mammakarzinome verantwortlich. Die Lebenszeitprävalenz beträgt dabei für Mutationsträgerinnen 60-80%, wobei es insbesondere zu einem frühen Auftreten und einer hohen Prävalenz des bilateralen Mammakarzinoms kommt (Greene 1997; Martin und Weber 2000). Zudem sind BRCA1-assoziierte Mammakarzinome durch eine geringe Differenzierung, eine hohe mitotische Rate, sowie häufigere Negativität für Östrogen-, Progesteron- und Her2/neu Rezeptoren gekennzeichnet (Chang und Elledge 2001).

Mutationen im BRCA2 Gen, das ebenfalls für DNA-Reparaturen entscheidend ist, werden mit einer frühen Diagnosestellung sowie der Risikoerhöhung für andere Karzinome, wie beispielsweise Ovarial-, Prostata- oder auch Pankreaskarzinome in Verbindung gebracht (Breast Cancer Linkage Consortium 1999). BRCA2-assoziierte Tumore zeigen häufig eine eher gute Differenzierung und eine geringe mitotische Rate im Vergleich zu BRCA1-assoziierten Tumoren (Breast Cancer Linkage Consortium 1997).

Die Tumorsuppressorgene p53 und PTEN stehen mit Tumorsyndromen, wie dem Li-Fraumeni oder dem Cowden-Syndrom in Verbindung (Malkin et al. 1990, Liaw et al. 1997). Das Gen p53 ist mit schlecht differenzierten östrogenrezeptornegativen Mammakarzinomen assoziiert (Cattoretti et al. 1988). Die genaue Risikosteigerung ist hier nicht ausreichend geklärt.

Die übrigen Gene aus Tabelle 2 sind ungefähr mit einer Verdopplung des Risikos verbunden (Walsh und King 2007). Dem ATM-Gen wird zum Teil eine wesentlich stärker risikosteigernde Wirkung zugeschrieben und es steht vor allem mit einem frühen Erkrankungsalter und einem bilateralen Auftreten des Mammakarzinoms in Verbindung (Broeks et al. 2000).

1.1.4 Einteilung des Mammakarzinoms

Die Weltgesundheitsorganisation teilt das invasive Mammakarzinom nach histologischen Kriterien in Untergruppen, die in Tabelle 3 aufgeführt sind.

Tabelle 3 WHO Klassifikation der invasiven Mammakarzinome

Invasives duktales Karzinom, not otherwise specified, (NOS)
– Gemischter Typ
– Pleomorphes Karzinom
– Karzinom mit osteoklastenartigen Riesenzellen
– Karzinom mit chorionkarzinomartigen Merkmalen
– Karzinom mit melanotischen Merkmalen
Invasives lobuläres Karzinom
Tubuläres Karzinom
Invasives kribriiformes Karzinom
Medulläres Karzinom
Muzinöses Karzinom und andere Muzin-reiche Tumoren
– Muzinöses Karzinom
– Zystadenokarzinom und zylinderzelliges muzinöses Karzinom
– Siegelringzell-Karzinom
Neuroendokrine Tumoren
– Solides neuroendokrines Karzinom
– Atypischer Karzinoidtumor
– Kleinzelliges Karzinom
– Großzelliges neuroendokrines Karzinom
Invasives papilläres Karzinom
Invasives mikropapilläres Karzinom
Apokrines Karzinom
Metaplastische Karzinome
– Rein epitheliale metaplastische Karzinome
– Plattenepithelkarzinom
– Adenokarzinom mit Spindelzell-Metaplasie
– Adenosquamöses Karzinom
– Mukoepidermoides Karzinom
– Gemisches epithelial-/mesenchymales metaplastisches Karzinom
Lipidreiches Karzinom
Sekretorisches Karzinom
Onkozytäres Karzinom
Adenoid-zystisches Karzinom
Azinuszell-Karzinom
Glykogenreiches Klarzellkarzinom
Sebazeoses Karzinom
Inflammatorisches Karzinom

Nach Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF et al. 2012.

In der Praxis spielt die Unterscheidung zwischen duktalem und lobulärem Mammakarzinom aufgrund der Häufigkeit dieser histologischen Typen die größte Rolle.

Das invasive, duktale Mammakarzinom ist mit etwa 75% das häufigste Karzinom der Brust. Mikroskopisch zeigen sich charakteristischerweise Tubulus-Formationen, die bei 90% der Läsionen auftreten sollten, bisweilen finden sich solide Tumorknoten, zentrale Skleosierung, Nekrosen und häufig ist das invasiv duktale Karzinom mit DCIS-Läsionen vergesellschaftet (Ortmann und Görse 2007).

Das tubuläre Karzinom macht nur etwa 5% aller Mammakarzinome aus und gehört zu den duktalem Karzinomen. Wie diese ist es durch tubuläre Strukturen gekennzeichnet, hat eine eher günstige Prognose und ist meist östrogen- und progesteronrezeptorpositiv (Ortmann und Görse 2007).

Beim medullären Karzinom, das ähnlich wie das tubuläre für etwa 5-7% der Mammakarzinome verantwortlich ist, sind die Frauen bei Erkrankung tendenziell etwas jünger, die Prognose ist ebenfalls eher günstig, die Tumore sind jedoch häufiger östrogen- und progesteronrezeptornegativ (Ortmann und Görse 2007).

Das invasive lobuläre Mammakarzinom macht ungefähr 5-10% der Mammakarzinome aus, es ist also viel seltener, als das duktale Karzinom. Es ist häufig im oberen äußeren Quadranten der Brust lokalisiert und mikroskopisch fallen lineare Aneinanderreihungen von Zellen auf, die die Tendenz haben, um einen Duktus oder Lobus zu wachsen. Das lobuläre Mammakarzinom bildet häufiger Hirnhautmetastasen aus und es kann zu intestinalen oder urethralen Obstruktionen kommen (Ortmann und Görse 2007).

Seltenere Formen des Mammakarzinoms sind das muzinöse oder kolloidale und das papilläre Mammakarzinom. Beide haben eine eher günstige Prognose und machen zusammen etwa 4-5% der Karzinome der Brust aus (Ortmann und Görse 2007).

Weitere Karzinome der Mamma, wie das hochaggressive inflammatorische Karzinom, der Morbus Paget, oder die Lymphome der Mamma sollen an dieser Stelle nicht ausführlicher beschrieben werden.

1.1.5 Prognostische und prädiktive Faktoren

Für die Betrachtung prognostischer und prädiktiver Faktoren ist es zunächst sinnvoll, zwischen beiden Begriffen zu unterscheiden. Prognostische Faktoren geben Information darüber, wie sich der Krankheitsverlauf unabhängig von der Therapie gestalten wird. Prädiktive Faktoren dagegen geben Hinweise darauf, ob eine Patientin von einer bestimmten Therapie profitieren wird.

Einleitung

Heute ist eine Vielzahl solcher Faktoren bekannt, wobei die meisten prognostischen Charakter haben und nur wenige Faktoren für Therapieentscheidungen genutzt werden können (Henderson 1998). Im Folgenden sollen nur die wichtigsten dieser Faktoren näher genannt werden, zu den übrigen zählen die Überexpression des EGFR, die S-Phasen-Fraktion und p53-Mutationen (Falette et al. 1998).

Der aussagekräftigste prognostische Faktor beim Mammakarzinom ist der Lymphknotenstatus, also die Anzahl der befallene Lymphknoten der Axilla. Die rezidivfreie 5-Jahres-Überlebensrate bei lymphknotennegativem Brustkrebs liegt bei 98% (American Cancer Society 2008). Bei positivem Nodalstatus, abhängig von der Zahl der befallenen Lymphknoten, treten wesentlich häufiger Rezidive in den ersten 10 Jahren nach Diagnosestellung auf (1-3 LK(+) – 66,5%, >3 LK(+) – 83,6%, 10-Jahres-ÜLR: 1-3 LK(+) – 53,7%, >3 LK(+) – 25,6%) (Valagussa et al. 1978). Eine Metastasierung der ipsilateralen Lymphknoten entlang der Arteria mammaria interna ohne eine Beteiligung der axillären Lymphknoten ist selten (etwa 5%), weshalb die radikale Mastektomie mit Entfernung dieser ipsilateralen Lymphknoten heute nicht mehr praktiziert wird (Morrow und Foster 1981). Dagegen ist die Axilla-dissektion mit vorangehender Sentinel-Lymphknoten-Biopsie und der histologischen Aufarbeitung der Lymphknoten ein wichtiges diagnostisches Kriterium (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF et al. 2012).

Die Tumorgöße bei Diagnosestellung ist ebenso entscheidend für die Prognose der Patientinnen. Tumore, die kleiner als einen Zentimeter sind, haben dabei eine gute Prognose mit einer Rezidivfreiheit nach 20 Jahren von 88% ohne Chemotherapie oder Radiotherapie (Rosen et al. 1993). Die Tumorgöße steht in positiver Korrelation zum Nodalstatus. So zeigen Tumoren unter 1cm nur zu 20-30% eine axilläre Lymphknotenbeteiligung, wohingegen Tumoren mit 2-3cm Durchmesser in 29-57% der Fälle eine Lymphknotenbeteiligung zeigen (Ortmann und Gorse 2007).

Das Grading ist ein eigenständiger prognostischer Faktor, der eng mit dem Überleben der Patientinnen zusammenhängt (Elston und Ellis 1991). Nach den aktuellen Leitlinien soll es nach der Modifikation des von Bloom und Richardson vorgeschlagenen Gratings entsprechend Elston und Ellis (Elston und Ellis 1991) erfolgen (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF et al. 2012). Bei dieser Methode werden das histologische Grading (d.h. die Rate an tubulären Strukturen), das nukleäre Grading (d.h. Kernpleomorphismen / Anaplasie) und eine genaue Zählung der mitotischen Zellen in einem definierten Gesichtsfeld berücksichtigt. Ein geringes Grading ist dabei mit einer wesentlich besseren Prognose verknüpft, als ein mittleres oder hohes Grading (Elston und Ellis 1991).

Eine multivariate Analyse aus Nottingham (Nottingham-Prognose-Index) kommt zu dem Ergebnis, dass das Alter der Patientinnen bei Diagnose im Gegensatz zu Lymphknotenstatus, Tumorgöße und histologischem Grading kein eigener unabhängiger Prognosefaktor beim Mammakarzinom ist (Kollias et al. 1997).

Besondere Beachtung sollen an dieser Stelle die Steroidrezeptoren erhalten. Sowohl die beiden Östrogenrezeptoren ER α und ER β , als auch die Progesteronrezeptoren PR α und PR β spielen hierbei eine wichtige Rolle.

Frauen mit östrogenrezeptorpositivem Karzinom haben im Vergleich zu solchen mit östrogenrezeptornegativem Karzinom bei primär operablem Brustkrebs und neoadjuvanter Therapie ein besseres klinisches Ansprechen und eine deutlich geringere Wahrscheinlichkeit, ein Rezidiv zu entwickeln (Makris et al. 1998, Chang et al. 1999). Der Nachweis des Östrogenrezeptors beim Mammakarzinom gilt des weiteren eher als Indikator für das krankheitsfreie Intervall, also für das Rezidivmuster, und weniger als Indikator für das Gesamtüberleben der Patientinnen (Adami et al. 1985). Östrogenrezeptorpositive Tumore entwickeln eher Metastasen im Knochen, wohingegen die östrogenrezeptornegativen Tumore häufiger in Gehirn und Leber metastasieren, was mit einer schlechteren Prognose und einem kürzeren Überleben in Zusammenhang steht (Koenders et al. 1991, Berghoff et al. 2012). Zudem sind oft Tumore älterer Frauen, sowie histologisch gut differenzierte Karzinome östrogenrezeptorpositiv (Diab et al. 2000, Jovicić-Milentijević et al. 2004, Anders et al. 2008, Wang et al. 2012). In Ergänzung dazu konnte eine geringere Assoziation östrogenrezeptopositiver Tumore mit Mutationen, Amplifikationen oder dem Verlust mammakarzinomassoziiierter Gene, wie etwa p53, HER2/neu und dem EGFR gezeigt werden, die allesamt mit einer schlechteren Prognose einher gehen (Wenger et al. 1993).

Der Progesteronrezeptorstatus, besonders die Isoform PR α , korreliert in der Mehrzahl der Fälle gut mit dem Östrogenrezeptorstatus und wird daher genau wie dieser mit einer besseren Prognose und insbesondere einem guten Ansprechen auf eine Antiöstrogentherapie in Verbindung gebracht (Mohsin et al. 2004), wobei dem Progesteronrezeptorstatus auch unabhängig vom Östrogenrezeptor prognostischer Wert für das krankheitsfreie Überleben und das Therapieansprechen zugesprochen wurde (Liu et al. 2010). Insbesondere konnte gezeigt werden, dass Patientinnen mit östrogenrezeptor- und progesteronrezeptorpositivem Brustkrebs ein geringeres Rezidivrisiko als Frauen mit östrogenrezeptorpositivem/progesteronrezeptornegativem Brustkrebs haben, wobei diese wiederum ein geringeres Rezidivrisiko als Frauen mit östrogenrezeptor- und progesteronrezeptornegativem Mammakarzinom haben (Bardou et al. 2003). Es konnte des weiteren eine Assoziation der

Isoform PR β mit dem Auftreten eher gut differenzierter Tumoren gefunden werden (Bamberger et al. 2000).

Der Her2/neu- Rezeptorstatus gehört zu den neueren Prognosefaktoren beim Mammakarzinom, die erst in den letzten Jahren eingehender untersucht wurden. Der Her2/neu – Rezeptor gehört zu den EGF – Rezeptoren, einer Familie der Tyrosinkinaserzeptoren. Der Rezeptor ist in allen Epithelzellen des Körpers und so auch in gesunden Brustdrüsenzellen exprimiert, eine Amplifikation des Her2/neu Gens oder Überexpression des Proteins kommt bei etwa 20-30% aller Mammakarzinome vor (Slamon et al. 1987, King et al. 1989, Iglehart et al. 1990).

Dabei konnte ein Zusammenhang der Her2/neu Überexpression mit schlechter differenzierten Tumoren, Östrogenrezeptor- und Progesteronrezeptornegativität und Lymphknotenmetastasen bei Diagnose gefunden werden (Slamon et al. 1987, Gusterson et al. 1992), so dass die Her2/neu Überexpression mit hoher Aggressivität, einem kürzeren krankheitsfreien Intervall und einem schlechteren Gesamtüberleben korreliert (Pinto 2001, Ortmann und Gorse 2007). Der Zusammenhang zwischen einer Her2/neu Überexpression und einer schlechten Prognose für Frauen sowohl mit lymphknotenpositivem Brustkrebs, als auch mit lymphknotennegativem Brustkrebs wurde in mehreren Studien gezeigt (Tandon et al. 1989, Allred et al. 1992, Andrulis et al. 1998, Volpi et al. 2003). Neben diesen Eigenschaften als prognostischer Faktor wird Her2/neu zusätzlich als prädiktiver Faktor für das Ansprechen auf die adjuvante endokrine Therapie und die Wirksamkeit von oder die Resistenz gegen Tamoxifen diskutiert (Pietras et al. 1995, De Placido et al. 2003).

1.1.6 Therapieansätze beim Mammakarzinom

Die Therapie richtet sich vor allem nach dem Stadium des Mammakarzinoms, aber auch nach der körperlichen und psychischen Situation der Patientin, wobei der Erhaltung der Lebensqualität besondere Beachtung geschenkt wird. Im Wesentlichen gibt es dabei drei Säulen: Chirurgie, Chemotherapie - adjuvant oder neoadjuvant - und Strahlentherapie. Ergänzt werden diese seit einigen Jahren durch die Hormontherapie und den Einsatz von Antikörpern.

Für das invasive lokal begrenzte Mammakarzinom stellt die Operation in sano, das heißt mit einem Sicherheitsabstand von mindesten einem Millimeter, das Kernstück der Therapie dar. Dabei ist die brusterhaltende Operation mit anschließender Bestrahlung der modifizierten radikalen Mastektomie, was das Überleben betrifft, als gleichwertig anzusehen. Unter anderem bei multizentrischen Tumoren, inflammatorischem Mammakarzinom oder be-

stehenden Kontraindikationen zur Radiotherapie ist jedoch die modifizierte radikale Mastektomie die Operation der Wahl. Zusätzlich zur Operation an der Brust gehört die Axilla-Operation mit Entfernung des Sentinel-Lymphknotens zur Bestimmung des Nodalstatus zum Therapiestandard. Bei negativem Sentinel-Lymphknoten ist eine Axilladisektion nicht notwendig, was mit einer geringeren Morbidität verbunden ist. Falls jedoch kein Sentinel-Lymphknoten identifiziert werden kann, oder dieser positiv ist muss eine Axilladisektion mit Entfernung von mindestens zehn Lymphknoten und deren histologischer Aufarbeitung erfolgen. Nach brusterhaltender Operation ist eine Radiotherapie der gesamten verbliebenen Brust sowie der Thoraxwand indiziert. Auch nach Mastektomie ist eine Radiotherapie der Brustwand bei großen Tumoren, positivem Lymphknotenbefall, Resttumor, oder Risikofaktoren für ein Rezidiv angezeigt, ebenso die Bestrahlung der Axilla für den Fall eines Resttumors dort. Bei inoperablen oder lokal weit fortgeschrittenen Tumoren ist eine neoadjuvante Chemotherapie gefolgt von einer Operation, sofern möglich, und einer Radiotherapie Methode der Wahl. Eine systemische adjuvante Therapie sollte prinzipiell erst nach erfolgter Sentinel-Lymphknoten Diagnostik beginnen. Hierbei stehen Chemotherapie, endokrine Therapie und Her2neu Antikörpertherapie zur Verfügung, welche in Kombination oder als Sequenz vor oder nach Operation eingesetzt werden können. Bei Patientinnen mit rezeptornegativem Brustkrebs ist dabei eine Chemotherapie einzusetzen, bei östrogen- und progesteronrezeptorpositiven Tumoren eine endokrine Therapie. Eine Her2/neu Antikörpertherapie macht bei Her2/neu Überexpression Sinn und wird neoadjuvant für ein Jahr verabreicht. Eine neoadjuvante systemische Chemotherapie wird bei lokal fortgeschrittenen, inoperablen, oder bei inflammatorischen Mammakarzinomen empfohlen.

Die Therapie des lokal rezidierten Mammakarzinoms beinhaltet die sekundäre Mastektomie, eine lokale Therapie gegebenenfalls in Verbindung mit einer Chemotherapie oder endokrinen Therapie oder auch die lokale Radiotherapie bei Inoperabilität als mögliche Optionen.

Beim metastasierten Mammakarzinom richtet sich die Therapie wiederum nach dem Hormonrezeptorstatus. Bei rezeptorpositiven Tumoren wird eine endokrine Therapie empfohlen, nicht jedoch bei Hirnmetastasen. Für alle anderen Fälle wird auf eine Chemotherapie zurückgegriffen, wobei grundsätzlich gilt, dass keine Hochdosistherapien durchgeführt werden sollen und die Therapie bei nicht tolerabler Toxizität oder Tumorprogression beendet werden muss. Eine *targeted therapie* mittels Her2/neu Antikörpern ist bei nachgewiesener Her2/neu Überexpression im metastasenverdächtigen Gebiet in Kombination mit einer Chemotherapie durchzuführen.

Skelettmetastasen können bisweilen operativ versorgt werden, ansonsten kommt hier vor allem eine Radiotherapie zum Einsatz, wobei in jedem Fall die Schmerzfreiheit, Funktions- und Stabilitätserhaltung im Fokus der Therapie stehen.

Hirnmetastasen werden mittels Radiotherapie des gesamten Hirnschädels behandelt, die Gabe von Steroiden ist bei perifokalem Hirnödem unterstützend indiziert. (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF et al. 2012)

1.2 Gutartige Veränderungen der Brust

Neben den bösartigen Erkrankungen der Brust, die zur vielfältigen Gruppe der Mammakarzinome gehören gibt es auch eine Reihe von gutartigen Erkrankungen, von denen an dieser Stelle nur das Fibroadenom und die Mastopathie als die beiden häufigsten benignen Neubildungen der Brust erwähnt werden sollen.

1.2.1 Fibroadenom

Fibroadenome sind die häufigsten gutartigen Neubildungen der Mamma. Die Mehrzahl der Frauen ist zum Diagnosezeitpunkt zwischen 20 und 30 Jahren alt. Dieser Umstand und die Tatsache, dass Fibroadenome bei Schwangeren oft größenprogredient sind, im Verlauf des weiblichen Zyklus ihre Größe ändern können und nach der Menopause häufig eine Rückbildungstendenz zeigen, lassen darauf schließen, dass ihr Wachstum zumindest teilweise hormonabhängig ist. Sie können als einzelne oder multiple, gummiartig feste Knoten sowohl uni- als auch bilateral auftreten, die gegenüber dem umgebenden Gewebe gut verschieblich sind. Ein Verdacht ergibt sich oft zufällig im Rahmen von Selbstuntersuchungen oder Mammographien. Obwohl Ultraschall und Mammographie wichtige Hinweise auf die Gutartigkeit der Läsionen geben können, ist die Diagnosesicherung und genaue Abgrenzung zum Mammakarzinom mittels Feinnadelbiopsie, sowie die Überwachung durch einen Facharzt unabdingbar (Walters et al. 1990). Das Risiko, an Brustkrebs zu erkranken, wird durch Fibroadenome im Allgemeinen nicht beeinflusst, wobei ältere Patientinnen und Patientinnen mit komplexen Fibroadenomen ein leicht erhöhtes Risiko haben (Dupont et al. 1994, Ashbeck et al. 2007). Besonders bei jungen Patientinnen sollten daher nur große oder schmerzhafte Fibroadenome chirurgisch entfernt werden, wohingegen bei kleinen klinisch unauffälligen Knoten eine abwartende Haltung und regelmäßige Kontrollen ausreichend sind. (Carty et al. 1995).

1.2.2 Mastopathie

Unter dem Begriff Mastopathie werden verschiedene proliferative und regressive Veränderungen des Brustdrüsenparenchyms zusammengefasst, die in der Regel bilateral auftreten. Wahrscheinlich liegt ihnen eine Verschiebung des Östrogen-Progesteron-Verhältnisses zu Gunsten des Östrogens zugrunde (Peters 2003, Deutsches Krebsforschungszentrum 2007). Dadurch kann es zur Proliferation von Drüsengewebe mit der Ausbildung von Gangektasien und Zysten kommen. Etwa die Hälfte aller Frauen, mit einem Häufigkeitsgipfel zwischen 30 und 50 Jahren, ist von einer Mastopathie betroffen, was sie zur häufigsten Veränderung der Brust überhaupt macht. Oft bleibt die Mastopathie symptomlos, oder tritt als prämenstruelle Mastodynie in Erscheinung.

Die Einteilung der Mastopathie erfolgt nach Prechtel in drei Grade:

- Grad I: fibrös-zystische Mastopathie ohne Epithelproliferation
- Grad II: proliferative Mastopathie ohne Atypien (Adenose, sklerosierende Adenose, Epitheliose und Papillomatose)
- Grad III: atypischen Epithelproliferationen

Das Brustkrebsrisiko ist bei Frauen mit Mastopathie Grad I oder II im Vergleich zu gleichaltrigen Frauen ohne Mastopathie nicht erhöht. Anders bei der Mastopathie Grad III, die eine höhere Entartungstendenz zeigt und das Risiko, an Brustkrebs zu erkranken, vervierfacht (Prechtel et al. 1994). Daraus ergibt sich die Notwendigkeit engmaschiger Kontrollen mittels Mammographie. In vielen Fällen ist keine spezifische Therapie nötig, bei zyklusabhängigen Beschwerden, wie der Mastodynie kann bisweilen mithilfe von Gestagenen Besserung erzielt werden, besonders bei Mastopathie Grad III ist auch das operative Vorgehen in Betracht zu ziehen.

1.3 G-Protein-gekoppelter Rezeptor 30 (GPR30)

1.3.1 Das Gen und sein Genprodukt

Im Jahr 1997 wurde von Carmeci et al. erstmalig ein GPR30 cDNA Klon aus Brustkrebszelllinien isoliert und als Mediator eines schon früher beobachteten intrazellulären cAMP Anstiegs nach Östrogenstimulus (Aronica et al. 1994) identifiziert (Carmeci et al. 1997). Damit galt GPR30 als potenzieller dritter Östrogenrezeptor neben den bereits bekannten ER α und - β

und zugleich als mögliches Korrelat eines bereits zuvor postulierten membranständigen Östrogenrezeptors.

Das humane Gen GPR30 ist auf dem Chromosom 7, genauer 7p22.3 lokalisiert (Carmeci et al. 1997).

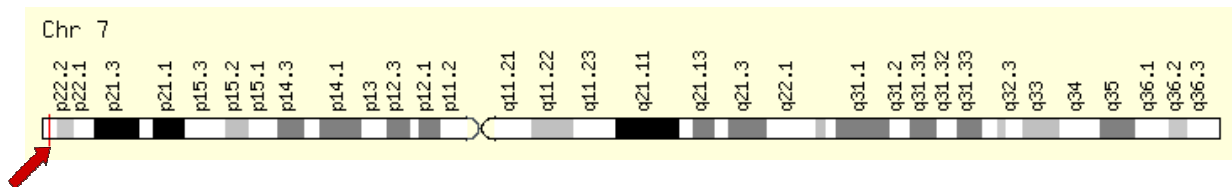


Abb. 1 Lokalisation von GPR30 auf dem kurzen Arm des Chromosom 7, 7p22.3 (nach www.genecards.org)

Das Gen, bestehend aus 11.608 Basenpaaren, weist drei Exons auf, wovon das dritte die für Aminosäuren codierende Region beinhaltet.

Der humane GPR30-Rezeptor gehört zur Familie der G Protein gekoppelten Rezeptoren (Revankar et al. 2005). Das Molekül besteht aus 375 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von etwa 42,25 kDa (www.genecards.org). Der Rezeptor konnte in verschiedenen Studien am endoplasmatischen Retikulum, am Golgiapparat und an der Zellmembran nachgewiesen werden (Revankar et al. 2005, Funakoshi et al. 2006, Filardo et al. 2007, Sakamoto et al. 2007). Der N-Terminus des 7 Transmembranrezeptors befindet sich wahrscheinlich auf der Außenseite der Membran und bildet die Kopplungsstelle für Liganden, während das G-Protein an die Schleifen der intrazellulären Domäne bindet (Mizukami 2010).

Nach derzeitigem Stand der Forschung wird der Rezeptor in den meisten humanen Geweben exprimiert (www.genecards.org) und konnte auch in verschiedenen Brustkrebszelllinien detektiert werden (Carmeci et al. 1997).

1.3.2 Signaltransduktion und Liganden

Die Aktivierung des GPR30 Rezeptors setzt eine Signalkaskade in Gang, die in intrazellulärer Kalziummobilisierung und der Freisetzung anderer second messenger resultiert (Revankar et al. 2005). Wie bei G-Protein-gekoppelten Rezeptoren im Allgemeinen üblich, wird über die α Untereinheit des aktivierten stimulierenden G-Proteins die Adenylatcyclase ihrerseits aktiviert und dadurch die cAMP Produktion erhöht. Durch die β und γ Untereinheit des G-Proteins wird ein zweiter Signalweg induziert, der über die aktivierte Metalloproteinase zur Freisetzung von HB-EGF führt, wodurch wiederum eine Signalkaskade mittels

Aktivierung des EGF Rezeptors in Gang gesetzt wird. Dadurch konnte die Beobachtung, dass Östrogene EGF ähnliche Effekte hervorrufen können, erklärt werden (Filardo und Thomas 2005, Prossnitz et al. 2008).

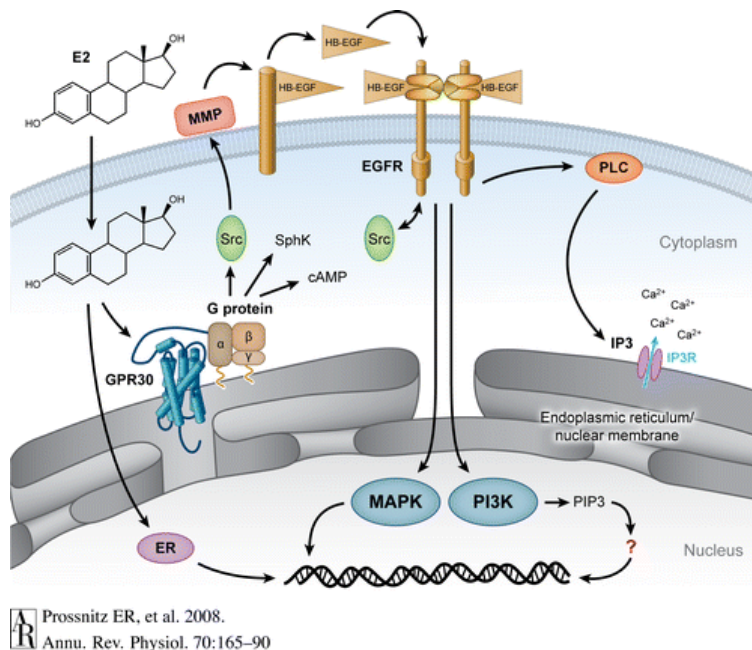


Abb. 2 Schematische Darstellung der Signaltransduktion durch GPR30 (Prossnitz et al. 2008). GPR30 wird durch Östrogen aktiviert und eine Signalkaskade in Gang gesetzt. Die α Untereinheit des G-Proteins führt über die Adenylatcyclase zu einem cAMP Anstieg. Die src-like Kinase abhängige β und γ Untereinheit des G-Proteins führt über die Aktivierung der Matrix Metalloproteinase (MMP) zur Freisetzung von heparin-gebundenem EGF (HB-EGF), durch das eine weitere Signalkaskade ausgelöst wird, die in der Aktivierung der MAP Kinase (MAPK) und der PI3 Kinase (PI3K) resultiert. Zugleich kommt es über die Phospholipase C (PLC) zu einem Anstieg des intrazellulären Inositoltriphosphat (IP3).

Seit der Identifizierung des Rezeptors wurde die Frage nach möglichen Liganden kontrovers diskutiert. Es konnte eine positive Korrelation zwischen der Expression von GPR30 und der Antwort auf Östrogenreize in ER α - und ER β - defizienten Zellen gefunden werden (Filardo et al. 2000). Dies führte zu der Annahme, dass es sich bei dem Rezeptor um einen weiteren Östrogenrezeptor handelt, wobei manche Untersuchungen eine Bindung von 17 β -Estradiol an GPR30 nicht bestätigten (Pedram et al. 2006, Otto et al. 2008). Neuere Studien konnten jedoch zeigen, dass dieses Steroid einen wichtigen GPR30 Liganden darstellt (Kleuser et al. 2008, Pandey et al. 2009). Im Gegensatz zu ihrer ER α abhängigen Funktion, scheinen sowohl das reine Antiöstrogen ICI 182.780, als auch der selektive Östrogenrezeptor

Modulator (SERM) Hydroxytamoxifen den GPR30 abhängigen Signalweg zu aktivieren (Thomas et al. 2005).

Im Jahr 2006 wurde der spezifische GPR30-Ligand G1 (GPR30 specific compound 1) identifiziert, der im Vergleich zu 17 β -Estradiol zu einem langsameren intrazellulären Kalziumanstieg führt (Bologa et al. 2006).

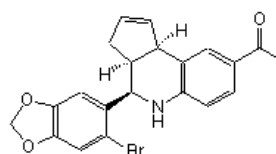


Abb. 3 Struktur des selektiven GPR30 Liganden G1 (Bologa et al. 2006)

Neben diesen aktivierenden Liganden wurden bisher zwei Liganden mit hemmendem Effekt auf GPR30 identifiziert. G15, ein analog zu G1 synthetisch hergestellter GPR30 Inhibitor, dessen hemmender Effekt auf die GPR30 Signalkaskade in vitro und in vivo gezeigt werden konnte (Dennis et al. 2009) und G36, ein weiteres synthetisches G1 Analogon, das im Vergleich zu G15 eine verbesserte Spezifität für GPR30 aufweist (Dennis et al. 2011). Erst kürzlich konnte eine neue Substanz synthetisiert werden (MIBE), die sowohl am GPR30 Rezeptor als auch an ER α von Brustkrebszellen antagonistisch wirkt, was in Zukunft zu einer Verbesserung der Antiöstrogentherapie beitragen könnte (Lappano et al. 2012).

Tabelle 4 Überblick über die Liganden am GPR30 Rezeptor und ihre Wirkung an ER α

Ligand	Effekt an GPR30	Effekt an ER α
Östrogen	aktivierend	aktivierend
ICI 182.780	aktivierend	hemmend
Hydroxytamoxifen	aktivierend	SERM – je nach Gewebe aktivierend oder hemmend
G1	aktivierend	kein Effekt / nur sehr geringe Rezeptorbindung
G15	hemmend	nur geringe Rezeptorbindung
G36	hemmend	fast keine Bindung
MIBE	hemmend	hemmend

1.3.3 GPR30 und seine Bedeutung für das Mammakarzinom

Die Identifizierung als potenzieller Östrogenrezeptor in Mammakarzinomzellen und die Erkenntnisse bezüglich des Signalweges legen die Vermutung nahe, dass die Expression des

Rezeptors Einfluss auf das Auftreten, den Verlauf oder die Prognose von Mammakarzinomen haben könnte. Filardo et al. konnten eine direkte Korrelation der GPR30 Expression mit der Tumorgroße und auch der Her2/neu Überexpression, die wiederum eine erhöhte Zellproliferation und geringere Apoptose zur Folge hat, zeigen. Zudem bestand auch ein positiver Zusammenhang mit dem Vorhandensein von Fernmetastasen bei Erstdiagnose (Filardo et al. 2006). Eine asiatische Studie konnte jedoch keinen Zusammenhang mit einer Her2/neu Überexpression feststellen (Kuo et al. 2007).

Die Transaktivierung zwischen EGFR und GPR30 scheint ebenfalls eine Rolle bei der Tumorphiliferation zu spielen, da durch die Stimulierung mit EGF die GPR30 Expression ER α und - β negativer Zellen steigt, was die proliferative Wirkung von Östrogen durch GPR30 in diesen Zellen erhöht (Albanito et al. 2008).

Daneben wurde für ER α und - β negative Brustkrebszellen eine Erhöhung der Expression von CTGF (connecting tissue growth factor) durch Bindung von 17 β -Estradiol an GPR30 dokumentiert, wodurch zugleich Zellwachstum und –migration gesteigert wurden (Pandey et al. 2009). Außerdem wurde herausgefunden, dass die Bindung von 17 β -Estradiol an GPR30 den TGF β Signalweg in Brustkrebszellen durch die Aktivierung eines MAP Kinase Signalwegs, der mit der SMAD Protein Aktivierung interferiert, unterbricht. Dieser Effekt spielt möglicherweise eine Rolle in der Entwicklung von Resistenzen gegen Antiöstrogene (Kleuser et al. 2008). Auch andere Studien signalisieren die Bedeutung der Expression und Aktivierung von GPR30 in Brustkrebszellen für die Entstehung einer Antiöstrogenresistenz (Ignatov et al. 2010, Li et al. 2010) und sehen GPR30 als ungünstigen prognostischen Faktor für die Rezidivfreiheit bei Patientinnen, die mit Tamoxifen behandelt wurden (Ignatov et al. 2011).

Eine aktuelle Studie zeigte, dass die Inaktivierung von GPR30 in ER α , PR und Her2/neu negativen Brustkrebszellen deren Proliferation hemmt, was eine vielversprechende Entdeckung darstellt, da diese Tumore weder einer Antiöstrogentherapie noch einer Therapie mit Anti-Her2/neu Antikörpern zugänglich sind (Girgert et al. 2012).

1.4 Single Nucleotide Polymorphismen (SNPs)

Single Nucleotide Polymorphisms stellen die häufigsten Variationen in der Genomsequenz dar. Dabei handelt es sich um den Austausch einer einzelnen Base, A,C,G oder T, durch eine der drei anderen Basen in der Basensequenz. Das heißt, SNPs weisen meist zwei Allele auf –

beispielsweise tritt ein G an die Stelle eines A, es sind aber bis zu vier Allele in einer Population möglich. Dabei kann eine Person für das jeweilige Allel homozygot sein – beispielsweise AA oder GG, oder sie ist heterozygot AG.

SNPs finden sich durchschnittlich alle 300 bis 2000 Basenpaare (Zhao et al. 2003, Ke et al. 2004), wobei die Anzahl der bekannten SNPs in den letzten Jahren stark zugenommen hat – im März 2012 sind in der SNP Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) bereits über 40 Millionen validierte SNPs im Genom des *Homo sapiens* aufgeführt (National Center for Biotechnology Information 2009). Die Nomenklatur für SNPs teilt diese in „rs“ (reference SNP) und „ss“ (submitted SNP) ein, wobei letztere nach Überprüfung in „rs“ SNP Identifikationsnummern überführt werden (Kitts and Sherry 2002). SNPs werden – im Unterschied zu Mutationen – vererbt und kommen deshalb auch häufiger in einer Population vor als Mutationen. Zudem haben SNPs in der Regel keinen direkten kausalen Zusammenhang mit dem Auftreten einer Erkrankung, können aber dennoch die Prädisposition für eine Erkrankung, deren Ausprägung oder das Ansprechen auf eine Therapie beeinflussen. Sie finden sich meist in der Nähe von Genen, die mit der jeweiligen Krankheit in Verbindung stehen (National Center for Biotechnology Information 2007). SNPs weisen meist zwei Allele auf, es sind aber bis zu vier Allele möglich.

Da nur drei bis fünf Prozent des menschlichen Genoms tatsächlich für Proteine codieren, sind die meisten SNPs in den nicht-codierenden Bereichen zu finden und beeinflussen den Phänotypen des Individuums nicht (National Center for Biotechnology Information 2007). Dagegen sind Missense- oder Nonsense-SNPs, die in Exons liegen, in der Lage, die Struktur oder Funktion von Proteinen zu verändern und für manche von ihnen, beispielsweise die Faktor-V-Leiden Mutation, ApoE ϵ 4, oder eine Variation im HFE Gen konnte Relevanz für bestimmte Erkrankungen nachgewiesen werden (Corder et al. 1993, Price und Ridker 1997, Loréal et al. 2007). SNPs wiederum, die in der Promotorregion eines Gens liegen, können die Expression dieses Gens beeinflussen, was auch für SNPs im Promotor des *breast cancer resistance protein* gezeigt werden konnte (Poonkuzhali et al. 2008).

Eine weitere interessante Beobachtung ist, dass SNPs, die sich in räumlicher Nähe zueinander im Genom befinden, nicht einzeln, sondern in sogenannten Haplotypblöcken vererbt werden. Daraus ergibt sich die Möglichkeit, bei bekannten Haplotypblöcken durch Untersuchung eines SNPs auf eine Reihe anderer SNPs in der Umgebung zu schließen.

1.4.1 SNPs beim Mammakarzinom

In den letzten Jahren wurden einige genomweite Assoziationsstudien zum Brustkrebsrisiko durchgeführt, wobei etliche Polymorphismen identifiziert wurden, die vermutlich die Prädisposition für Brustkrebs beeinflussen (Easton et al. 2007, Hunter et al. 2007, Gold et al. 2008, Ahmed et al. 2009, Thomas et al. 2009). Auch in Genen, die mit dem Östrogenmetabolismus in Verbindung stehen, wurden verschiedene SNPs untersucht, von denen manchen eine Rolle für das Brustkrebsrisiko zugeschrieben wurde (Fernández et al. 2006, Siddig et al. 2008, Zheng et al. 2009).

1.4.2 Polymorphismen im GPR30 Gen

Für das GPR30 Gen waren in der SNP Datenbank des NCBI im März 2012 221 SNPs aufgeführt (National Center for Biotechnology Information 2009).

In der vorliegenden Studie wurden erstmals drei GPR30 SNPs im Hinblick auf ihre Relevanz für das Brustkrebsrisiko und Brustkrebscharakteristika untersucht. Einer der SNPs liegt in der Promotorregion des Gens, einer in der 5' untranslatierten Region und der dritte ist im Exon 3, dem ersten codierenden Exon, lokalisiert.

Bisher gab es zu einem der drei untersuchten SNPs eine weitere Assoziationsstudie, die einen Zusammenhang zwischen dem Krümmungsgrad bei der idiopathischen Adoleszentenskoliose und der Heterozygotie für den SNP rs3808351 und für zwei weitere SNPs im GPR30 Gen zeigte (Peng et al. 2012). Eine portugiesische Studie hat den Zusammenhang zwischen SNP rs3808350 sowie zwei SNPs im ER α Gen mit Brustkrebsprädisposition und Tumorcharakteristika untersucht, wobei hier keine Assoziation des GPR30 SNPs mit einem der untersuchten Parameter gefunden wurde (Alves et al. 2010).

Zu weiteren SNPs des GPR30 Gens liegen derzeit keine Studien vor.

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Vor dem Hintergrund, dass hormonelle Einflüsse eine entscheidende Rolle in der Entwicklung eines Mammakarzinoms spielen, ist die Erforschung dieser Zusammenhänge und möglicher sich daraus ergebender therapeutischer Ansätze ein Gebiet großen Interesses.

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmalig drei ausgewählte Polymorphismen im Gen des erst seit einigen Jahren bekannten Östrogenrezeptors GPR30 untersucht. Dabei wurde der Frage nachgegangen, ob das Vorkommen bestimmter Allele dieser SNPs einen Risikofaktor

Einleitung

für das Auftreten eines Mammakarzinoms bedeutet. Ferner wurde in dieser Genotyp-Phänotyp-Assoziationsstudie auch eine mögliche Korrelation mit anderen Pathologien der weiblichen Brust, wie dem Fibroadenom oder der Mastopathie, untersucht.

Daneben sollte die Frage beantwortet werden, ob die Allele der untersuchten SNPs in Zusammenhang mit der Entwicklung bestimmter Tumorcharakteristika, wie Tumorgroße, Grading, Nodalstatus, Östrogen- und Progesteronrezeptorexpression sowie Her2/neu Überexpression stehen und dadurch prognostische oder sogar prädiktive Relevanz besitzen.

In einem zweiten Schritt wurde die Korrelation der Allele mit der GPR30 Expression in einigen Mammakarzinomzelllinien untersucht, um wiederum eine Aussage darüber treffen zu können, ob die SNPs einen Risikofaktor für die Entwicklung eines GPR30 positiven Mammakarzinoms, welches mit einer ungünstigen Prognose vergesellschaftet zu sein scheint, darstellen.

2. Material und Methoden

2.1 Studienteilnehmer

Insgesamt wurden in dieser retrospektiven Studie 257 Kaukasierinnen mit gesichertem, nicht familiärem Brustkrebs, 247 Kaukasierinnen ohne jede Malignität, sowie 46 Frauen mit bekanntem Fibroadenom und 54 Frauen mit Mastopathie untersucht. Zusätzlich wurde eine Gruppe von 50 Frauen mit hereditärem Brustkrebs in die Studie aufgenommen, bei denen eine familiäre Häufung von Mammakarzinomen eruierbar war, jedoch keine der bekannten, das Mammakarzinomrisiko steigernden Mutationen im BRCA1 oder BRCA2 Gen nachgewiesen werden konnten. Mangels verwertbarer Genotypisierung einzelner Proben, können die Probenzahlen der untersuchten Gruppen in Einzelfällen von diesen Gesamtzahlen abweichen.

Das mittlere Alter der Patientinnen war zum Zeitpunkt der Diagnose 55,6 Jahre, das der Frauen der Kontrollgruppe 54,9 Jahre (Streuung 24 bis 82 Jahre).

Die Proben wurden teils vom Institut für Pathologie der Universität Regensburg anonymisiert zur Verfügung gestellt und teils durch die Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe der Universität Regensburg zwischen 2005 und 2007 gesammelt. In die Studie eingeschlossen wurden Patientinnen mit sporadischem Brustkrebs mit verfügbarer Information zu Tumorgröße, Grading, Nodalstatus, ER α -, PR- und Her2/neu-Status, der mittels Immunhistochemie oder Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung ermittelt wurde. Sowohl die Mammakarzinompatientinnen, als auch die Frauen der Kontrollgruppe stammten aus der Region um Regensburg in der Oberpfalz, Bayern, Deutschland. Einschlusskriterium für die Kontrollen war die Abwesenheit jeglicher klinisch relevanter Malignität zu Beginn der Studie.

Die vorliegende Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Regensburg genehmigt und in Einklang mit den in der gültigen Version der 1964 niedergeschriebenen Deklaration von Helsinki genannten Richtlinien ausgeführt. Eine schriftliche Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie lag bei allen Patientinnen vor.

Tabelle 5 Histopathologische Charakteristika und Rezeptorstatus der Brustkrebspatientinnen, die in diese Studie eingeschlossen waren (n=257)

Charakteristikum	Patientenzahlen				
Tumorgröße	pT1 146	pT2 84	pT3 8	pT4 12	pTx 7
Histologisches Grading	G1 31	G2 137	G3 84	Gx 0	
Nodalstatus	N0 155	N1-3 78	Nx 24		
ER α -Status	neg. 36	pos. 215	ERx 6		
PR-Status	neg. 56	pos. 195	PRx 6		
Her2/neu-Status	neg. 193	pos. 42	Her2x 22		

x: Proben ohne genaue Angaben zu der jeweiligen Kategorie

2.2 Materialien und Geräte

2.2.1 Reagenzien, Chemikalien

DNA Isolierung aus Blut und Zelllinien

Lysispuffer:	TritonX 1% v/v	Sigma-Aldrich, München, D
	Sucrose 0,32M	
	Tris (pH 7,5) 0,1M	Roth, Karlsruhe, D
	MgCl ₂ 0,005M	Roth, Karlsruhe, D
5-fach GoTaq® PCR-Puffer colorless		Promega, Madison, USA
Tween®20 0,5%		Sigma-Aldrich, München, D

Polymerase-Kettenreaktion

5-fach Green GoTaq® Reaction Buffer		Promega, Madison, USA
dNTP Set:	dATP 100mM	Fermentas, St. Leon-Rot, D
	dGTP 100mM	Fermentas, St. Leon-Rot, D

Material und Methoden

	dCTP 100mM	Fermentas, St. Leon-Rot, D
	dTTP 100mM	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Primer:	siehe 2.5.3	Metabion, Martinsried, D

Agarosegelelektrophorese

Biozym LE Agarose		Biozym, Hess. Oldendorf, D
TBE Puffer:	Tris Ultra Qualität	Roth, Karlsruhe, D
	Borsäure	Roth, Karlsruhe, D
	EDTA Disodium Salt	Calbiochem, Darmstadt, D
Ethidiumbromid, 10mg/ml Stammlösung		Roth, Karlsruhe, D
1 Kb Plus DNA Ladder		Invitrogen, Karlsruhe, D

Zellkultur

Zelllinien: siehe 2.4.1.

Reverse Transkription

Random Primer	Invitrogen, Karlsruhe, D
M-MLV Reverse Transcriptase 5x Reaction Buffer	Promega, Madison, USA
dNTP Mix	Fermentas, St. Leon-Rot, D
RNase freies Wasser	

Real Time quantitative Polymerase Kettenreaktion

LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche, Indianapolis, USA
FastStart Taq DNA Polymerase	
Reaction Mix SYBR Green I, 10x conc (enthält dNTP Mix, Reaktions-Puffer und SYBR Green I Farbstoff)	
MgCl ₂ stock solution, 25mM	
H ₂ O, PCR-grade	
Primer: siehe 2.5.3	Metabion, Martinsried, D
Kalibrator	

2.2.2 Enzyme

Proteinase K (600mAnson-U/ml)	Merck, Darmstadt, D
-------------------------------	---------------------

GoTaq® DNA Polymerase	Promega, Madison, USA
RNAasin	Promega, Madison, USA
M-MLV Reverse Transcriptase, RNase H Minus	Promega, Madison, USA

2.2.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Die folgenden Geräte wurden verwendet:

Zentrifugen	Biofuge pico KENDRO Heraeus MinizentrifugeDW-41BR-230 Qualitron Inc.
Vortex	MS2 Minishaker IKA®
Thermocycler	T Gradient Biometra T1 Thermocycler Biometra
UV-Photometer	GeneRay Biometra
Präzisionsküvette	Präzisionsküvette aus Quarzglas, Typ 105.210-QS Suprasil
Pipetten	Eppendorf reference
Waage	CP 4202 S Sartorius
Gelkammer	Horizon® 20·25 Life technologies
Mikrowelle	8020 Privileg
Kühlschrank	Liebherr Premium
UV-Transluminator	Gel print 200i MWG Biotech
LightCycler®	LightCycler® Roche

Material und Methoden

Sterile Bank	Hera safe Kendro, Langenselbold
Brutschrank	Hera cell 150 Kendro, Langenselbold

Die folgenden Verbrauchsmaterialien wurden verwendet

Handschuhe	Peha soft Powderfree	Hartmann
Pipettenspitzen	Biosphere® Filter Tips	Sarstedt, Nümbrecht, D
Eppendorfcups	Reaktionsgefäße 1,5ml DNA, DNase, RNase-frei	Biozym, Hess. Oldendorf, D
Minitubes	PCR-Softstrips 0,2ml <ul style="list-style-type: none"> • Mit Cap-Strip • Mit einzeln anhängenden Deckeln 	Biozym, Hess. Oldendorf, D
Realtime PCR Kapillaren	LightCycler® Capillaries (20µl)	Roche, Indianapolis, USA
Falcons	Cellstar® PP-Test-tubes	Greiner bio-one, Frickenhausen, D

2.2.4 Software

Textverarbeitung	Microsoft Word 2007
Datenverwaltung	Microsoft Excel
Statistik	Microsoft Excel SPSS Inc, PASW Statistics 18 MedCalc statistical software

2.3 SNP-Analyse

2.3.1 DNA-Isolierung aus Blut und aus Zelllinien

Zur Isolierung von DNA aus EDTA Blut wurden im ersten Schritt 100µl EDTA Blut mit 300µl Lysispuffer suspendiert und bei 13000 Umdrehungen pro Minute eine Minute lang zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Vorgang so oft wiederholt, bis der Überstand klar war.

Im zweiten Schritt wurde das so gewonnene Pellet in 50µl PCR-Puffer mit Tween® 20 resuspendiert und nach Zugabe von 15µl Proteinase K bei 50°C über Nacht (etwa 14 Stunden) inkubiert. Letztendlich folgte die Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 95°C für 10 Minuten. Die DNA wurde dann mittels UV Photometer gemessen und auf 50ng/µl verdünnt.

Für die Isolierung von DNA aus Zelllinien wurden zunächst die Zellen vom Flaschenboden und aus dem Zellverband gelöst. Dazu wurden nach Absaugen des Mediums 5ml PBS in die Flasche gegeben und gleich wieder abgesaugt. Als nächstes wurden 3ml Accutase zugegeben, die nach 5- bis 10-minütiger Inkubation im Brutschrank bei 37°C mit 5ml Medium abgestoppt wurde. Die so gewonnene Zellsuspension wurde anschließend in ein Falcon überführt und bei 770 rpm 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde nun in 100µl PBS resuspendiert und mit 300µl Lysispuffer versetzt. Von nun an wurde wie für die DNA-Isolierung aus EDTA Blut beschrieben verfahren, um die DNA aus den Zellen zu gewinnen.

2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion

1985 erfand Kary Mullis (*28.12.1944) eine Methode zur Vervielfältigung von DNA mittels des Enzyms DNA Polymerase. Acht Jahre später wurde dem US-amerikanischen Biochemiker für diese Leistung der Nobelpreis für Chemie verliehen (Mullis 2012).

Durch den Ersatz der anfangs verwendeten, aus *Escherichia coli* gewonnenen Polymerase, durch eine thermostabile Polymerase, die aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen wird und auch bei Temperaturen um 100°C ihre Enzymaktivität beibehält, wurde die Methode wesentlich vereinfacht und konnte schließlich automatisiert werden.

Heute werden synthetisch hergestellte Oligonukleotide mit einer Länge von 15-30 Basenpaaren als Primer verwendet. Die Primer sind zu Sequenzen der DNA komplementär, die vor und hinter dem jeweils zu vervielfältigenden Abschnitt der DNA liegen. Eine schematische Darstellung der verwendeten Tetra Primer PCR zeigt Abb. 4.

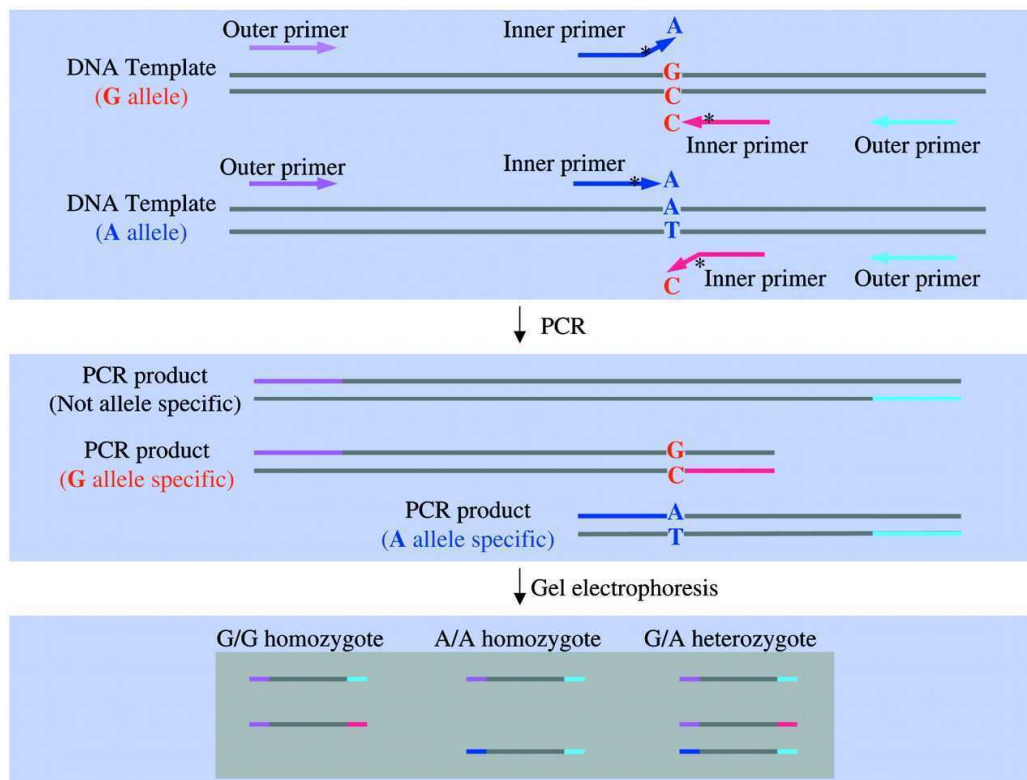


Abb.4 Schematische Darstellung der Tetraprimer PCR (Ye et al. 2001). Der SNP in diesem Beispiel führt zu einem Austausch von G zu A. Durch die Verwendung von zwei Primerpaaren werden allelspezifische Amplifikate erzeugt. Ein Primerpaar (violette und pinke Pfeile) bildet ein Amplifikat mit dem G-Allel, das andere Primerpaar (türkise und blaue Pfeile) eines mit dem A-Allel. Die Allelspezifität entsteht durch ein Missmatch zwischen der DNA-Matrize und der 3'-terminalen Base des inneren Primers und wird durch ein zweites Mismatch (*) an Position -2 vom 3'-Ende aus erhöht, G= Guanin, A= Adenin


Nach einer primären Denaturierungsphase von einigen Minuten bei 94°C, in der die beiden komplementären DNA-Stränge voneinander getrennt werden, folgt die eigentliche Kettenreaktion, bei der die Vervielfältigung der DNA stattfindet.

Auf eine erneute Denaturierungsphase von 30 Sekunden Dauer bei 94°C folgt im zweiten Schritt die Anlagerung der spezifischen Primer an die DNA (Hybridisierung/annealing). Dazu werden die Proben für 30 Sekunden auf die dafür optimale Temperatur, die empirisch zu ermitteln ist und meist zwischen 55 und 65°C liegt, heruntergekühlt. Die Temperatur ist abhängig von der Länge der Primersequenzen. Zu niedrige Temperaturen führen zu unspezifischer Anlagerung und zu unerwünschten PCR Produkten, zu hohe Temperaturen können eine Hybridisierung auf Grund zu hoher thermischer Bewegung der Primer ganz verhindern. Nach der Anlagerung der Primer beginnt die Phase der Elongation. Dafür wird die Temperatur für eine Minute auf 72°C angehoben, um optimale Bedingungen für den Einbau der dNTPs durch die thermostabile Polymerase zu schaffen.

Dieser Zyklus von Denaturierung, Hybridisierung und Elongation wird mehrmals wiederholt, wobei die initiale Denaturierungsphase nicht wiederholt wird.

Nach der entsprechenden Anzahl von Zyklen folgt noch eine abschließende Elongation von 5 Minuten bei 72°C. Werden die Proben nicht sofort aus dem Gerät entnommen, wird der Block auf 4°C gekühlt, sodass die Proben keinen Schaden nehmen und die Enzymaktivität gestoppt wird.

Tabelle 6 Standardprogramm einer PCR

PCR-Phase	Temperatur (°C)	Zeit	
Initiale Denaturierung	94	5-15 min	
Denaturierung	94	30 sek	 12-50 Zyklen
Hybridisierung	55-65	30 sek	
Elongation	72	60 sek	
Finale Elongation	72	5 min	
Stopp	4	∞	

Für die PCR wird ein Reaktionsansatz aus GoTaq Puffer, dNTP-Mix (aus gleichen Teilen dATP, dCTP, dGTP und dTTP; 10mM), den vier verschiedenen Primern für einen SNP (10µM) und GoTaq Enzym gemischt und in die Tubes vorgelegt. Alle Reagenzien, außer dem Enzym, werden vorher auf dem Vortex gemischt, um gleiche Konzentrationen der Inhaltsstoffe im gesamten Reagenzgemisch zu erreichen. Die als Matrize dienende DNA wird anschließend dazu pipettiert. Als Negativkontrolle dient ein Leerwert, der statt der DNA Wasser enthält und zum Ausschluss einer DNA-Kontamination eines der Reagenzien mitgeführt wird. Neben der Negativkontrolle und den unbekannten Proben wurde bei jeder PCR eine für den entsprechenden SNP bereits erfolgreich heterozygot getestete Probe als Positivkontrolle mitgeführt.

Alle Ansätze wurden auf Eis pipettiert, um einen vorzeitigen Start der Reaktion zu vermeiden. Die PCR erfolgte auf programmierbaren Thermocyclern mit beheizbaren Deckeln.

Alle PCRs wurden auf möglichst spezifische und hohe Ausbeute optimiert. Die optimalen Bedingungen (Annealingtemperatur, Zykluszahl) sind abhängig von der Sequenz, insbesondere vom CG-Gehalt der Primer und müssen für jeden SNP empirisch ermittelt werden. Zu diesem Zweck wurden Temperatur und Primerverhältnisse variiert. Die Zykluszahl wurde bei gutem Ergebnis möglichst gering gehalten, da hohe Zykluszahlen die Gefahr bergen, dass

anfänglich falsch eingebaute Nucleotide in weiteren Zyklen exponentiell vervielfältigt werden.

2.3.3 Agarosegelelektrophorese

In der Agarosegelelektrophorese können Nukleinsäurefragmente unterschiedlicher Länge im elektrischen Feld aufgetrennt werden, da sie aufgrund ihrer negativen Ladung zur Anode wandern. Agarose, ein pflanzliches Polysaccharid, geliert durch kochen und bildet eine netzartige Struktur, in der die Nukleinsäurefragmente gemäß ihrer Länge wandern.

Für unsere Studie wurde ein 1,5 %iges Agarosegel hergestellt, das 0,005 % Ethidiumbromid enthält. Die Herstellung erfolgte folgendermaßen:

Zunächst wurden 2,7 g Agarose (Biozym) in einem Erlenmeyerkolben abgewogen und mit 180 ml 1fach TBE Puffer versetzt. Diese Mischung wurde in der Mikrowelle vier Minuten erhitzt, bis sich die Agarose völlig aufgelöst hatte. Dann wurde das verdunstete Wasser mit destilliertem Wasser ersetzt und die Mischung noch einmal kurz erhitzt. Nun wurden 9,0 µl Ethidiumbromid dazugegeben und das Gel unter ständigem Schwenken langsam abgekühlt. Sobald das Gel ungefähr 60°C hatte wurde es in einen waagrecht stehenden Gelschlitten gegossen, in den Kämme zur Aussparung der Taschen eingehängt waren. Sobald das Gel völlig ausgehärtet ist, kann es mit dem Schlitten in eine mit 1fach TBE gefüllte Gelkammer gestellt werden und die Taschen können mit den Proben aus der PCR und einem Längensstandard (1kb Ladder) zur Bestimmung der Fragmentlängen beladen werden. Der verwendete GoTaq Puffer enthält Glycerin, welches dafür sorgt, dass die Proben auf den Taschengrund absinken. Außerdem sind diesem Puffer zwei Farbstoffe beigelegt, die ebenfalls zur Anode wandern und so eine visuelle Kontrolle der zurückgelegten Laufstrecke ermöglichen. Es wurde eine Spannung von maximal 150 mA für etwa 45 Minuten an die Gelkammer angelegt. Sofort im Anschluss an die Elektrophorese wurden die aufgetrennten DNA-Fragmente auf einem UV-Transluminator sichtbar gemacht und fotografiert (Abb. 5).



Abb. 5 Foto einer Agarosegelelektrophorese für SNP rs3808351, HT ist die heterozygote Positivkontrolle, H₂O die Negativkontrolle. Die übrigen Ziffern bezeichnen einzelne Proben, links ist der Längensstandard zu sehen. Die Proben 45,46,50,3,4,5 und 8 sind hier homozygot GG (Fragmentlänge 196 bp), Probe 2 ist homozygot AA (Fragmentlänge 231 bp) und die Proben 47, 48, 1, 6, 9 und 10 sind heterozygot GA.

2.4 Genexpressionsanalyse

Zusätzlich zur qualitativen SNP-Analyse mittels PCR, wurden quantitative Analysen zur GPR30 Genexpression in ausgewählten Mammakarzinom Zelllinien durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die entsprechenden Zell-Linien in Kultur genommen und dann aus den Zellen in unter 2.3.2. beschriebener Weise DNA isoliert.

2.4.1 Zellkultur

Einen Überblick über die verwendeten Zelllinien und deren Charakteristika gibt Tabelle 7.

Tabelle 7 untersuchte Zelllinien und deren Charakteristika

Zelllinie	Charakteristika der Zelllinie
MCF7	Isoliert aus dem Pleurapunktat einer 69 Jahre alten Kaukasierin mit einem Adenokarzinom der Brust. Rezeptorpositiv.
BT474	Isoliert aus dem invasiv duktalem Mammakarzinom einer 60 Jahre alten Kaukasierin.
ZR751	Isoliert aus dem Aszites einer 63 Jahre alten Kaukasierin mit invasiv duktalem Mammakarzinom. Östrogenrezeptorpositiv.
MCF10a	Epitheliale nicht tumorigene Zellen aus dem Brustgewebe einer 36 Jahre alten Frau isoliert.
SKBR3	Isoliert aus dem Pleurapunktat einer 43 Jahre alten Kaukasierin mit einem Adenokarzinom der Brust. Her2/neu Überexpression.
MDAMB175	Isoliert aus dem Pleurapunktat einer 56 Jahre alten Schwarzen mit invasiv duktalem Mammakarzinom.
HS578T	Isoliert aus dem invasiv duktalem Mammakarzinom einer 74 Jahre alten Kaukasierin. Hormonrezeptornegativ.
MDAMB468	Isoliert aus dem Adenokarzinom der Brust einer 51 Jahre alten Schwarzen.
T47D	Isoliert aus dem Pleurapunktat einer 54 Jahre alten Frau mit invasiv duktalem Mammakarzinom. Rezeptorpositiv.
BT549	Isoliert aus dem invasiv duktalem Mammakarzinom einer 72 Jahre alten Kaukasierin.

2.4.2 Reverse Transkription

Für die Herstellung von cDNA (complementary DNA) aus isolierter RNA wurde die reverse Transkription durchgeführt. Durch die Verwendung von Zufalls-(Random-) Primern entstehen dabei verschieden lange cDNA Fragmente. Aus den im Reaktionsansatz befindlichen Trinukleotiden, dATP, dGTP, dCTP und dTTP, synthetisiert die Reverse Transkriptase die cDNA zwischen den angelagerten Primern in 5'-3' Richtung.

Zunächst wurde die RNA auf 1µg pro 9,2µl Wasser verdünnt. Für 1µg RNA wurde ein Mastermix aus 1,6µl Random Primern und 0,4µl RNAsin hergestellt. Die Mischung aus 2,0µl Mastermix und 9,2µl gelöster RNA wurde für 5 Minuten bei 70°C im Thermocycler inkubiert, um die RNA zu denaturieren. Anschließend wurden zu jeder Probe 8,8µl eines zweiten Mastermixes, bestehend aus 4µl MMLV-Puffer, 2µl dNTP-Mix, 0,4µl MMLV-Enzym und 2,4µl RNase freiem Wasser, zugegeben. Dieser Ansatz wurde bei einem Temperaturprogramm von zunächst 25°C für 10 Minuten und anschließend 48°C für 50 Minuten inkubiert, bei dem die cDNA synthetisiert wird. Schließlich wurde die Reaktion bei 70°C für 15 Minuten im Thermocycler gestoppt.

Zuletzt wurde der Ansatz von 20µl RT-Produkt auf 100µl Gesamtvolumen mit Wasser verdünnt, welches dann bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt wurde.

2.4.3 Real-Time quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Die mittels Reverser Transkription gewonnene cDNA wurde zur quantitativen Bestimmung der GPR30 Expression verwendet. Dafür wurde eine RT (Real-Time)-PCR durchgeführt.

Die Real Time PCR ist eine Methode, bei der beruhend auf dem herkömmlichen Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion, wie oben beschrieben, zusätzlich eine Quantifizierung der gewonnenen DNA durch Fluoreszenzmessung möglich ist. Die Fluoreszenz wird durch Farbstoffe, die sich an die doppelsträngige DNA binden/ in die DNA einlagern, erreicht und nimmt proportional mit der Menge der PCR Produkte zu. Sie wird in der exponentiellen Phase der PCR gemessen, die nur wenige Zyklen dauert, da nur hier optimale Reaktionsbedingungen vorliegen. Die mangelnde Spezifität der Fluoreszenzmessung, da nicht zwischen verschiedenen PCR Produkten unterschieden werden kann, wurde durch eine Schmelzkurvenanalyse ausgeglichen.

Im Ansatz wurde zunächst ein Mastermix aus 3,4µl Wasser, 0,6µl MgCl₂ stock solution, 0,5µl forward Primer (10µM) und 0,5µl reward Primer (10µM) sowie 1µl Fast Start DNA Master SYBR Green 10 X conc. pro Kapillare vorgelegt und je 4µl DNA Template dazu

pipettiert. Bei jedem Lauf wurde eine Negativkontrolle und ein Kalibrator mitgeführt. Der Kalibrator dient dazu, verschiedene Läufe eventuell später vergleichen zu können.

Die Kapillaren wurden dann kurz bei 3000rpm zentrifugiert und anschließend in den Light Cycler gegeben. Im Light Cycler können wieder drei Phasen unterschieden werden. In der ersten Phase findet die Denaturierung der DNA bei hoher Temperatur statt, in der zweiten Phase kommt es durch Abkühlung zur Anlagerung der spezifischen Primer und im dritten Schritt baut die DNA Polymerase die dNTPs, die im Ansatz enthalten sind, in 3'-5' Richtung an die Primer an.

Zu Beginn eines Laufes steht eine 15-minütige Phase der Denaturierung und am Ende steht die Schmelzkurvenanalyse. Bei letzterer wird die Temperatur langsam von 50°C auf 95°C erhöht und die DNA bei einer für das jeweilige Fragment spezifischen Schmelztemperatur denaturiert. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I wird dabei freigesetzt und eine Abnahme der Fluoreszenz wird registriert. Eine Unterscheidung zwischen spezifischen PCR Produkten und unspezifischen wird dadurch möglich.

2.5 Die untersuchten SNPs

Die drei SNPs, die in dieser Studie untersucht wurden, liegen alle auf dem Gen GPR30 und wurden mit Hilfe der Internetseiten www.genecards.org und <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP> identifiziert.

Bei der Auswahl wurde die mögliche biologische Relevanz besonders beachtet. Einer der drei SNPs liegt in der Promotorregion des Gens, einer in der 5' untranslatierten Region und der dritte SNP ist auf dem Exon 3, das die codierende Region des Gens beinhaltet, lokalisiert und führt zum Aminosäureaustausch Pro16Leu.

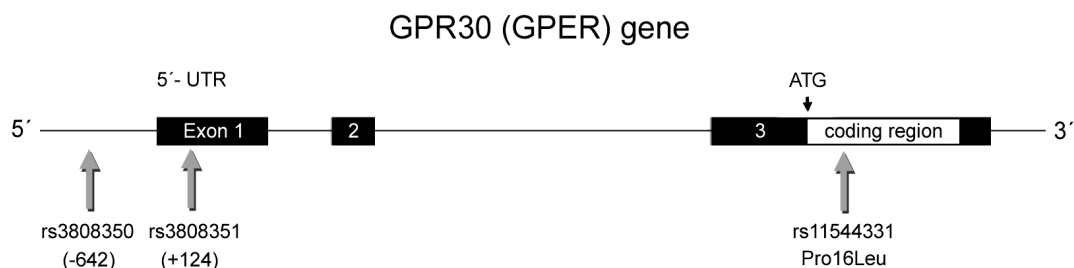


Abb. 6 Positionen der drei untersuchten SNPs im GPR30 Gen. Die Zahl in Klammern gibt die relative Position der beiden 5' SNPs zum Startpunkt der transkribierenden Region an. NCBI Referenz: NM_001039966.1. Die schwarzen Boxen stellen nichttranslatierte Regionen dar (UTR), die weiße Box die codierende Region. ATG ist der Beginn der translatierten Region.

2.5.1 SNP rs3808350

Allelspezifische PCR Produkte für SNP rs3808350 waren 205 / 295 bp (A/G). Überlieferte Genotypfrequenzen für eine nordamerikanische Population von knapp 100 Individuen mit nord- und westeuropäischen Vorfahren auf der Internetseite <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP> für SNP rs3808350 sind 0,433 (AA), 0,450 (AG) und 0,117 (GG). Allelfrequenzen werden auf der selben Internetseite mit 0,658 (A) und 0,342 (G) angegeben (National Center for Biotechnology Information 2009).

2.5.2 SNP rs3808351

Für SNP rs3808351 waren die spezifischen PCR Produkte 231 / 196 bp (A/G) und es werden Frequenzen für eine Analyse der gleichen Population wie für rs3808350 angegeben. Überlieferte Genotypfrequenzen sind 0,034 (AA), 0,466 (AG) und 0,5 (GG). Die Allelfrequenzen sind 0,267 (A) und 0,733 (G) (National Center for Biotechnology Information 2009).

2.5.3 SNP rs11544331

Für SNP rs11544331 waren die spezifischen PCR Produkte 198 / 237 bp (C/T). Genotypfrequenzen sind hier aus einer Cohorte von 200.000 Individuen aus dem Exome Sequencing Project bekannt. Die Frequenzen werden mit 0,650 (CC), 0,303 (CT) und 0,048 (TT) angegeben, die Allelfrequenzen mit 0,8 (C) und 0,2 (T) (National Center for Biotechnology Information 2009).

Tabelle 8 Verwendete Oligonukleotid-Primer für die SNP Genotypisierung mittels Tetra Primer PCR und die Größe der PCR-Produkte in basepairs

SNP	Primer- Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	PCR- Produkt
rs3808350	350-A	CTATTTTAAAGTGACATGTCGCA	205 bp
	350-G	ATAAAAATTCAAACCTTGAAATATCC	294 bp
	350-1	CAGTACAAGTTACTTACCCGCC	450 bp
	350-2	ATATGTACCTTTTTGTATTTGGATGATA	450 bp
rs3808351	351-G	GGCTTGGGGGGCCTCGCTATG	196 bp
	351-A	CGATGGCCGCCCATGAGTGT	231 bp
	351-1	CTCATACTCAGCGGACAAAGGATCACTCAGC	385 bp
	351-2	CTGCTCATGGTTGCGGATTTCACAGTCT	385 bp

Fortsetzung Tabelle 8

rs11544331	331-C	GGGCGTGGGCCTGGAGATGTAACC	198 bp
	331-T	CGCAGGCTGCGCGGTGCATA	237 bp
	331-1	AACAAACCCAACCCAAACCACACAGGT	391 bp
	331-2	AGCCGATGGGGAAGAGGAAGATGGTGTA	391 bp

2.6 Statistische Verfahren

Die Sammlung der Daten und die Auswertungstabellen wurden in Microsoft Excel erstellt.

2.6.1 Fall-Kontroll-Assoziationsstudien

In einer Fall-Kontroll-Assoziationsstudie wird untersucht, ob eine bestimmte Gensequenz-variante bei Trägern eines bestimmten Merkmals häufiger vorkommt, als in einer Kontrollgruppe von Nicht-Merkmalsträgern. Dazu wird die Genotypfrequenz in einer Gruppe von Merkmalsträgern mit der in einer Gruppe von Nicht-Merkmalsträgern verglichen. Die Nullhypothese H_0 besagt, dass der beobachtete Häufigkeitsunterschied der Genotypfrequenzen zwischen diesen beiden Gruppen zufallsbedingt ist. Die Alternativhypothese H_1 dagegen besagt, dass der beobachtete Unterschied auf einer statistischen Abhängigkeit der Gruppenzugehörigkeit und der Genotypfrequenz beruht.

2.6.2 Nullhypothese-Alternativhypothese

Die Nullhypothese besagt, dass das untersuchte Merkmal keinen Zusammenhang mit der untersuchten Zielgröße hat.

H₀: Die drei Polymorphismen im Gen GPR30, rs3808350, rs3808351 und rs11544331, haben alleine oder auch in ihrer Kombination keinen signifikanten Zusammenhang mit dem Auftreten eines Mammakarzinoms.

Die Alternativhypothese besagt, dass das untersuchte Merkmal und die untersuchte Zielgröße eine statistische Abhängigkeit zeigen.

H₁: Die drei Polymorphismen stehen alleine oder in Kombination in einem Zusammenhang mit dem Auftreten eines Mammakarzinoms. Bei zweiseitigem Test bedeutet dies, dass die Polymorphismen sowohl mit einem erhöhten Risiko für Brustkrebs einhergehen können, als auch mit einem erniedrigten Risiko.

2.6.3 Vierfeldertafel

Die Vierfeldertafel ist eine Spezialform der Kontingenztafel und bezeichnet eine Kreuztafel mit vier Feldern, in denen absolute Häufigkeiten einer Merkmalsausprägung aufgetragen werden. In dieser Studie betrifft dies das Vorhandensein des jeweils selteneren homozygoten Genotyps oder des heterozygoten Genotyps verglichen mit dem häufigeren homozygoten Genotyp und die Zugehörigkeit zu einer bestimmten Gruppe (z.B. Kontrollgruppe, Mammakarzinom, Tumorgroße <1). Die Auswertung der Vierfeldertafeln erfolgt mittels des Chi-Quadrat Testes oder mittels des exakten Testes nach Fisher.

2.6.4 Chi-Quadrat Test

Der Chi-Quadrat Test wird eingesetzt, um die stochastische Unabhängigkeit der beiden Merkmale in der Vierfeldertafel zu prüfen. Das Ergebnis wird meist als p-Wert wiedergegeben. Das Signifikanzniveau α für den p-Wert gibt die Wahrscheinlichkeit für einen α -Fehler an und wurde für diese Studie bei 0,05 festgesetzt. Das heißt, ist ein p-Wert $>0,05$ gilt er als nicht signifikant und die Nullhypothese kann nicht abgelehnt werden. Ein p-Wert $<0,05$ gilt als statistisch signifikant und die Nullhypothese kann abgelehnt werden.

Der Chi-Quadrat Test wird für große n verwendet, bei kleinen n (<5) gilt der exakte Test nach Fisher als Methode der Wahl.

2.6.5 Exakter Test nach Fisher

Der exakte Test nach Fisher entspricht in seiner Anwendung dem Chi-Quadrat Test und wird verwendet, wenn in der Vierfeldertafel ein oder mehrere $n < 5$ vorkommen. Dieser Test liefert auch bei solch kleinen Fallzahlen exakte Ergebnisse.

2.6.6 Odds Ratio und Konfidenzintervall

Die Odds Ratio, deutsch das Quotenverhältnis, ist eine Maßzahl, die etwas über das Assoziationsmaß zweier Merkmale aussagt. Anders, als das relative Risiko bezieht sich die Odds Ratio nicht auf Wahrscheinlichkeiten, sondern auf Quoten (Odds).

Die Berechnung der Odds Ratio für Vierfeldertafeln erfolgte nach der Formel: $OR = a \cdot d / b \cdot c$

Bei der Interpretation der Odds Ratio werden drei Fälle unterschieden:

- Odds Ratio = 1 : es gibt keinen Unterschied in den Odds
- Odds Ratio < 1 : die Odds der ersten Gruppe sind kleiner, als die der zweiten
- Odds Ratio > 1 : die Odds der ersten Gruppe sind größer, als die der zweiten

Das Konfidenzintervall CI 95% gibt den Bereich an, in dessen Grenzen sich die Odds Ratio zu 95 % Wahrscheinlichkeit befindet. Ist das Konfidenzintervall sehr groß, ist das ein Hinweis auf eine kleine Stichprobe, oder aber es wäre eine unrealistisch große Stichprobe notwendig, um ein Konfidenzintervall von akzeptabler Breite zu erreichen.

2.6.7 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Mit dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht werden Häufigkeiten verschiedener Allele eines Gens in der Population beschrieben. Es werden anhand der Allelfrequenzen die zu erwartenden Häufigkeiten der Genotypen berechnet, die nach Möglichkeit mit den experimentell ermittelten Häufigkeiten übereinstimmen sollten. Abweichungen von den errechneten Häufigkeiten können dabei vor allem durch kleine Stichprobengrößen hervorgerufen werden.

Zur Berechnung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes wurde die DeFinetti-Software verwendet, die auf der Homepage des Institutes für Humangenetik des Deutschen Forschungszentrums für Gesundheit und Umwelt zu finden ist (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>).

Das Signifikanzniveau α wurde bei 0,05 festgelegt, bei p-Werten kleiner 0,05 wurde also eine signifikante Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5% angenommen.

3. Ergebnisse

3.1 Analyse der GPR30 Polymorphismen

Für die Analyse der mittels PCR und Agarosegelelektrophorese gewonnenen Daten wurden die Häufigkeiten der Genotypen, der Allelfrequenzen, der Allelpositivität und auch der Haplotypen verglichen. Die Genotypenanalyse gliederte sich nochmals in die Analyse der homozygoten Genotypen und der heterozygoten Genotypen. Bei der Heterozygotenanalyse wurde jeweils der heterozygote mit dem häufigeren der beiden homozygoten Genotypen verglichen.

3.1.1 Mammakarzinom - Kontrollgruppe

Nach der PCR-Analyse der insgesamt 654 Proben, zusammengesetzt aus 257 Kaukasierinnen mit gesichertem, nicht familiären Brustkrebs, 247 Kaukasierinnen ohne jede Malignität, sowie 46 Frauen mit bekanntem Fibroadenom und 54 Frauen mit Mastopathie und zusätzlich einer Gruppe von 50 Frauen mit hereditärem Brustkrebs ohne BRCA1 oder BRCA2 Mutation, ergaben sich folgende Genotyp- und Allelfrequenzen für die drei untersuchten SNPs.

Tabelle 9 Genotyp- und Allelfrequenzen der drei untersuchten SNPs

SNP	Häufigerer homozygoter Genotyp		Seltenerer homozygoter Genotyp		Heterozygoter Genotyp		Häufigeres Allel		Selteneres Allel	
rs3808350	AA	0.39	GG	0.15	AG	0.46	A	0.62	G	0.38
rs3808351	GG	0.51	AA	0.09	GA	0.40	G	0.71	A	0.29
rs11544331	CC	0.56	TT	0.06	CT	0.38	C	0.75	T	0.25

Beim Vergleich der Mammakarzinomproben mit denen der Gesunden ergaben sich im Hinblick auf die homozygoten und heterozygoten Genotypen, sowie die Allelfrequenzen, Allelpositivität und Haplotypen für keinen der drei getesteten GPR30 SNPs signifikante Unterschiede (Tabelle 10).

Tabelle 10 Analyse der GPR30 SNP Frequenzen bei Frauen mit Brustkrebs und gesunden Kontrollen. Nachdem die Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht untersucht wurde, wurden Allelfrequenz, Allelpositivität und Genotypfrequenzen ermittelt. Die Odds Ratio wurde bestimmt, indem der häufigere Genotyp als Referenzgruppe fungierte

SNP rs3808350	Genotypfrequenz			Allelfrequenz		Allelpositivität	
	AA	GG	AG	A	G	A	G
Mammakarzinom (n=257)	0.39	0.14	0.47	0.63	0.37	0.86	0.53
Gesunde (n=247)	0.39	0.16	0.45	0.61	0.39	0.84	0.61
P		0.498	0.855		0.623		0.921
OR		1.2	0.97				
C.I. 95%		0.71-2.05	0.66-1.41				
SNP rs3808351	Genotypfrequenz			Allelfrequenz		Allelpositivität	
	GG	AA	GA	G	A	G	A
Mammakarzinom (n=255)	0.52	0.09	0.39	0.71	0.29	0.91	0.48
Gesunde (n=246)	0.53	0.11	0.36	0.71	0.29	0.89	0.47
P		0.561	0.658		0.823		0.47
OR		0.84	0.92				
C.I. 95%		0.46-1.52	0.63-1.34				
SNP rs11544331	Genotypfrequenz			Allelfrequenz		Allelpositivität	
	CC	TT	CT	C	T	C	T
Mammakarzinom (n=251)	0.58	0.07	0.35	0.76	0.24	0.93	0.42
Gesunde (n=246)	0.52	0.09	0.39	0.72	0.28	0.91	0.48
P		0.257	0.252		0.137		0.169
OR		1.48	1.24				
C.I. 95%		0.75-2.9	0.86-1.81				

n ist die Gesamtzahl der Proben in den jeweiligen Kategorien

Die Analyse der gewonnenen Genotyp- und Allelfrequenzen der Gruppe der hereditären Mammakarzinome ergab weder im Vergleich mit den Kontrollen, noch mit der Gruppe aller Frauen ohne Malignität ein statistisch signifikantes Ergebnis. Ebenso verhielt es sich bei den Mammakarzinompatientinnen verglichen mit den Frauen mit gutartigen Brusterkrankungen und allen Frauen ohne Malignität. Lediglich beim Vergleich der Mammakarzinompatientinnen mit den Mastopathiepatientinnen zeigte sich eine Assoziation mit SNP rs3808351. (Tabellen 11-16, im Anhang)

3.1.2 Assoziation der SNPs mit verschiedenen Tumorcharakteristika

Im Gegensatz zu den Ergebnissen beim Vergleich der Kontrollen mit den Mammakarzinomproben ergaben sich bei der Untersuchung der einzelnen Tumorcharakteristika einige signifikante Ergebnisse für die drei untersuchten GPR30 SNPs.

3.1.2.1 SNP rs3808350

Eine Übersicht über alle statistisch signifikanten Ergebnisse in der Analyse des Promotor-SNP rs3808350 gibt Tabelle 17.

Tabelle 17 Signifikante Ergebnisse für SNP rs3808350. Nachdem die Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht untersucht wurde, wurden Allelfrequenz, Allelpositivität und Genotypfrequenzen ermittelt. Die Odds Ratio wurde bestimmt, indem der häufigere Genotyp als Referenzgruppe fungierte

SNP rs3808350	Genotypfrequenz			Allelfrequenz		Allelpositivität	
	AA	GG	AG	A	G	A	G
PR neg (n=56)	0.32	0.02	0.66	0.65	0.35	0.98	0.86
PR pos (n=195)	0.42	0.27	0.41	0.62	0.38	0.83	0.58
p		0.025 ^{a,b}	0.024*		0.546		0.205
OR		0.13	0.48				
C.I. 95%		0.02-1.03	0.25-0.91				
PR neg (n=56)	0.32	0.02	0.66	0.65	0.35	0.98	0.86
PR und ER	0.42	0.17	0.41	0.62	0.38	0.88	0.58
pos (n=193)							
p		0.043 ^{a,b}	0.022*		0.596		0.186
OR		0.14	0.47				
C.I. 95%		0.02-1.06	0.25-0.9				
PR neg (n=56)	0.32	0.02	0.66	0.65	0.35	0.98	0.86
Gesunde (n=247)	0.39	0.16	0.45	0.61	0.39	0.84	0.61
p		0.026 ^{a,b}	0.695		0.449		0.348
OR		0.13	0.56				
C.I. 95%		0.02-1.03	0.3-1.05				
ER neg (n=36)	0.3	0.03	0.67	0.65	0.35	0.97	0.69
PR und ER	0.42	0.17	0.41	0.62	0.38	0.83	0.58
pos (n=193)							
p		0.126	0.039*		0.815		0.2
OR		0.24	0.45				
C.I. 95%		0.03-1.8	0.21-0.97				

* p<0.05

^a Wegen kleiner Probenzahl wurde der exakte Test nach Fisher angewendet

^b Chi Quadrat Test und Trend Test wurden durchgeführt und zeigten eine Assoziation zwischen den getesteten Gruppen, obwohl das Konfidenzintervall 1 mit einschloss

Ergebnisse

In der Homozygotenanalyse des Promotor-SNP rs3808350 zeigte sich der homozygote Genotyp GG deutlich seltener bei progesteronrezeptornegativem Brustkrebs als bei progesteronrezeptorpositivem (0.02 gegenüber 0.17, $p=0.025$ (exakt), $\chi^2=4.99$, $p(\text{trend})=0.013$) (Abb. 7).

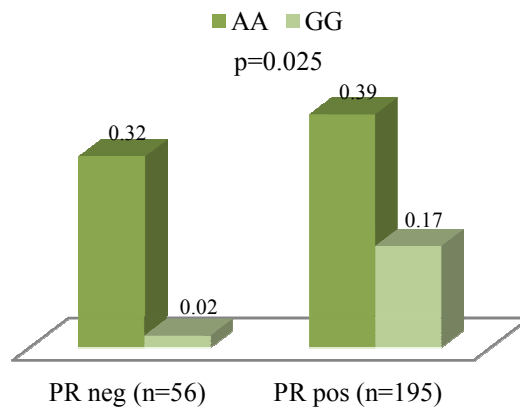


Abb. 7 SNP rs3808350 PR negativ versus PR positiv in der Homozygotenanalyse, n ist die Anzahl der Proben

Ebenso verhielt es sich im Vergleich mit den Proben von Frauen mit progesteron- und östrogenrezeptorpositivem Brustkrebs (0.17, $p=0.043$ (exakt), $\chi^2=4.81$, $p(\text{trend})=0.013$) (Abb. 8) oder den Proben aus der Kontrollgruppe (0.16, $p=0.026$ (exakt), $\chi^2=5.00$, $p(\text{trend})=0.042$) (Abb. 9).

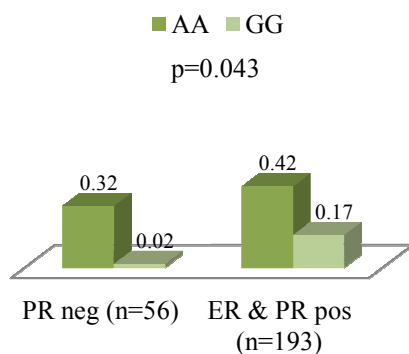


Abb. 8 SNP rs3808350 PR negativ versus ER & PR positiv in der Homozygotenanalyse, n ist die Anzahl der Proben

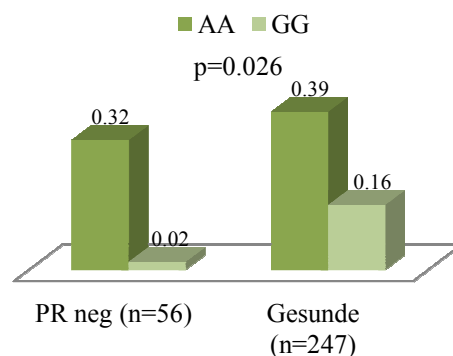


Abb. 9 SNP rs3808350 PR negativ versus Gesunde in der Homozygotenanalyse, n ist die Anzahl der Proben

In diesen Fällen schloss der CI 95% für die Odds Ratio 1 mit ein. Da jedoch der Chi-Quadrat Test, der Trend Test und auch der Exakte Test nach Fisher eine Assoziation anzeigten, konnte das weite Konfidenzintervall (CI 95%) als Effekt, der durch die kleine Gruppengröße hervorgerufen wurde, gewertet werden.

Ergebnisse

Bei Betrachtung der Heterozygotenanalyse fanden sich wesentlich höhere Frequenzen des heterozygoten Genotyps AG bei progesteronrezeptornegativem Brustkrebs (0.66) als bei progesteronrezeptorpositivem (0.41, $p=0.024$) (Abb. 10), wie auch bei progesteron- und östrogenrezeptorpositivem Brustkrebs (0.41, $p=0.022$) (Abb. 11).

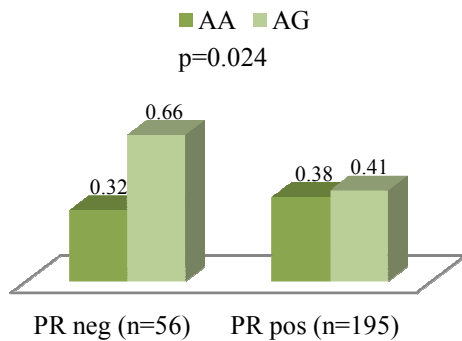


Abb. 10 SNP rs3808350 PR negativ versus PR positive in der Heterozygotenanalyse, n ist die Anzahl der Proben

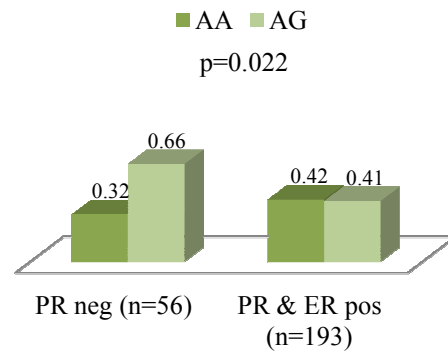


Abb. 11 SNP rs3808350 PR negativ versus PR & ER positive in der Heterozygotenanalyse, n ist die Anzahl der Proben

Dagegen gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Genotypfrequenzen der progesteronrezeptorpositiven Proben und denen der Kontrollgruppe ($p=0.979$ GG-AA und $p=0.454$ AG-GG).

Für den Östrogenrezeptorstatus zeigten sich ähnliche Ergebnisse. Der heterozygote Genotyp AG tauchte signifikant häufiger bei Frauen mit östrogenrezeptornegativem Brustkrebs (0.67) auf, als bei Frauen mit progesteron- und östrogenrezeptorpositivem Brustkrebs (0.41, $p=0.039$) (Abb. 12).

Bei der Analyse der östrogenrezeptorpositiven Proben zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zu den Vergleichsgruppen.

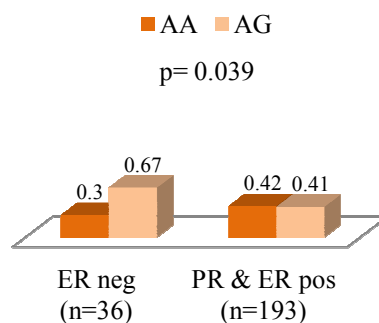


Abb. 12 SNP rs3808350 ER negativ versus PR & ER positiv in der Heterozygotenanalyse, n ist die Anzahl der Proben

Ergebnisse

Für die Tumorgroße, das histologische Grading, den Nodalstatus sowie den Her2/neu Rezeptorstatus konnte keine Assoziation mit diesem SNP gefunden werden.

Die Analyse der Allelfrequenz und –positivität erbrachte bei diesem GPR30 SNP für keines der Tumorcharakteristika signifikante Ergebnisse.

3.1.2.2 SNP rs3808351

Bei der Untersuchung des SNP rs3808351 in der 5' UTR Region fanden sich signifikante Werte für Assoziationen des SNP mit der Tumorgroße und dem histologischem Grading. Eine Übersicht gibt Tabelle 18.

Tabelle 18 Signifikante Ergebnisse für SNP rs3808351. Nachdem die Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht untersucht wurde, wurden Allelfrequenz, Allelpositivität und Genotypfrequenzen ermittelt. Die Odds Ratio wurde bestimmt, indem der häufigere Genotyp als Referenzgruppe fungierte

SNP rs3808351	Genotypfrequenz			Allelfrequenz		Allelpositivität	
	GG	AA	GA	G	A	G	A
T>1 (n=105)	0.64	0.07	0.29	0.79	0.21	0.93	0.36
T=1 (n=143)	0.43	0.12	0.45	0.66	0.34	0.88	0.57
p		0.04*	0.004**		0.002**		0.001**
OR		0.38	0.45				
C.I. 95%		0.15-0.98	0.26-0.78				
T>1 (n=105)	0.64	0.07	0.29	0.79	0.21	0.93	0.36
Gesunde (n=246)	0.53	0.11	0.36	0.71	0.29	0.89	0.47
p		0.101	0.138		0.032*		0.058
OR		0.49	0.71				
C.I. 95%		0.2-1.17	0.28-1.79				
T>1 (n=105)	0.64	0.07	0.29	0.79	0.21	0.93	0.36
Fibroadenom (n=36)	0.44	0.12	0.44	0.67	0.33	0.88	0.55
p		0.06	0.193		0.043*		0.042*
OR		0.46	0.42				
C.I. 95%		0.21-1.04	0.11-1.60				
T>1 (n=105)	0.64	0.07	0.29	0.79	0.21	0.93	0.36
Mastopathie (n=54)	0.39	0.04	0.57	0.68	0.32	0.96	0.61
p		0.912	0.001**		0.033*		0.003**
OR		0.91	0.31				
C.I. 95%		0.18-4.73	0.16-0.63				

* p<0.05, ** p>0.01, n ist die jeweilige Anzahl der Proben

Ergebnisse

Fortsetzung Tabelle 18

SNP rs3808351	Genotypfrequenz			Allelfrequenz		Allelpositivität	
	GG	AA	GA		GG	AA	GA
T>1 (n=105)	0.64	0.07	0.29	0.79	0.21	0.93	0.36
Nicht-Karzinom (n=336)	0.5	0.1	0.4	0.7	0.3	0.9	0.5
p		0.124	0.023*		0.014*		0.011*
OR		0.51	0.57				
C.I. 95%		0.22-1.21	0.35-0.93				
T=2 (n=85)	0.59	0.08	0.33	0.75	0.25	0.92	0.41
T=1 (n=143)	0.43	0.12	0.45	0.66	0.34	0.88	0.57
p		0.163	0.038*		0.032*		0.024*
OR		0.51	0.54				
C.I. 95%		0.20-1.33	0.30-0.97				
G3 (n=84)	0.62	0.04	0.34	0.79	0.21	0.96	0.38
G2 (n=136)	0.48	0.09	0.43	0.69	0.31	0.9	0.52
p		0.05	0.109		0.021*		0.042*
OR		0.29	0.63				
C.I. 95%		0.08-1.07	0.35-1.11				
G3 (n=84)	0.62	0.04	0.34	0.79	0.21	0.96	0.38
Gesunde (n=246)	0.53	0.11	0.36	0.71	0.29	0.89	0.47
p		0.026*	0.472		0.034*		0.149
OR		0.27	0.82				
C.I. 95%		0.08-0.92	0.49-1.4				
G3 (n=84)	0.62	0.04	0.34	0.79	0.21	0.96	0.38
Fibroadenom (n=36)	0.44	0.12	0.44	0.67	0.33	0.88	0.55
p		0.055	0.165		0.039*		0.077
OR		0.23	0.56				
C.I. 95%		0.05-1.14	0.24-1.28				
G3 (n=84)	0.62	0.04	0.34	0.79	0.21	0.96	0.38
Mastopathie (n=54)	0.39	0.04	0.57	0.68	0.32	0.96	0.61
p		0.594	0.007**		0.031*		0.008**
OR		0.61	0.38				
C.I. 95%		0.09-3.89	0.19-0.77				
G3 (n=84)	0.62	0.04	0.34	0.79	0.21	0.96	0.38
Nicht-Karzinom (n=336)	0.5	0.1	0.4	0.7	0.3	0.9	0.5
p		0.031* ^a	0.151		0.016*		0.045*
OR		0.28	0.69				
C.I. 95%		0.08-0.96	0.42-1.15				

* p<0.05, ** p<0.01, ^a Wegen kleiner Probenzahl wurde der exakte Test nach Fisher angewendet

Ergebnisse

Die Analyse der homozygoten Genotypen resultierte in deutlich niedrigeren Frequenzen für den Genotyp AA bei Proben von Frauen mit großen Tumoren, $T>1$, als bei Frauen mit kleinen Tumoren, $T=1$, (0.07 gegenüber 0.12, $p=0.04$) (Abb. 13).

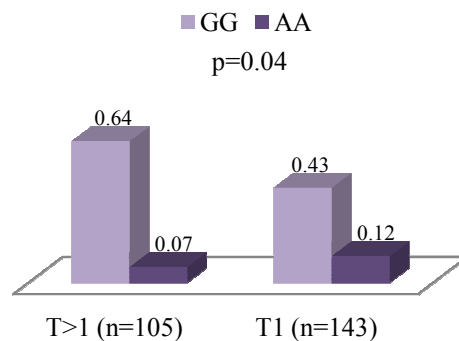


Abb. 13 SNP rs3808351 $T>1$ versus $T=1$ in der Homozygotenanalyse, n ist die Anzahl der Proben

In der Heterozygotenanalyse zeigte sich eine wesentlich geringere Frequenz des heterozygoten Genotyps AG bei Frauen mit großen Tumoren, $T>1$ (0.29), als bei $T=1$ (0.45, $p=0.004$) (Abb. 14), bei Frauen mit Mastopathie (0.57, $p=0.001$) (Abb. 15) und der Gruppe aller Nicht-Karzinom Proben (0.40, $p=0.023$) (Abb. 16). Außerdem fand sich der Genotyp AG signifikant seltener bei Frauen mit mittelgroßen Tumoren, $T=2$, als bei Frauen mit kleinen Tumoren, $T=1$, (0.33 gegenüber 0.45, $p=0.038$) (Abb. 17).

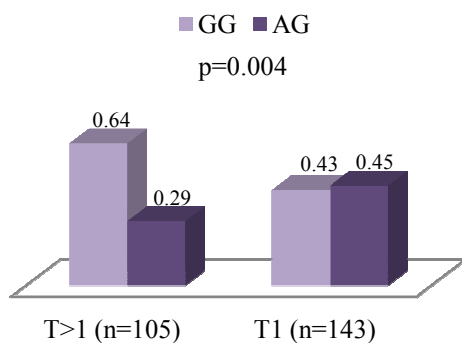


Abb. 14 SNP rs3808351 $T>1$ versus $T=1$ in der Heterozygotenanalyse, n ist die Anzahl der Proben

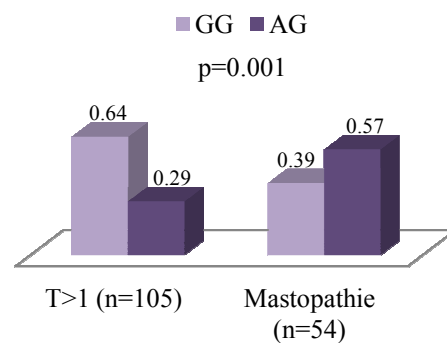


Abb. 15 SNP rs3808351 $T>1$ versus Mastopathie in der Heterozygotenanalyse, n ist die Anzahl der Proben

Ergebnisse

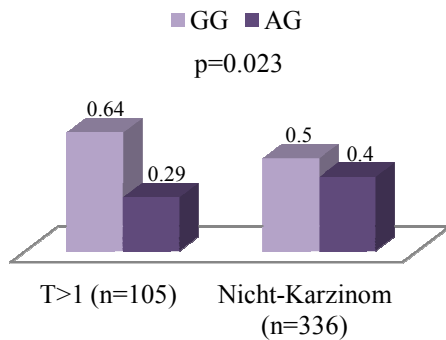


Abb. 16 SNP rs3808351 T>1 versus Nicht-Karzinom in der Heterozygotenanalyse, n ist die Anzahl der Proben

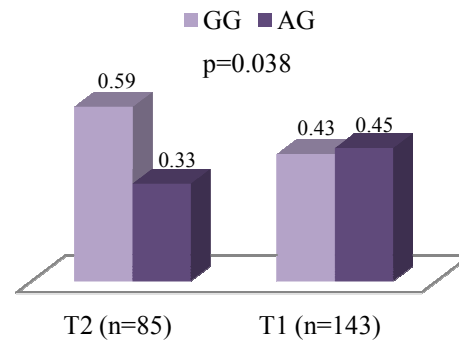


Abb. 17 SNP rs3808351 T2 versus T1 in der Heterozygotenanalyse, n ist die Anzahl der Proben

In der Analyse der Allelfrequenz und -positivität zeigte sich das A Allel bedeutend weniger häufig bei Frauen mit großen Tumoren, T>1 (AF: 0.21; AP: 0.36), als bei Frauen mit kleinen Tumoren, T=1 (AF: 0.34, p=0.002; AP: 0.57, p=0.001), in der Kontrollgruppe (AF: 0.29, p=0.032) und in allen anderen Vergleichsgruppen (Fibroadenom – AF: 0.33, p=0.043; AP: 0.55, p=0.045; Mastopathie - AF: 0.32, p= 0.033; AP: 0.61, p= 0.003 ; Nicht-Karzinom - AF: 0.30, p=0.014; AP: 0.50, p=0.011) (Abb. 18-22, die Ergebnisse der Allelpositivitätsanalyse sind nicht grafisch dargestellt.)

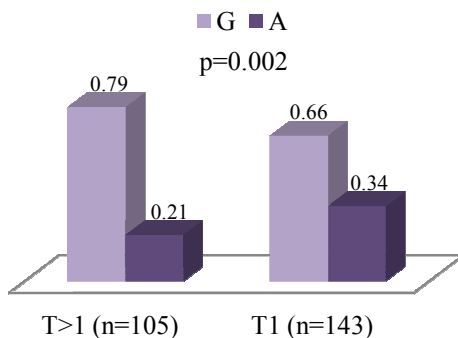


Abb. 18 SNP rs3808351 T>1 versus T1 in der Allelfrequenzanalyse, n ist die Anzahl der Proben

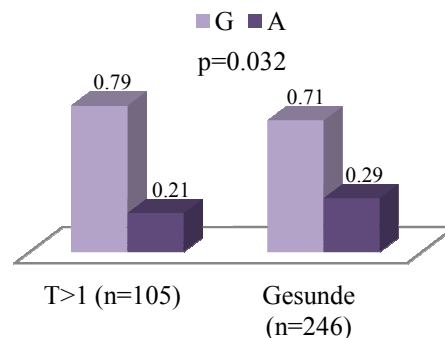


Abb. 19 SNP rs3808351 T>1 versus Gesunde in der Allelfrequenzanalyse, n ist die Anzahl der Proben

Ergebnisse

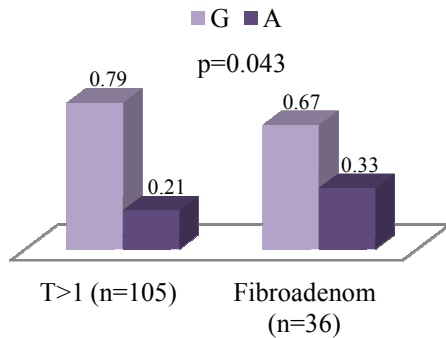


Abb. 20 SNP rs3808351 T>1 versus Fibroadenom in der Allelfrequenzanalyse, n ist die Anzahl der Proben

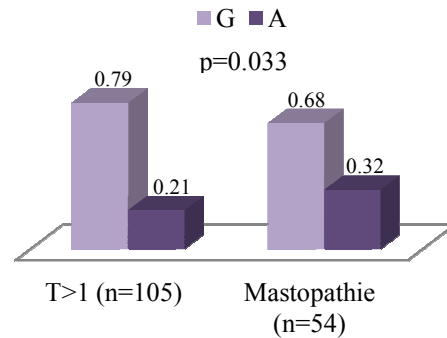


Abb. 21 SNP rs3808351 T>1 versus Mastopathie in der Allelfrequenzanalyse, n ist die Anzahl der Proben

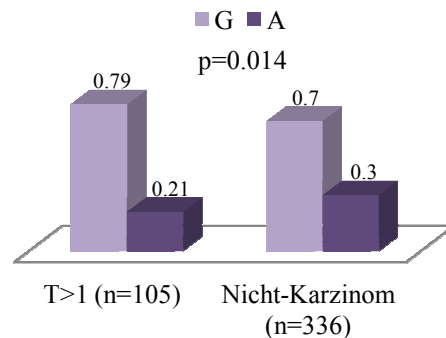


Abb. 22 SNP rs3808351 T>1 versus Nicht-Karzinom in der Allelfrequenzanalyse, n ist die Anzahl der Proben

Bei der Betrachtung des histologischen Gradings fand sich in der Homozygotenanalyse eine deutlich niedrigere Frequenz des Genotyps AA bei Frauen, deren Karzinom als G3 eingestuft wurde (0.04), als in der Kontrollgruppe (0.11, $p=0.026$) (Abb. 23) und als in der Gruppe aller Nicht-Karzinom Proben (0.1, $p=0.031$ (exakt)) (Abb. 24).

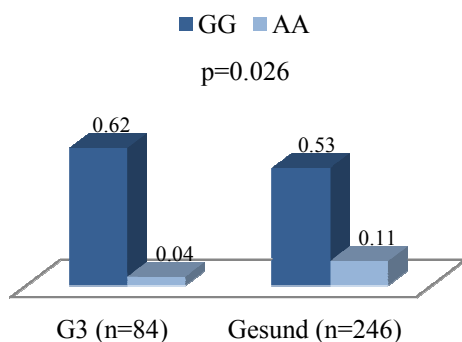


Abb. 23 SNP rs3808351 G3 versus Gesunde in der Homozygotenanalyse, n ist die Anzahl der Proben

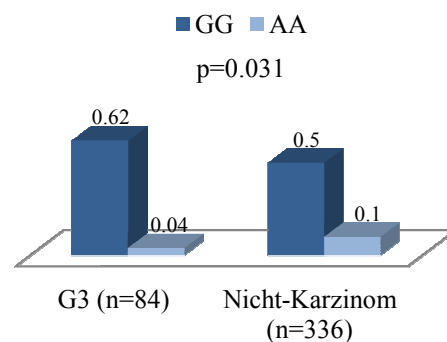


Abb. 24 SNP rs3808351 G3 versus Nicht-Karzinom in der Homozygotenanalyse, n ist die Anzahl der Proben

Ergebnisse

In der Heterozygotenanalyse war der heterozygote Genotyp AG signifikant seltener bei Frauen mit G3-Tumoren (0.35), als bei Frauen mit Mastopathie (0.57, $p=0.007$) (Abb. 25).

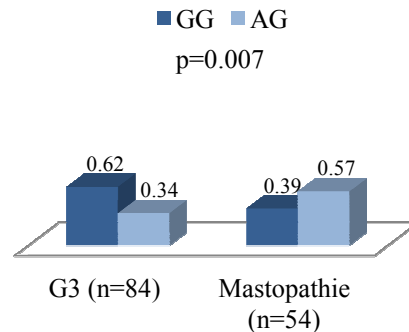


Abb. 25 SNP rs3808351 G3 versus Mastopathie in der Heterozygotenanalyse, n ist die Anzahl der Proben

Die Analyse der Allelfrequenz und -positivität bestätigte die Ergebnisse der Genotypanalyse. Das A Allel war bei Frauen mit G3 Tumoren wesentlich seltener (AF: 0.21, AP: 0.38), als bei Frauen mit G2 Tumoren (AF: 0.31, $p=0.021$; AP: 0.52, $p=0.042$), der Kontrollgruppe (AF: 0.29, $p=0.034$) und allen anderen Vergleichsgruppen (Fibroadenom – AF: 0.33, $p=0.039$; Mastopathie - AF: 0.32, $p=0.031$; AP: 0.61, $p=0.008$; Nicht-Karzinom - AF: 0.30, $p=0.016$; AP: 0.50, $p=0.045$) (Abb. 26-30, die Ergebnisse der Allelpositivitätsanalyse sind nicht grafisch dargestellt).

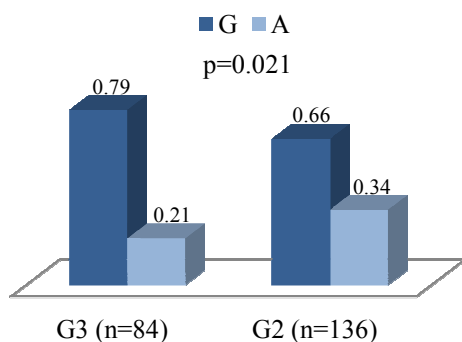


Abb. 26 SNP rs3808351 G3 versus G2 in der Allelfrequenzanalyse, n ist die Anzahl der Proben

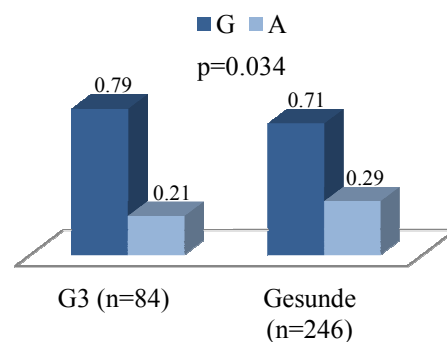


Abb. 27 SNP rs3808351 G3 versus Gesunde in der Allelfrequenzanalyse, n ist die Anzahl der Proben

Ergebnisse

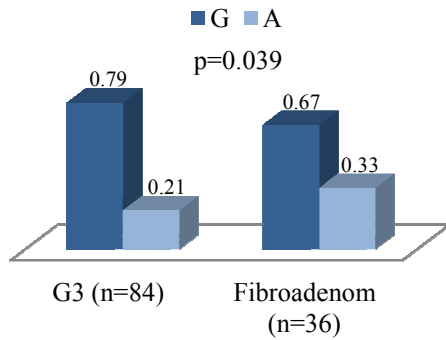


Abb. 28 SNP rs3808351 G3 versus Fibroadenom in der Allelfrequenzanalyse, n ist die Anzahl der Proben

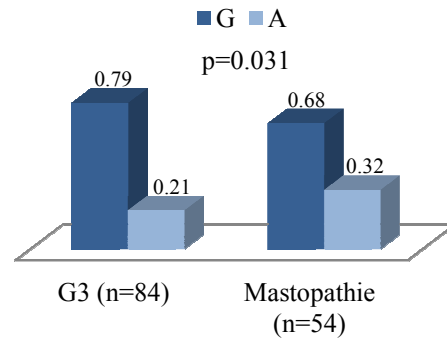


Abb. 29 SNP rs3808351 G3 versus Mastopathie in der Allelfrequenzanalyse, n ist die Anzahl der Proben

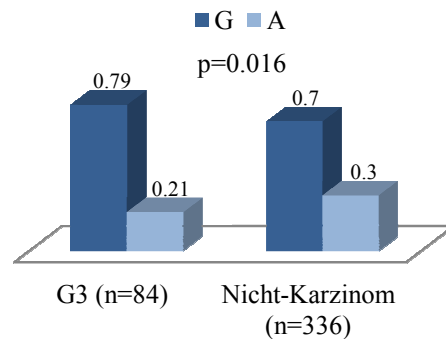


Abb. 30 SNP rs3808351 G3 versus Nicht-Karzinom in der Allelfrequenzanalyse, n ist die Anzahl der Proben

3.1.2.3 SNP rs11544331

Für den Missense-SNP rs11544331 wurden bei der Homozygotenanalyse keine signifikanten Ergebnisse beobachtet, in der Heterozygotenanalyse und der Auswertung der Allelfrequenzen und -positivität zeigte sich jedoch eine Assoziation mit dem Nodalstatus, dem histologischen Grading und dem Progesteronrezeptorstatus. Tabelle 19 zeigt die entsprechenden Daten.

Ergebnisse

Tabelle 19 Signifikante Ergebnisse für SNP rs11544331. Nachdem die Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht untersucht wurde, wurden Allelfrequenz, Allelpositivität und Genotypfrequenzen ermittelt. Die Odds Ratio wurde bestimmt, indem der häufigere Genotyp als Referenzgruppe fungierte

SNP rs11544331	Genotypfrequenz			Allelfrequenz		Allelpositivität	
	CC	TT	CT	C	T	C	T
N>0 (n=73)	0.68	0.05	0.26	0.82	0.18	0.95	0.32
N0 (n=155)	0.55	0.06	0.39	0.74	0.26	0.94	0.45
p		0.531	0.049* ^b		0.086		0.05*
OR		0.68	0.54				
C.I. 95%		0.2-2.28	0.29-1.0				
N>0 (n=73)	0.68	0.05	0.26	0.82	0.18	0.95	0.32
Gesunde (n=246)	0.52	0.09	0.39	0.72	0.28	0.91	0.48
p		0.17	0.023*		0.016*		0.013*
OR		0.47	0.51				
C.I. 95%		0.15-1.42	0.28-0.91				
N>0 (n=73)	0.68	0.05	0.26	0.82	0.18	0.95	0.32
Mastopathie (n=51)	0.51	0.02	0.47	0.75	0.25	0.98	0.49
p		0.514	0.022*		0.186		0.049*
OR		0.48	0.41				
C.I. 95%		0.05-4.53	0.19-0.89				
N>0 (n=73)	0.68	0.05	0.26	0.82	0.18	0.95	0.32
Nicht-Karzinom (n=332)	0.53	0.07	0.40	0.73	0.27	0.93	0.47
p		0.381	0.018*		0.033*		0.016*
OR		0.61	0.50				
C.I. 95%		0.20-1.85	0.28-0.89				
G2 (n=135)	0.64	0.04	0.32	0.80	0.20	0.96	0.36
Gesunde (n=246)	0.52	0.09	0.39	0.72	0.28	0.91	0.48
p		0.055	0.078		0.014*		0.028*
OR		0.41	0.67				
C.I. 95%		0.16-1.04	0.42-1.05				
G2 (n=135)	0.64	0.04	0.32	0.80	0.20	0.96	0.36
Nicht-Karzinom (n=332)	0.53	0.07	0.40	0.73	0.27	0.93	0.47
p		0.182	0.059		0.035*		0.035*
OR		0.53	0.66				
C.I. 95%		0.21-1.36	0.43-1.02				

* p<0.05

^b Chi Quadrat Test und Trend Test wurden durchgeführt und zeigten eine Assoziation zwischen den getesteten Gruppen, obwohl das Konfidenzintervall 1 mit einschloss

Ergebnisse

Fortsetzung Tabelle 19

SNP rs11544331	Genotypfrequenz			Allelfrequenz		Allelpositivität	
	CC	TT	CT		CC	TT	CT
PR niedrig (n=100)	0.65	0.06	0.29	0.8	0.2	0.94	0.35
Gesunde (n=246)	0.52	0.09	0.39	0.72	0.28	0.91	0.48
p		0.195	0.045*		0.031*		0.028*
OR		0.54	0.59				
C.I. 95%		0.21-1.39	0.36-0.99				
PR niedrig (n=100)	0.65	0.06	0.29	0.8	0.2	0.94	0.35
Mastopathie (n=51)	0.51	0.02	0.47	0.75	0.25	0.98	0.49
p		0.415	0.042*		0.324		0.096
OR		0.42	0.48				
C.I. 95%		0.05-3.63	0.24-0.98				
PR niedrig (n=100)	0.65	0.06	0.29	0.8	0.2	0.94	0.35
Nicht- Karzinom (n=332)	0.53	0.07	0.40	0.73	0.27	0.93	0.47
p		0.468	0.035*		0.066		0.034*
OR		0.70	0.59				
C.I. 95%		0.28-1.81	0.36-0.97				

* p<0.05

^b Chi Quadrat Test und Trend Test wurden durchgeführt und zeigten eine Assoziation zwischen den getesteten Gruppen, obwohl das Konfidenzintervall 1 mit einschloss

Der heterozygote Genotyp CT tauchte wesentlich seltener bei Frauen mit positivem Nodalstatus auf (0.26), als bei Frauen ohne jeden pathologischen Lymphknotenbefund (0.39, p=0.049, $\chi^2=3.85$, p(trend)=0.048, Chi-Quadrat Test und Trend-Test wurden durchgeführt, weil das Konfidenzintervall die 1 mit einschloss), bei Frauen aus der Kontrollgruppe (0.39, p=0.023) und den Gruppen Mastopathie (0.47, p=0.022) und Nicht-Karzinom (0.40, p=0.018) (Abb. 31-34).

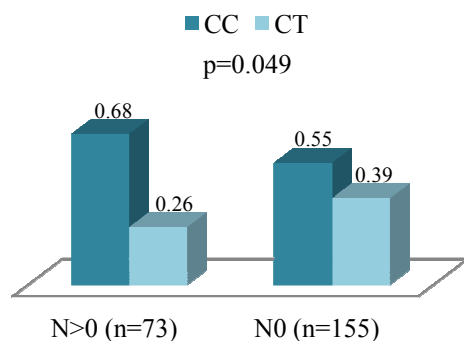


Abb. 31 SNP rs11544331 N>0 versus N0 in der Heterozygotenanalyse, n ist die Anzahl der Proben

Ergebnisse

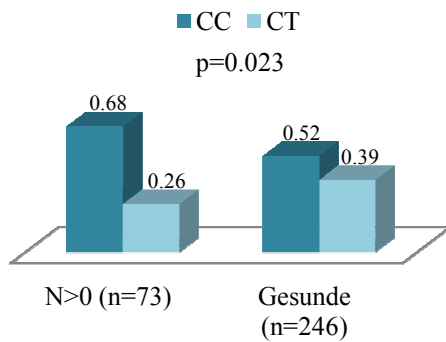


Abb. 32 SNP rs11544331 N>0 versus Gesunde in der Heterozygotenanalyse, n ist die Anzahl der Proben

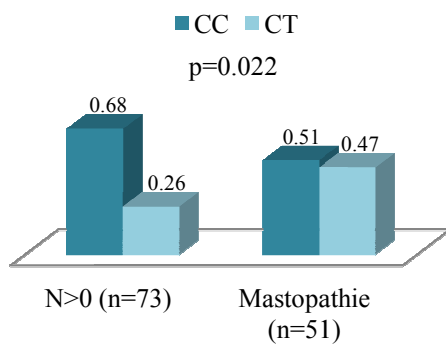


Abb. 33 SNP rs11544331 N>0 versus Mastopathie in der Heterozygotenanalyse, n ist die Anzahl der Proben

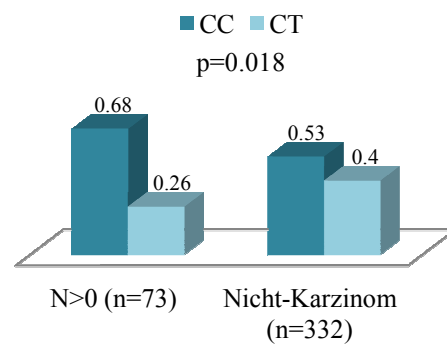


Abb. 34 SNP rs11544331 N>0 versus Nicht-Karzinom in der Heterozygotenanalyse, n ist die Anzahl der Proben

Bei der Allelfrequenz und -positivitätsanalyse zeigte sich das T Allel deutlich seltener bei Frauen mit positivem Nodalstatus (AF: 0.18, AP: 0.32), als bei gesunden Frauen der Kontrollgruppe (AF: 0.28, p=0.016; AP: 0.48, p=0.013) und bei der Nicht-Karzinom Gruppe (AF: 0.27, p=0.033; AP: 0.47, p=0.016), sowie in den Vergleichsgruppen mit negativem Nodalstatus (AP: 0.45, p=0.05) und Mastopathie (AP: 0.49, p=0.049) (Abb. 35 und 36, die Ergebnisse der Allelpositivitätsanalyse sind nicht grafisch dargestellt.)

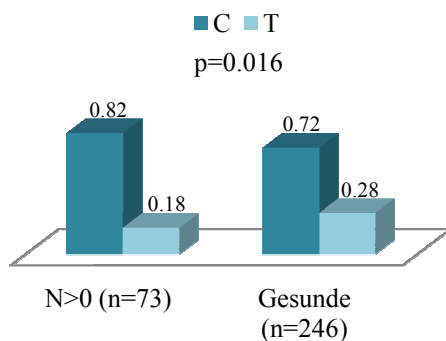


Abb. 35 SNP rs11544331 N>0 versus Gesunde in der Allelfrequenzanalyse, n ist die Anzahl der Proben

Ergebnisse

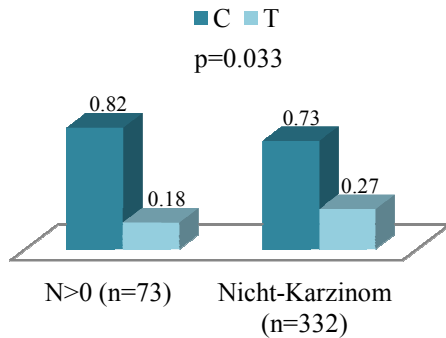


Abb. 36 SNP rs11544331 N>0 versus Nicht-Karzinom in der Allelfrequenzanalyse, n ist die Anzahl der Proben

Bei der Betrachtung des histologischen Gradings wies das T Allel bei Frauen mit G2-Tumoren eine bedeutend geringere Frequenz auf (AF: 0.20; AP: 0.36), als bei Gesunden Frauen (AF: 0.28, p=0.014; AP: 0.48, p=0.028) und bei Frauen der Nicht-Karzinom Gruppe (AF: 0.27, p=0.035; AP: 0.47, p=0.035). (Abb. 37 und 38, die Ergebnisse der Allelpositivitätsanalyse sind nicht grafisch dargestellt.)

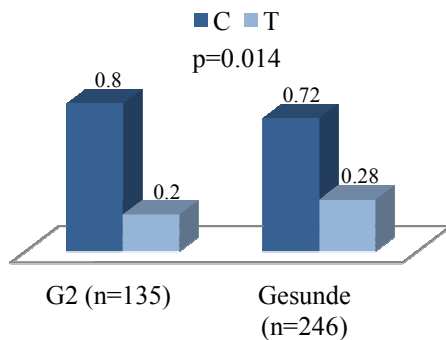


Abb. 37 SNP rs11544331 G2 versus Gesunde in der Allelfrequenzanalyse, n ist die Anzahl der Proben

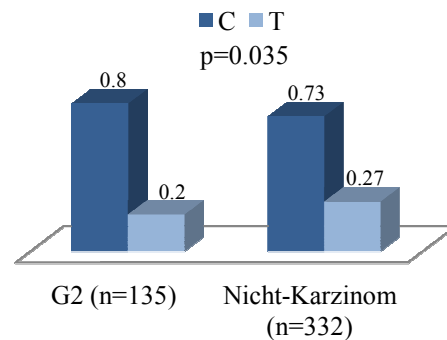


Abb. 38 SNP rs11544331 G2 versus Nicht-Karzinom in der Allelfrequenzanalyse, n ist die Anzahl der Proben

Bei der Analyse des Progesteronrezeptorstatus fand sich der heterozygote Genotyp CT deutlich weniger häufig bei Frauen mit geringer Progesteronrezeptorexpression ($PR \leq 4 - 0.29$), als bei der Kontrollgruppe (0.39, p=0.045) (Abb. 39), sowie den Vergleichsgruppen Mastopathie (0.47, p=0.042) (Abb. 40) und Nicht-Karzinom (0.40, p=0.035) (Abb. 41).

Ergebnisse

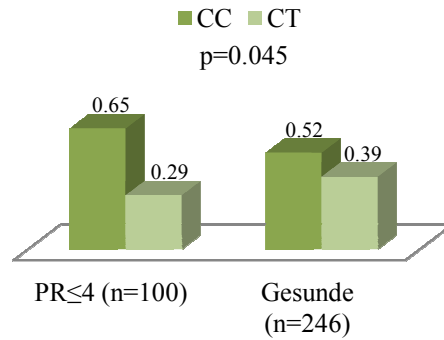


Abb. 39 SNP rs11544331 PR≤4 versus Gesunde in der Heterozygotenanalyse, n ist die Anzahl der Proben

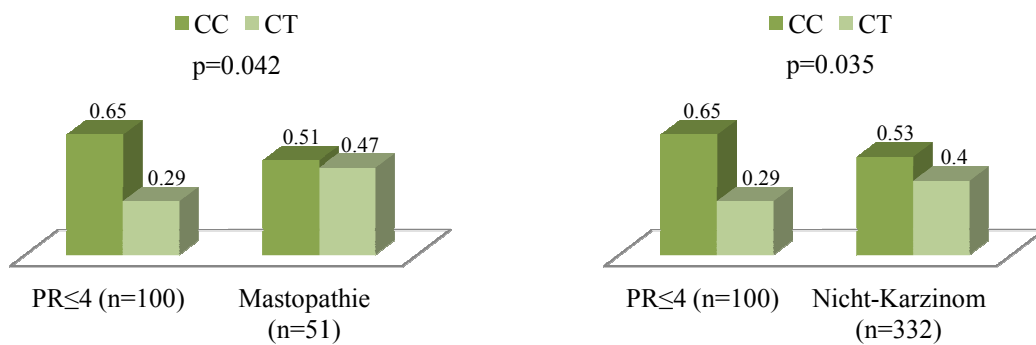


Abb. 40 SNP rs11544331 PR≤4 versus Mastopathie in der Heterozygotenanalyse, n ist die Anzahl der Proben

Abb. 41 SNP rs11544331 PR≤4 versus Nicht-Karzinom in der Heterozygotenanalyse, n ist die Anzahl der Proben

Das T Allel war auch in der Allelfrequenz und -positivitätsanalyse signifikant seltener bei Frauen mit geringer Progesteronrezeptorexpression zu finden (AF: 0.2; AP: 0.35), als bei der Kontrollgruppe (AF: 0.28, p=0.031; AP: 0.48, p=0.028) und der Gruppe aller Nicht-Karzinome (AP: 0.47, p=0.034) (Abb. 42, das Ergebnis der Allelpositivitätsanalyse ist nicht grafisch dargestellt).

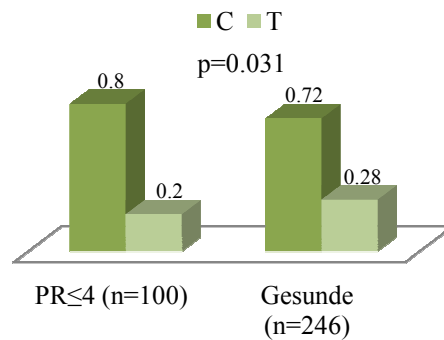


Abb. 42 SNP rs11544331 PR≤4 versus Gesunde in der Allelfrequenzanalyse, n ist die Anzahl der Proben

3.1.3 Haplotypenanalyse

In der Analyse der Haplotypen zeigte sich der Haplotyp AG-AG-CC (rs3808350: AG, rs3808351: AG, rs11544331: CC) mit insgesamt 18.6% am häufigsten, gefolgt vom Haplotypen AA-GG-CT mit 18.4% und AG-AG-CT mit 14.3%. Die Verteilung der sechs häufigsten Haplotypen in den verschiedenen Gruppen zeigt Tabelle 20.

Tabelle 20 Haplotypenverteilung der sechs häufigsten Haplotypen in den verschiedenen Gruppen

Haplotyp	Gesunde (n=245)	Fibroadenom (n=35)	Mastopathie (n=51)	Mammakarzi- nom (n=244)
AG-AG-CC (n=107)	0.163	0.171	0.255	0.197
AA-GG-CT (n=106)	0.204	0.143	0.196	0.168
AG-AG-CT (n=82)	0.118	0.171	0.255	0.139
AA-GG-CC (n=77)	0.114	0.2	0.118	0.148
GG-AA-CC (n=49)	0.094	0.086	0.04	0.086
AG-GG-CC (n=42)	0.073	0.086	0.02	0.082

n ist die Anzahl der Proben in den jeweiligen Kategorien

Die weitere statistische Auswertung beschränkte sich auf die drei häufigsten Haplotypen, wobei sich keine Assoziation mit einer der getesteten Gruppen zeigte.

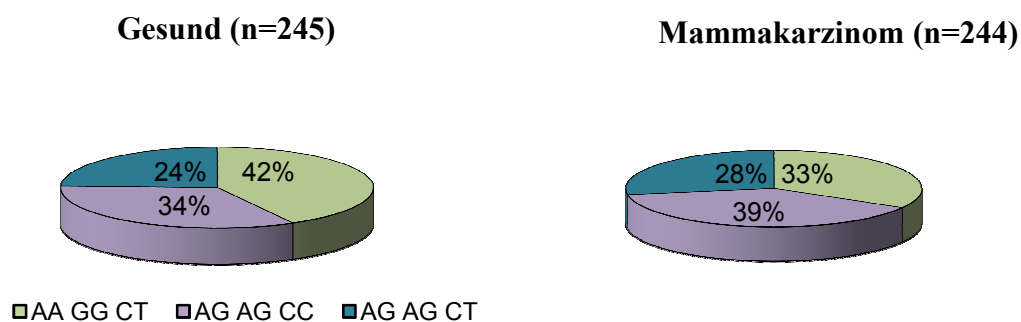


Abb. 43 Vergleich der drei häufigsten Haplotypen bei den Gesunden und den Mammakarzinompatientinnen, n ist die Anzahl der Proben

3.1.4 Genotypisierung von Mammakarzinom-Zelllinien

Wie für die einzelnen Proben der Mammakarzinompatientinnen und der Kontrollen wurde eine Genotypisierung von zehn Mammakarzinomzelllinien durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 21 dargestellt.

Tabelle 21 Genotypen der untersuchten Zelllinien für die drei SNPs

Zelllinie	SNP rs3808350	SNP rs3808351	SNP rs11544331
MCF7	AA	GG	CC
BT474	AG	GA	CT
ZR751	AG	GA	CT
MCF10a	AA	GG	CC
SKBR3	GG	GA	CC
MDAMB175	AA	GG	CC
HS578T	AG	GA	CC
MDAMB468	GG	AA	CC
T47D	AA	GG	CC
BT549	AG	AA	CT

Es wurde eine statistische Analyse der Genotyp- und Allelfrequenzen sowie der Allelpositivität der Mammakarzinomzelllinien im Vergleich mit den gesunden Kontrollen angeschlossen, wobei keine signifikanten Unterschiede zu beobachten waren (Tabelle 22).

Tabelle 22 Analyse der GPR30 SNP Frequenzen der Mammakarzinomzelllinien und der gesunden Kontrollen. Nachdem die Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht untersucht wurde, wurden Allelfrequenz, Allelpositivität und Genotypfrequenzen ermittelt. Die Odds Ratio wurde bestimmt, indem der häufigere Genotyp als Referenzgruppe fungierte

SNP rs3808350	Genotypfrequenz			Allelfrequenz		Allelpositivität	
	AA	GG	AG	A	G	A	G
Zelllinien (n=10)	0.40	0.20	0.40	0.60	0.40	0.80	0.60
Gesunde (n=247)	0.39	0.16	0.45	0.61	0.39	0.84	0.61
P		0.846	0.829		0.916		0.929
OR		0.84	0.86				
C.I. 95%		0.15-4.78	0.21-3.52				

SNP rs3808351	Genotypfrequenz			Allelfrequenz		Allelpositivität	
	GG	AA	GA	G	A	G	A
Zelllinien (n=10)	0.40	0.20	0.40	0.60	0.40	0.80	0.60
Gesunde (n=246)	0.53	0.11	0.36	0.71	0.29	0.89	0.47
P		0.332	0.586		0.303		0.425
OR		0.43	0.68				
C.I. 95%		0.08-2.47	0.17-2.78				

Ergebnisse

Fortsetzung Tabelle 22

SNP rs11544331	Genotypfrequenz			Allelfrequenz		Allelpositivität	
	CC	TT	CT	C	T	C	T
Zelllinien (n=10)	0.70	0	0.30	0.85	0.15	1	0.30
Gesunde (n=246)	0.52	0.09	0.39	0.72	0.28	0.91	0.48
P		0.275	0.421		0.189		0.265
OR		0.38	0.57				
C.I. 95%		0.02-6.90	0.14-2.26				

n ist die Anzahl der Proben in den jeweiligen Kategorien

3.2 Genexpressionsanalyse

In einem weiteren Schritt wurde mittels der Light Cycler PCR die Expression von sechs GPR30-Transkripten der Zelllinien im Vergleich zu einem Kalibrator gemessen. Dabei konnte eine unterschiedlich starke Expression von GPR30 in den verschiedenen Zelllinien festgestellt werden (Tabelle 23), eine Korrelation mit den Genotypen der drei GPR30 SNPs war jedoch nicht zu finden.

Tabelle 23 GPR30 Expression in den Mammakarzinomzelllinien im Vergleich zu einem Kalibrator

Zelllinienbezeichnung	Expression der GPR30- Transkripte 1 und 2 in %	Expression der GPR30- Transkripte 3-6 in %
MCF7	527.5	610.8
BT474	211.8	225.9
ZR751	75.6	89.9
MCF10a	43.6	43.9
SKBR3	14.3	29.5
MDAMB175	12.6	9.4
HS578T	6.7	8.6
MDAMB468	4.3	15.1
T47D	2.6	6.5
BT549	1.2	5.8
Kalibrator	100	100

Die GPR30 Expression des Kalibrators wurde auf 100% festgelegt und die Expression in den Zelllinien in Relation zur Expression des Kalibrators gesetzt.

4. Diskussion

Östrogene spielen bekanntermaßen eine entscheidende Rolle für das Wachstum von Brustgewebe und auch für die Entwicklung von Brustkrebs. Nachdem in verschiedenen Studien gezeigt werden konnte, dass GPR30 in den Östrogensignalweg involviert ist (Filardo et al. 2000, Kleuser et al. 2008, Pandey et al. 2009), scheint die Hypothese, dass Polymorphismen im GPR30 Gen die Prädisposition für Brustkrebs oder dessen Charakteristika beeinflussen können, sehr attraktiv.

In dieser Studie wurden erstmalig Allel- und Genotypfrequenzen dreier GPR30 SNPs in Brustkrebspatientinnen untersucht. Die Genotyp- und Allelfrequenzen, die wir in dieser Studie für die gesunde kaukasische Kontrollgruppe ermitteln konnten, stimmen mit denen, die im Rahmen des HapMap Projektes bei der Analyse einer nordamerikanischen Population von knapp 100 Individuen mit nord- und westeuropäischen Vorfahren für die SNPs rs3808350 und rs3808351 gefunden wurden, gut überein (National Center for Biotechnology Information 2009). Gleiches gilt für die Genotyp- und Allelfrequenzen einer Cohorte von 200.000 Individuen im Rahmen des Exome Sequencing Project für SNP rs11544331 (National Center for Biotechnology Information 2009).

4.1. Assoziation der SNPs mit dem Mammakarzinom

Beim Vergleich der Genotyp- und Allelfrequenzen der drei SNPs zwischen den Mammakarzinompatientinnen und der Kontrollgruppe, konnten in dieser Studie keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Für den Promotor SNP rs3808350 hat im Anschluss an die Veröffentlichung unseres Ergebnisses eine Studie aus Portugal an einer ähnlich großen Fallzahl ebenfalls die Assoziation mit Brustkrebs untersucht, konnte jedoch ebenso wenig einen statistisch relevanten Zusammenhang finden (Alves et al. 2010).

Die Analysen der gewonnenen Genotyp- und Allelfrequenzen der Mammakarzinompatientinnen im Vergleich mit den Gruppen der Frauen mit benignen Brusterkrankungen und der Gruppe aller Frauen ohne Malignität, sowie der Gruppe der hereditären Mammakarzinome im Vergleich mit den Kontrollen und der Gruppe aller Frauen ohne Malignität ergaben kein statistisch signifikantes Ergebnis. Derzeit existieren keine weiteren Studien, die sich mit diesem Thema beschäftigt haben.

4.2. Assoziation der untersuchten SNPs mit Tumorcharakteristika des Mammakarzinoms und deren Bedeutung

In dieser Studie wurde neben dem Zusammenhang zwischen GPR30 SNPs und dem Auftreten eines Mammakarzinoms auch deren Assoziation mit verschiedenen Tumorcharakteristika untersucht. Im Gegensatz zum Vergleich der genotypisierten Hauptgruppen, konnten wir bei der Analyse der klinisch-pathologischen Charakteristika der Karzinompatientinnen einige Tendenzen im Hinblick auf Tumorgröße, Grading, Nodalstatus, sowie den Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus finden.

In mehreren Studien wurde bisher eine Korrelation der GPR30 Expression mit der Überexpression von Her2/neu untersucht, wobei keine einheitlichen Ergebnisse gefunden wurden. Einige berichten von einer positiven Korrelation zwischen diesen beiden Parametern (Filardo et al. 2006), andere konnten diese Beobachtung nicht bestätigen (Kuo et al. 2007). In der vorliegenden Studie wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen den drei GPR30 SNPs und dem Her2/neu Status der Mammakarzinompatientinnen untersucht, es konnte jedoch keine statistisch signifikante Verbindung gezeigt werden.

4.2.1. Tumorgröße

Für die Untersuchung der Tumorgröße wurden die Mammakarzinompatientinnen in zwei Gruppen eingeteilt, eine Gruppe mit Tumoren unter zwei Zentimeter maximalem Durchmesser, also T=1 nach der aktuellen TNM Klassifikation, und eine Gruppe mit Tumoren über zwei Zentimeter Durchmesser, T>1. Außerdem wurde die Gruppe der T1 Tumoren mit einer weiteren Gruppe von Patientinnen mit T2 Tumoren, deren maximaler Durchmesser zwischen zwei und fünf Zentimeter beträgt, verglichen.

Eine Assoziation mit der Tumorgröße konnten wir für den 5' UTR SNP rs3808351 feststellen. Das A Allel dieses SNP war in Patientinnen mit großen Tumoren, die nach der TNM Klassifikation als T>1 eingestuft wurden, also größer als zwei Zentimeter waren, wesentlich seltener zu finden, als in Patientinnen, deren Tumore kleiner als zwei Zentimeter waren. Ebenso verhielt es sich im Vergleich mit gutartigen Brusterkrankungen und gesunden Kontrollen. Auch der heterozygote Genotyp AG und der homozygote Genotyp AA zeigten sich bei Frauen mit großen Tumoren seltener, als in den Vergleichsgruppen. In Einklang mit diesen Ergebnissen konnten sowohl das seltenere Allel A, als auch der heterozygote Genotyp

AG beim Vergleich zwischen T2 und T1 Tumoren bei den Patientinnen der T2 Gruppe seltener nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse zeigen einen möglichen protektiven Effekt des selteneren A Allels dieses SNP in Hinblick auf die Tumorgöße und unterstreichen die Rolle von GPR30 für die Tumorbilogie. Insbesondere ist hervorzuheben, dass diese Tendenz sowohl in den Genotyp- als auch in den Allelfrequenzanalysen kongruent war, was eine tatsächliche klinische Relevanz dieser Ergebnisse untermauert.

Frühere Studien berichten, dass die Tumorgöße direkt mit der Expression von GPR30 korreliert (Filardo et al. 2006), allerdings konnten wir keinen Zusammenhang zwischen diesem Allel und dem Expressionslevel von GPR30 in den getesteten Mammakarzinomzelllinien feststellen, was den gezeigten Zusammenhang zwischen dem untersuchten SNP und der Tumorgöße weiter untermauern würde.

4.2.2. Grading

Zur Analyse des Grading wurde eine Gruppe mit G2 Tumoren, und eine mit G3 Tumoren gebildet, was einer Unterscheidung zwischen mittelgradig und geringgradig differenzierten Tumoren entspricht.

Wie schon für die Tumorgöße, fand sich auch hier eine Assoziation des 5'UTR SNP rs3808351 mit dem Grading der getesteten Patientinnen. Hier konnte das A Allel bei Frauen mit G3 Tumoren, also eher schlecht differenzierten Tumoren, deutlich seltener nachgewiesen werden, als bei Frauen mit gutartigen Brusterkrankungen, oder Gesunden. Der heterozygote Genotyp AG zeigte sich ebenfalls seltener bei Frauen mit G3 Tumoren. Auch in Bezug auf das Grading kann hier also ein günstiger Effekt des selteneren Allels vermutet werden.

Bei der Betrachtung des Missense-SNP rs11544331 fiel ebenfalls eine Verbindung mit dem Grading auf. Das seltenere T Allel war in diesem Fall bei Frauen mit mittelgradig differenzierten Tumoren, G2, seltener, als bei den gesunden Kontrollen und der Gruppe aller Frauen ohne Malignität. In diesem Fall könnte ebenfalls ein schützender Einfluss des selteneren Allels auf das Grading unterstellt werden.

Ein Zusammenhang zwischen GPR30 und dem Grading wurde bisher in keiner anderen Studie gezeigt, Filardo et al. fanden keine Korrelation zwischen der GPR30 Expression und dem Grading (Filardo et al. 2006).

Für den Promotor SNP rs3808350 konnte in der vorliegenden Studie keine Assoziation mit dem Grading nachgewiesen werden, in diesem Punkt stimmen unsere Ergebnisse mit der später veröffentlichten portugiesischen Studie zu diesem Thema überein (Alves et al. 2010).

4.2.3. Nodalstatus

Im Hinblick auf die nodale Metastasierung wurde eine Unterscheidung zwischen Frauen ohne befallene Lymphknoten und Frauen mit befallenen Lymphknoten getroffen, wobei keine weitere Aufteilung nach der Menge der metastasierten Lymphknoten erfolgte.

Es konnte eine Assoziation des Nodalstatus mit dem Missense-SNP rs11544331 gefunden werden. Das seltenere T Allel war in der Gruppe der Patientinnen mit befallenen Lymphknoten weniger häufig, als in der Gruppe ohne Lymphknotenmetastasen, in der Kontrollgruppe, sowie bei Patientinnen mit Mastopathie und der Gruppe aller Frauen ohne Malignität. Auch bei der Analyse der Genotypfrequenzen, war der heterozygote Genotyp CT in Frauen mit positivem Lymphknotenstatus seltener anzutreffen, als in allen diesen Vergleichsgruppen. Es zeigte sich also ein stimmiges Bild für diese Assoziation und eine Verminderung des Risikos für befallene Lymphknoten könnte daher mit dem T Allel dieses SNP in Verbindung stehen.

Es wurden bereits früher verschiedene Tumorcharakteristika mit der GPR30 Expression in Zusammenhang gebracht (Filardo et al. 2006). In der genannten Studie wurde neben der Assoziation mit Fernmetastasen, vor allem eine positive Korrelation der GPR30 Expression mit der Tumorgröße beschrieben. Obwohl die Tumorgröße selbst ein prognostischer Faktor für das Auftreten von Lymphknotenmetastasen ist (Ravdin et al. 1994, Silverstein et al. 2001), konnte bisher kein direkter statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen GPR30 Expression und Lymphknotenbefall gezeigt werden (Filardo et al. 2006).

4.2.4. Östrogenrezeptorstatus

Gerade die Rolle von GPR30 als Östrogenrezeptor neben den klassischen Östrogenrezeptoren ER α und - β hat in den vergangenen Jahren die Aufmerksamkeit auf diesen Rezeptor gelenkt. In verschiedenen Studien wurde daraufhin eine mögliche Korrelation oder auch Kommunikation zwischen diesen Rezeptoren untersucht (Filardo et al. 2006, Kuo et al. 2007, Notas et al. 2011).

Um die Assoziation des Östrogenrezeptorstatus mit den untersuchten GPR30 SNPs zu testen, wurden die Mammakarzinompatientinnen, wie auch für die anderen Parameter, in Gruppen eingeteilt. Die Östrogenrezeptorpositivität für die Patientinnen war nach dem Immunreaktiven Score (IRS) angegeben. Es wurde eine östrogenrezeptorpositive Gruppe und eine östrogenrezeptornegative Gruppe gebildet, wobei als negativ nur die Proben mit IRS 0 gewertet wurden. Diese Gruppierung bezieht sich auf die Einschätzung des internationalen St. Gallen Konsensus, der entgegen der vorher üblichen Grenze von IRS>2 jede immunhistochemisch nachweisbare endokrine Ansprechbarkeit des Tumors als Indikator für eine endokrine Therapie empfiehlt (Goldhirsch et al. 2009).

Dabei konnten wir lediglich für den Promotor SNP rs3808350 eine statistische Assoziation mit dem Östrogenrezeptorstatus finden. Der heterozygote Genotyp AG fand sich bei Patientinnen mit östrogenrezeptornegativem Brustkrebs häufiger als bei Frauen mit östrogenrezeptor- und progesteronrezeptorpositivem Brustkrebs. In der Allelfrequenz und – positivität zeigte sich jedoch keine Korrelation, so dass dieses Ergebnis eher zurückhaltend zu bewerten ist.

Alves et al. konnten ebenfalls keinen Zusammenhang dieses SNP mit dem Östrogenrezeptorstatus nachweisen (Alves et al. 2010).

4.2.5. Progesteronrezeptorstatus

Die Expression von Progesteronrezeptoren ist eng verknüpft mit der Expression von Östrogenrezeptoren, ist jedoch unabhängig von letzteren mit dem krankheitsfreien Überleben sowie dem Gesamtüberleben assoziiert (Bardou et al. 2003) und scheint Einfluss auf die Wirksamkeit einer Antiöstrogentherapie zu haben (Liu et al. 2010). Eine Studie an knapp 6000 Mammakarzinompatientinnen konnte bei 75% östrogenrezeptorpositiver Karzinome, 55% östrogenrezeptor- und progesteronrezeptorpositiver Karzinome und 20% östrogenrezeptorpositiver und progesteronrezeptornegativer Tumoren, keinen östrogenrezeptornegativen und progesteronrezeptorpositiven Tumor finden (Nadji et al. 2005). Bei den Patientinnen, die in die vorliegende Studie eingeschlossen waren, war diese Verteilung ähnlich: Wir beobachteten insgesamt mehr östrogenrezeptorpositive Fälle (84%), darunter die Mehrzahl östrogenrezeptor- und progesteronrezeptorpositiv (77%). Dafür etwas weniger östrogenrezeptorpositive/ progesteronrezeptornegative (8%) und weniger als 1% der Proben waren bei negativem Östrogenrezeptorstatus positiv für den Progesteronrezeptor.

Die Einteilung der Patientinnen in progesteronrezeptornegative und progesteronrezeptorpositive erfolgte analog der Einteilung für den Östrogenrezeptorstatus. Aufgrund der beschriebenen Zusammenhänge zwischen Östrogen- und Progesteronrezeptorexpression wurden auch die Genotyp- und Allelfrequenzen der progesteronrezeptornegativen Proben denen der östrogenrezeptor- und progesteronrezeptorpositiven Proben gegenübergestellt.

Zwei der getesteten SNPs zeigten dabei eine Assoziation mit dem Progesteronrezeptorstatus. Zunächst konnten wir für den Promotor SNP rs3808350 eine starke inverse Korrelation zwischen dem homozygoten Genotypen GG und der Progesteronrezeptornegativität in allen Referenzgruppen beobachten. Dieser Genotyp kam bei Frauen mit progesteronrezeptornegativen Karzinomen im Vergleich zu den progesteronrezeptorpositiven und auch den gesunden Kontrollen deutlich seltener vor. Zugleich fiel bei der Heterozygotenanalyse auf, dass der heterozygote Genotyp AG bei progesteronrezeptornegativen Mammakarzinompatientinnen deutlich häufiger zu finden war, als bei progesteronrezeptorpositiven oder östrogenrezeptor- und progesteronrezeptorpositiven. Deshalb könnte vermutet werden, dass der homozygote Genotyp in diesem Fall einen protektiven Effekt auf die Entwicklung eines progesteronrezeptornegativen Tumors hat und umgekehrt der heterozygote Genotyp die Progesteronrezeptornegativität begünstigt.

Einschränkend muss an dieser Stelle allerdings gesagt werden, dass sich vor allem im Vergleich mit der gesunden Kontrollgruppe diese Assoziation auf die Homozygotenanalyse beschränkte und sich auch in den anderen Vergleichen keine statistische Assoziation mit der Allelfrequenz oder -positivität fand. Dieser Sachverhalt könnte als mögliches Indiz für einen Zufallsbefund gesehen werden.

In der Studie von Alves et al. wurde kein Zusammenhang zwischen GPR30 und jeglichen Tumorparametern gefunden (Alves et al. 2010), jedoch wurde anscheinend eine mögliche Assoziation mit dem Progesteronrezeptorstatus nicht eigens untersucht, sodass eine vergleichende Aussage an dieser Stelle nicht möglich ist.

Zusätzlich zu der beschriebenen Einteilung wurde ein Vergleich einer schwach progesteronrezeptorpositiven und einer stark progesteronrezeptorpositiven Gruppe durchgeführt, wobei der Grenzwert für starke Progesteronrezeptorpositivität ein IRS von >4 war.

Bei dieser Gegenüberstellung konnten wir ergänzend eine Assoziation mit dem Missense SNP rs11544331 sehen. Das seltenere T Allel dieses SNP erschien bei Frauen mit niedriger Progesteronrezeptorexpression seltener, als bei denen der gesunden Vergleichsgruppe oder den Probandinnen ohne Malignom. In der Heterozygotenanalyse zeigte sich ebenfalls der heterozygote Genotyp CT in den Proben mit niedriger Progesteronrezeptorexpression seltener

als in den genannten Vergleichsgruppen und zusätzlich auch seltener als in der Gruppe der Mastopathiepatientinnen.

Wenn alle diese Ergebnisse zusammen betrachtet werden, könnte das Vorhandensein mindestens eines T Allels gegen das Auftreten eines progesteronrezeptornegativen Tumors sprechen. Es bleibt jedoch der zugrundeliegende molekulare Mechanismus hinter der Assoziation von GPR30 SNPs und dem Progesteronrezeptorstatus zu klären. Es ist schließlich bekannt, dass das Progesteronrezeptorgen Ziel von Östrogenstimuli ist und ein Östrogenantwortelement in seinem Promotor besitzt, das eine Aktivierung seiner Transkription durch die Bindung von ER α ermöglicht (Meikle et al. 2001). Bisher bleibt also offen, ob es einen direkten Zusammenhang zwischen der GPR30 Aktivierung und der Progesteronrezeptortranskription gibt, oder ob dies ein sekundärer Effekt durch die Transaktivierung von ER α ist (Albanito et al. 2008).

4.3. Ausblick

Wenngleich die Anzahl der in dieser Studie untersuchten Fälle limitiert war, konnten wir dennoch eine Genotyp-Phänotyp-Assoziation der getesteten SNPs feststellen. Eine Korrelation dieser getesteten SNPs mit der Expression von GPR30 in ausgewählten Mammakarzinomzelllinien war leider nicht zu erkennen. Ergänzend wäre es also jetzt interessant, Zusammenhänge der SNP Genotypen mit der GPR30 Rezeptorfunktion zu untersuchen, was deren Assoziation mit verschiedenen Tumorcharakteristika klären könnte.

Gerade die Therapie des Mammakarzinoms hat sich in den vergangenen Jahren stark gewandelt und es werden immer mehr Substanzen, die in die hormonellen Regelkreisläufe des Mammakarzinoms eingreifen, eingesetzt. Dabei konnte beobachtet werden, dass ein Teil der Patientinnen nicht auf eine Antiöstrogentherapie anspricht, obwohl ihre Tumoren östrogenrezeptorpositiv sind. Die Aufklärung der Rolle von anderen Steroidrezeptoren, wie GPR30, und das genauere Verständnis ihrer Signalwege sowie ihres Einflusses auf die Tumorbilogie und die gegenseitigen Einflüsse der Rezeptoren aufeinander bilden daher einen wichtigen Beitrag zur weiteren Individualisierung der Therapie des Mammakarzinoms.

Insgesamt unterstreichen die Ergebnisse dieser Studie die wichtige Rolle von GPR30 für die Entstehung von Brustkrebs sowie den möglichen Krankheitsverlauf und ermutigen zu funktionellen Untersuchungen der molekularen Mechanismen, die der Assoziation von

Diskussion

GPR30 Polymorphismen mit Progesteronrezeptorstatus, Tumorwachstum, Lymphknotenstatus oder Grading zugrunde liegen.

5. Zusammenfassung

Der G-Protein-gekoppelte Rezeptor GPR30 vermittelt, wie gezeigt werden konnte, Östrogeneffekte an Brustkrebszellen. Polymorphismen im GPR30 Gen könnten daher das Risiko, an Brustkrebs zu erkranken, oder die Ausbildung bestimmter Tumorcharakteristika des Mammakarzinoms beeinflussen.

In dieser Genotyp-Phänotyp-Assoziationsstudie wurden erstmalig drei Single Nucleotide Polymorphismen (SNPs) im GPR30 Gen hinsichtlich ihrer Allel- und Genotypfrequenzen sowie der Allelpositivität bei Mammakarzinompatientinnen untersucht. Aus Blutproben gewonnene DNA einer Gesamtzahl von 257 Frauen mit sporadisch aufgetretenem Brustkrebs, 247 altersentsprechenden gesunden Frauen, sowie weiteren 46 Frauen mit bekanntem Fibroadenom, 54 Frauen mit Mastopathie und einer Gruppe von 50 Frauen mit hereditärem Brustkrebs ohne BRCA1 oder BRCA2 Mutation wurden für drei GPR30 SNPs mittels Tetra Primer PCR genotypisiert. Der Vergleich der Mammakarzinompatientinnen mit der Kontrollgruppe zeigte keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Allel-, Genotyp- oder Haplotypfrequenzen sowie der Allelpositivität der drei SNPs. Im Gegensatz dazu waren die drei getesteten SNPs mit histopathologischen Charakteristika der Mammakarzinompatientinnen wie Tumorgroße, histologischem Grading, Nodalstatus und Progesteronrezeptorstatus assoziiert.

Das A Allel des SNP rs3808351, der sich in der untranslatierten 5' Region des Gens befindet, war signifikant seltener bei Patientinnen mit großen oder schlecht differenzierten Tumoren zu finden. Das T Allel des SNP rs11544331, der im Exon 3 lokalisiert ist und zu einem Aminosäureaustausch von Prolin zu Leucin führt, war ebenso bei Patientinnen mit schlecht differenzierten Tumoren sowie bei Patientinnen mit positivem Nodalstatus seltener anzutreffen, was einen protektiven Effekt der beiden SNPs hinsichtlich aggressiver Mammakarzinomentitäten vermuten lässt. Der homozygote Genotyp GG des Promotor SNP rs3808350 und auch das T Allel des Missense-SNP rs11544331 zeigten eine inverse Korrelation mit der Progesteronrezeptornegativität. Auch hier lässt sich also ein protektiver Effekt auf die Entwicklung eines progesteronrezeptornegativen Mammakarzinoms unterstellen.

Zusammenfassend unterstreichen die Ergebnisse dieser Studie die wichtige Rolle von GPR30 für das Mammakarzinom und ermutigen zu weiteren Untersuchungen, um die molekularen Mechanismen, die der Assoziation von GPR30 Polymorphismen mit dem

Zusammenfassung

Progesteronrezeptorstatus, dem Tumorwachstum, dem Grading und dem Lymphknotenstatus zugrunde liegen, zu erforschen.

6. Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

1. Adami HO, Graffman S, Lindgren A, Sällström J. 1985. Prognostic implication of estrogen receptor content in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 5(3): 293-300.
2. Ahmed S, Thomas G, Ghoussaini M, Healey CS, Humphreys MK, Platte R, Morrison J, Maranian M, Pooley KA, Luben R, Eccles D, Evans DG, Fletcher O, Johnson N, dos Santos Silva I, Peto J, Stratton MR, Rahman N, Jacobs K, Prentice R, Anderson GL, Rajkovic A, Curb JD, Ziegler RG, Berg CD, Buys SS, McCarty CA, Feigelson HS, Calle EE, Thun MJ, Diver WR, Bojesen S, Nordestgaard BG, Flyger H, Dörk T, Schürmann P, Hillemanns P, Karstens JH, Bogdanova NV, Antonenkova NN, Zalutsky IV, Bermisheva M, Fedorova S, Khusnutdinova E; SEARCH, Kang D, Yoo KY, Noh DY, Ahn SH, Devilee P, van Asperen CJ, Tollenaar RA, Seynaeve C, Garcia-Closas M, Lissowska J, Brinton L, Peplonska B, Nevanlinna H, Heikkinen T, Aittomäki K, Blomqvist C, Hopper JL, Southey MC, Smith L, Spurdle AB, Schmidt MK, Broeks A, van Hien RR, Cornelissen S, Milne RL, Ribas G, González-Neira A, Benitez J, Schmutzler RK, Burwinkel B, Bartram CR, Meindl A, Brauch H, Justenhoven C, Hamann U; GENICA Consortium, Chang-Claude J, Hein R, Wang-Gohrke S, Lindblom A, Margolin S, Mannermaa A, Kosma VM, Kataja V, Olson JE, Wang X, Fredericksen Z, Giles GG, Severi G, Baglietto L, English DR, Hankinson SE, Cox DG, Kraft P, Vatten LJ, Hveem K, Kumle M, Sigurdson A, Doody M, Bhatti P, Alexander BH, Hooning MJ, van den Ouweland AM, Oldenburg RA, Schutte M, Hall P, Czene K, Liu J, Li Y, Cox A, Elliott G, Brock I, Reed MW, Shen CY, Yu JC, Hsu GC, Chen ST, Anton-Culver H, Ziogas A, Andrulis IL, Knight JA; kConFab; Australian Ovarian Cancer Study Group, Beesley J, Goode EL, Couch F, Chenevix-Trench G, Hoover RN, Ponder BA, Hunter DJ, Pharoah PD, Dunning AM, Chanock SJ, Easton DF. 2009. Newly discovered breast cancer susceptibility loci on 3p24 and 17q23.2. *Nat Genet*, 41(5):585-90.
3. Albanito L, Lappano R, Madeo A, Chimento A, Prossnitz ER, Cappello AR, Dolce V, Abonante S, Pezzi V, Maggiolini M. 2008. G-protein-coupled receptor 30 and estrogen receptor-alpha are involved in the proliferative effects induced by atrazine in ovarian cancer cells. *Environ Health Perspect*, 116(12):1648-55.
4. Albanito L, Sisci D, Aquila S, Brunelli E, Vivacqua A, Madeo A, Lappano R, Pandey DP, Picard D, Mauro L, Andò S, Maggiolini M. 2008. Epidermal growth factor induces G protein-coupled receptor 30 expression in estrogen receptor-negative breast cancer cells. *Endocrinology*, 149(8):3799-808.
5. Allred DC, Clark GM, Tandon AK, Molina R, Tormey DC, Osborne CK, Gilchrist KW, Mansour EG, Abeloff M, Eudey L. 1992. HER-2/neu in node-negative breast cancer: prognostic significance of overexpression influenced by the presence of in situ carcinoma. *J Clin Oncol*, 10(4): 599-605.
6. Alves SM, Mesquita L, Sousa R, Peralta F, Silva HC. 2010. Polymorphisms of estrogen receptors, ERα and GPR30: association with breast cancer susceptibility and prognosis. *BMC Proceedings*, 4(Suppl 2):P6.

7. American Cancer Society. 2008. Cancer Facts & Figures 2008. Atlanta: American Cancer Society.
8. Anders CK, Hsu DS, Broadwater G, Acharya CR, Foekens JA, Zhang Y, Wang Y, Marcom PK, Marks JR, Febbo PG, Nevins JR, Potti A, Blackwell KL. 2008. Young age at diagnosis correlates with worse prognosis and defines a subset of breast cancers with shared patterns of gene expression. *J Clin Oncol*, 26(20):3324-30.
9. Andrulis IL, Bull SB, Blackstein ME, Sutherland D, Mak C, Sidlofsky S, Pritzker KP, Hartwick RW, Hanna W, Lickley L, Wilkinson R, Qizilbash A, Ambus U, Lipa M, Weizel H, Katz A, Baida M, Mariz S, Stoik G, Dacamara P, Strongitharm D, Geddie W, McCready D. 1998. neu/erbB-2 amplification identifies a poor-prognosis group of women with node-negative breast cancer. *J Clin Oncol*, 16(4):1340-9.
10. Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, Loman N, Olsson H, Johannsson O, Borg A, Pasini B, Radice P, Manoukian S, Eccles DM, Tang N, Olah E, Anton-Culver H, Warner E, Lubinski J, Gronwald J, Gorski B, Tulinius H, Thorlacius S, Eerola H, Nevanlinna H, Syrjäkoski K, Kallioniemi OP, Thompson D, Evans C, Peto J, Lalloo F, Evans DG, Easton DF. 2003. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet*, 72(5):1117-30.
11. Aronica SM, Kraus WL, Katzenellenbogen BS. 1994. Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(18):8517-21.
12. Ashbeck EL, Rosenberg RD, Stauber PM, Key CR. Benign breast biopsy diagnosis and subsequent risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 6(3):467-72.
13. Bamberger AM, Milde-Langosch K, Schulte HM, Löning T. 2000. Progesterone receptor isoforms, PR-B and PR-A, in breast cancer: correlations with clinicopathologic tumor parameters and expression of AP-1 factors. *Horm Res*, 54(1):32-7.
14. 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(10):1973-9.
15. Beckmann MW, Niederacher D, Goecke TO, Bodden-Heidrich R, Schnürch HG, Bender HG. 1997. Hochrisikofamilien mit Mamma- und Ovarialkarzinomen: Möglichkeiten der Beratung, genetischen Analyse und Früherkennung. *Dt Ärztebl*, 94: A-161–167
16. Berghoff A, Bago-Horvath Z, De Vries C, Dubsky P, Pluschnig U, Rudas M, Rottenfusser A, Knauer M, Eiter H, Fitzal F, Dieckmann K, Mader RM, Gnant M, Zielinski CC, Steger GG, Preusser M, Bartsch R. 2012. Brain metastases free survival differs between breast cancer subtypes. *Br J Cancer*, 106(3):440-6.

17. Bologa CG, Revankar CM, Young SM, Edwards BS, Arterburn JB, Kiselyov AS, Parker MA, Tkachenko SE, Savchuck NP, Sklar LA, Oprea TI, Prossnitz ER. 2006. Virtual and biomolecular screening converge on a selective agonist for GPR30. *Nat Chem Biol*, 2(4):207-12.
18. Boyd NF, Lockwood GA, Byng JW, Trichler DL, Yaffe MJ. 1998. Mammographic densities and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarker Prev*, 7:1133-1144.
19. Breast Cancer Linkage Consortium. 1997. Pathology of familial breast cancer: differences between breast cancers in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations and sporadic cases. *Lancet*, 349(9064):1505-10.
20. Breast Cancer Linkage Consortium. 1999. Cancer risks in BRCA2 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst*, 91(15):1310-6.
21. Brinton LA, Hoover R, Fraumeni JF Jr. 1983. Reproductive factors in the aetiology of breast cancer. *Br J Cancer*, 47(6):757-62.
22. Broeks A, Urbanus JH, Floore AN, Dahler EC, Klijn JG, Rutgers EJ, Devilee P, Russell NS, van Leeuwen FE, van 't Veer LJ. 2000. ATM-Heterozygous Germline Mutations Contribute to Breast Cancer-Susceptibility. *Am J Hum Genet*, 66(2):494-500.
23. Carmeci C, Thompson DA, Ring HZ, Francke U, Weigel RJ. 1997. Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. *Genomics*, 45(3):607-17.
24. Carty NJ, Carter C, Rubin C, Ravichandran D, Royle GT, Taylor I. 1995. Management of fibroadenoma of the breast. *Ann R Coll Surg Engl*, 77(2):127-30
25. Cattoretti G, Rilke F, Andreola S, D'Amato L, Delia D. 1988. P53 expression in breast cancer. *Int J Cancer*, 41(2):178-83.
26. Chang J, Powles TJ, Allred DC, Ashley SE, Clark GM, Makris A, Assersohn L, Gregory RK, Osborne CK, Dowsett M. 1999. Biologic markers as predictors of clinical outcome from systemic therapy for primary operable breast cancer. *J Clin Oncol*, 17(10):3058-63.
27. Chang J, Elledge RM. 2001. Clinical management of women with genomic BRCA1 and BRCA2 mutations. *Breast Cancer Res Treat*, 69(2):101-13.
28. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. 1996. Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. *Lancet*, 347(9017):1713-27.
29. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. 2002. Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50,302 women with breast cancer and 96,973 women without the disease. *Lancet*, 360(9328):187-195.

30. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. 1993. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*, 261(5123):921-3.
31. De Placido S, De Laurentiis M, Carlomagno C, Gallo C, Perrone F, Pepe S, Ruggiero A, Marinelli A, Pagliarulo C, Panico L, Pettinato G, Petrella G, Bianco AR. 2003. Twenty-year results of the Naples GUN randomized trial: predictive factors of adjuvant tamoxifen efficacy in early breast cancer. *Clin Cancer Res*, 9(3):1039-46.
32. Dennis MK, Burai R, Ramesh C, Petrie WK, Alcon SN, Nayak TK, Bologna CG, Leitao A, Brailoiu E, Deliu E, Dun NJ, Sklar LA, Hathaway HJ, Arterburn JB, Oprea TI, Prossnitz ER. 2009. In vivo effects of a GPR30 antagonist. *Nat Chem Biol*, 5(6):421-7.
33. Dennis MK, Field AS, Burai R, Ramesh C, Petrie WK, Bologna CG, Oprea TI, Yamaguchi Y, Hayashi S, Sklar LA, Hathaway HJ, Arterburn JB, Prossnitz ER. 2011. Identification of a GPER/GPR30 antagonist with improved estrogen receptor counterselectivity. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 127(3-5):358-66.
34. Diab SG, Elledge RM, Clark GM. 2000. Tumor characteristics and clinical outcome of elderly women with breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 92(7):550-6.
35. Deutsches Krebsforschungszentrum. 2007.
<http://www.krebsinformation.de/themen/risiken/gutartige-brustveraenderungen.php>
Stand 12/2007
36. Deutsches Krebsforschungszentrum. 2010.
<http://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/brustkrebs/brustkrebsrisiken-uebersicht.php> Stand 05/2010
37. Dupont WD, Parl FF, Hartmann WH, Brinton LA, Winfield AC, Worrell JA, Schuyler PA, Plummer WD. 1993. Breast cancer risk associated with proliferative breast disease and atypical hyperplasia. *Cancer*, 71(4):1258-65.
38. Dupont WD, Page DL, Parl FF, Vnencak-Jones CL, Plummer WD Jr, Rados MS, Schuyler PA. 1994. Long-term risk of breast cancer in women with fibroadenoma. *N Engl J Med*, 331(1):10-5.
39. Easton DF, Pooley KA, Dunning AM, Pharoah PD, Thompson D, Ballinger DG, Struwing JP, Morrison J, Field H, Luben R, Wareham N, Ahmed S, Healey CS, Bowman R; SEARCH collaborators, Meyer KB, Haiman CA, Kolonel LK, Henderson BE, Le Marchand L, Brennan P, Sangrajrang S, Gaborieau V, Odefrey F, Shen CY, Wu PE, Wang HC, Eccles D, Evans DG, Peto J, Fletcher O, Johnson N, Seal S, Stratton MR, Rahman N, Chenevix-Trench G, Bojesen SE, Nordestgaard BG, Axelsson CK, Garcia-Closas M, Brinton L, Chanock S, Lissowska J, Peplonska B, Nevanlinna H, Fagerholm R, Eerola H, Kang D, Yoo KY, Noh DY, Ahn SH, Hunter DJ, Hankinson SE, Cox DG, Hall P, Wedren S, Liu J, Low YL, Bogdanova N, Schürmann P, Dörk T, Tollenaar RA, Jacobi CE, Devilee P, Klijn JG, Sigurdson AJ, Doody MM, Alexander BH, Zhang J, Cox A, Brock IW, MacPherson G, Reed MW,

- Couch FJ, Goode EL, Olson JE, Meijers-Heijboer H, van den Ouweland A, Uitterlinden A, Rivadeneira F, Milne RL, Ribas G, Gonzalez-Neira A, Benitez J, Hopper JL, McCredie M, Southey M, Giles GG, Schroen C, Justenhoven C, Brauch H, Hamann U, Ko YD, Spurdle AB, Beesley J, Chen X; kConFab; AOCS Management Group, Mannermaa A, Kosma VM, Kataja V, Hartikainen J, Day NE, Cox DR, Ponder BA. 2007. Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature*, 447(7148):1087-93.
40. Elston CW, Ellis IO. 1991. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, 19(5):403-10.
41. Falette N, Paperin MP, Treilleux I, Gratadour AC, Peloux N, Mignotte H, Tooke N, Löfman E, Inganäs M, Bremond A, Ozturk M, Puisieux A. 1998. Prognostic value of P53 gene mutations in a large series of node-negative breast cancer patients. *Cancer Res*, 58(7):1451-5.
42. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM. GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2010. <http://globocan.iarc.fr> , Stand 10/2010
43. Fernández LP, Milne RL, Barroso E, Cuadros M, Arias JI, Ruibal A, Benítez J, Ribas G. 2006. Estrogen and progesterone receptor gene polymorphisms and sporadic breast cancer risk: a Spanish case-control study. *Int J Cancer*, 119(2):467-71.
44. Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton AR Jr. 2000. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol Endocrinol*, 14(10):1649-60.
45. Filardo EJ, Thomas P. 2005. GPR30: a seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that triggers EGF release. *Trends Endocrinol Metab*, 16(8):362-7.
46. Filardo EJ, Graeber CT, Quinn JA, Resnick MB, Giri D, DeLellis RA, Steinhoff MM, Sabo E. 2006. Distribution of GPR30, a seven membrane-spanning estrogen receptor, in primary breast cancer and its association with clinicopathologic determinants of tumor progression. *Clin Cancer Res*, 12(21):6359-66.
47. Filardo EJ, Quinn JA, Pang Y, Graeber C, Shaw S, Dong J, Thomas P. 2007. Activation of the novel estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 (GPR30) at the plasma membrane. *Endocrinology*, 148(7):3236-45.
48. Ford D, Easton DF, Stratton M, Narod S, Goldgar D, Devilee P, Bishop DT, Weber B, Lenoir G, Chang-Claude J, Sobol H, Teare MD, Struewing J, Arason A, Scherneck S, Peto J, Rebbeck TR, Tonin P, Neuhausen S, Barkardottir R, Eyfjord J, Lynch H, Ponder BA, Gayther SA, Zelada-Hedman M. 1998. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet*, 62(3):676-89.

49. Funakoshi T, Yanai A, Shinoda K, Kawano MM, Mizukami Y. 2006. G protein-coupled receptor 30 is an estrogen receptor in the plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun*, 346(3):904-10.
50. Girgert R, Emons G, Gründker C. 2012. Inactivation of GPR30 reduces growth of triple-negative breast cancer cells: possible application in targeted therapy. *Breast Cancer Res Treat*. 2012 Jan 31. [Epub ahead of print]
51. Gold B, Kirchhoff T, Stefanov S, Lautenberger J, Viale A, Garber J, Friedman E, Narod S, Olshen AB, Gregersen P, Kosarin K, Olsh A, Bergeron J, Ellis NA, Klein RJ, Clark AG, Norton L, Dean M, Boyd J, Offit K. 2008. Genome-wide association study provides evidence for a breast cancer risk locus at 6q22.33. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(11):4340-5.
52. Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn HJ; Panel members. 2009. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann Oncol*, 20(8):1319-29.
53. Greene MH. 1997. Genetics of breast cancer. *Mayo Clin Proc*, 72(1):54-65.
54. Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, Price KN, Sävje-Söderborgh J, Anbazhagan R, Styles J, Rudenstam CM, Golouh R, Reed R. 1992. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol*, 10(7):1049-56.
55. Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, King MC. 1990. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science*, 250(4988):1684-9.
56. 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(7):870-4.
57. Iglehart JD, Kraus MH, Langton BC, Huper G, Kerns BJ, Marks JR. 1990. Increased erbB-2 gene copies and expression in multiple stages of breast cancer. *Cancer Res*, 50(20):6701-7.
58. Ignatov A, Ignatov T, Roessner A, Costa SD, Kalinski T. 2010. Role of GPR30 in the mechanisms of tamoxifen resistance in breast cancer MCF-7 cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Aug;123(1):87-96.
59. Ignatov A, Ignatov T, Weissenborn C, Eggemann H, Bischoff J, Semczuk A, Roessner A, Costa SD, Kalinski T. 2011. G-protein-coupled estrogen receptor GPR30 and tamoxifen resistance in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 128(2):457-66.

60. Jemal A, Murray T, Samuels A, Ghafoor A, Ward E, Thun MJ. 2003. Cancer statistics, 2003. *CA Cancer J Clin*, 53: 5–26.
61. Jovicić-Milentijević M, Ilić R, Katić V, Zivković V. 2004. Correlation of steroid hormone receptor status with histological and nuclear grading in breast carcinoma. *J BUON*, 9(2):173-7.
62. Ke X, Hunt S, Tapper W, Lawrence R, Stavrides G, Ghori J, Whittaker P, Collins A, Morris AP, Bentley D, Cardon LR, Deloukas P. 2004. The impact of SNP density on fine-scale patterns of linkage disequilibrium. *Hum Mol Genet*, 13(6):577-88.
63. King CR, Swain SM, Porter L, Steinberg SM, Lippman ME, Gelmann EP. 1989. Heterogeneous expression of erbB-2 messenger RNA in human breast cancer. *Cancer Res*, 49(15):4185-91.
64. Kitts A, Sherry S. 2002. The Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP) of Nucleotide Sequence Variation. The NCBI Handbook. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21088/#ch5.ch5_s4 Stand 02/2011
65. Kleuser B, Malek D, Gust R, Pertz HH, Potteck H. 2008. 17-Beta-estradiol inhibits transforming growth factor-beta signaling and function in breast cancer cells via activation of extracellular signal-regulated kinase through the G protein-coupled receptor 30. *Mol Pharmacol*, 74(6):1533-43.
66. Koenders PG, Beex LV, Langens R, Kloppenborg PW, Smals AG, Benraad TJ. 1991. Steroid hormone receptor activity of primary human breast cancer and pattern of first metastasis. The Breast Cancer Study Group. *Breast Cancer Res Treat*, 18(1):27-32.
67. Kollias J, Elston CW, Ellis IO, Robertson JF, Blamey RW. 1997. Early-onset breast cancer-histopathological and prognostic considerations. *Br J Cancer*, 75(9):1318-23.
68. Kuo WH, Chang LY, Liu DL, Hwa HL, Lin JJ, Lee PH, Chen CN, Lien HC, Yuan RH, Shun CT, Chang KJ, Hsieh FJ. 2007. The interactions between GPR30 and the major biomarkers in infiltrating ductal carcinoma of the breast in an Asian population. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 46(2):135-45.
69. Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe e.V.. 2012. Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. Langversion 3.0, Aktualisierung 2012. AWMF-Register-Nummer: 032 – 045OL.
70. Li Y, Birnbaumer L, Teng CT. 2010. Regulation of ERRalpha gene expression by estrogen receptor agonists and antagonists in SKBR3 breast cancer cells: differential molecular mechanisms mediated by g protein-coupled receptor GPR30/GPER-1. *Mol Endocrinol*, 24(5):969-80.
71. Liaw D, Marsh DJ, Li J, Dahia PL, Wang SI, Zheng Z, Bose S, Call KM, Tsou HC, Peacocke M, Eng C, Parsons R. 1997. Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nat Genet*, 16(1):64-7.

72. Liu S, Chia SK, Mehl E, Leung S, Rajput A, Cheang MC, Nielsen TO. 2010. Progesterone receptor is a significant factor associated with clinical outcomes and effect of adjuvant tamoxifen therapy in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*, 119(1):53-61.
73. Loréal O, Ropert M, Mosser A, Déhais V, Deugnier Y, David V, Brissot P, Jouanolle AM. 2007. Pathophysiology and genetics of classic HFE (type 1) hemochromatosis. *Presse Med*, 36(9 Pt 2):1271-7.
74. MacMahon B, Cole P, Lin TM, Lowe CR, Mirra AP, Ravnihar B, Salber EJ, Valaoras VG, Yuasa S. 1970. Age at first birth and breast cancer risk. *Bull World Health Organ*, 43(2):209-21.
75. Makris A, Powles TJ, Allred DC, Ashley S, Ormerod MG, Titley JC, Dowsett M. 1998. Changes in hormone receptors and proliferation markers in tamoxifen treated breast cancer patients and the relationship with response. *Breast Cancer Res Treat*, 48(1):11-20.
76. Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF Jr, Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA. 1990. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science*, 250(4985):1233-8.
77. Marchbanks PA, McDonald JA, Wilson HG, Folger SG, Mandel MG, Daling JR, Bernstein L, Malone KE, Ursin G, Strom BL, Norman SA, Wingo PA, Burkman RT, Berlin JA, Simon MS, Spirtas R, Weiss LK. 2002. Oral contraceptives and the risk of breast cancer. *N Engl J Med*, 346(26):2025-32.
78. Martin AM, Weber BL. 2000. Genetic and hormonal risk factors in breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 92(14):1126-35.
79. Meikle A, Garófalo EG, Rodríguez-Piñón M, Tasende C, Sahlin L. 2001. Regulation by gonadal steroids of estrogen and progesterone receptors along the reproductive tract in female lambs; *Acta Vet Scand*, 42(1):161-9.
80. Mizukami Y. 2010. In vivo functions of GPR30/GPER-1, a membrane receptor for estrogen: from discovery to functions in vivo. *Endocr J*, 57(2):101-7.
81. Mohsin SK, Weiss H, Havighurst T, Clark GM, Berardo M, Roanh le D, To TV, Qian Z, Love RR, Allred DC. 2004. Progesterone receptor by immunohistochemistry and clinical outcome in breast cancer: a validation study. *Mod Pathol*, 17(12):1545-54.
82. Morrow M, Foster RS Jr. 1981. Staging of breast cancer: a new rationale for internal mammary node biopsy. *Arch Surg*, 116(6):748-51.
83. Mullis K. B. - Autobiography. Nobelprize.org. 5 Jul 2012
http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1993/mullis.html

84. Nadji M, Gomez-Fernandez C, Ganjei-Azar P, Morales AR. 2005. Immunohistochemistry of estrogen and progesterone receptors reconsidered: experience with 5,993 breast cancers. *Am J Clin Pathol*, 123(1):21-7.
85. National Center for Biotechnology Information. 2007. SNPs: Variations on a theme. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/snps.html> Stand 09/2007
86. National Center for Biotechnology Information. 2009. dbSNP short genetic variations <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp> Stand 01/2009
87. Newcomb PA, Storer BE, Longnecker MP, Mittendorf R, Greenberg ER, Clapp RW, Burke KP, Willett WC, MacMahon B. 1994. Lactation and a reduced risk of premenopausal breast cancer. *N Engl J Med*, 330(2):81-7.
88. Notas G, Kampa M, Pelekanou V, Castanas E. 2011. Interplay of estrogen receptors and GPR30 for the regulation of early membrane initiated transcriptional effects: A pharmacological approach. *Steroids*, [Epub ahead of print]
89. Ortmann O, Görse R [Hrsg.]. Veronesi U, Perez EA, Garber J, Glück S, Vredenburgh JJ, Winer E, Hortobagyi GN, Muss HB, Sartor C, Rubin E, Hall R, Holland R, Cocquyt V, Rosti G, Fiorentini G, Blondeel PN, Avisar E, Doraiswamy PM, Hurley J, Abernethy AP, Crews JR, Jorda M, Velasquez MV, Yepes MM, Gonzales Angulo AM, Bennett CL, Takita C, Kharfan-Dabaja MA, Morgensztern D, Heros DO, Roman E, Negret L, Lopes G, Rosado MF, Fein S, De Cesare T, Abdullah S, Ayala E, Sanchez OM, Silva C, Gonzalez E, Brenner J, Silva JE, Caldera H, Padmanabhan S, Moreno S, Ceballos A, Donenberg T, Quasem S, Lenz KL. 2007. *Brustkrebs – Diagnostik und Therapie*. München: Urban&Fischer. Seiten 96-99, 110, 112-126.
90. Otto C, Rohde-Schulz B, Schwarz G, Fuchs I, Klewer M, Brittain D, Langer G, Bader B, Prella K, Nubbemeyer R, Fritzemeier KH. 2008. G protein-coupled receptor 30 localizes to the endoplasmic reticulum and is not activated by estradiol. *Endocrinology*, 149(10):4846-56.
91. Pandey DP, Lappano R, Albanito L, Madeo A, Maggiolini M, Picard D. 2009. Estrogenic GPR30 signalling induces proliferation and migration of breast cancer cells through CTGF. *EMBO J*, 28(5):523-32.
92. Pedram A, Razandi M, Levin ER. 2006. Nature of functional estrogen receptors at the plasma membrane. *Mol Endocrinol*, 20(9):1996-2009.
93. Peng Y, Liang G, Pei Y, Ye W, Liang A, Su P. 2012. Genomic polymorphisms of G-Protein Estrogen Receptor 1 are associated with severity of adolescent idiopathic scoliosis. *Int Orthop*, 36(3):671-7.
94. Peters F. 2003. Gutartige Erkrankungen der Brust, Teil I: Mastopathischer Formenkreis. *Der Gynäkologe* 2003/5: 427-442
95. Pietras RJ, Arboleda J, Reese DM, Wongvipat N, Pegram MD, Ramos L, Gorman CM, Parker MG, Sliwkowski MX, Slamon DJ. 1995. HER-2 tyrosine kinase pathway targets estrogen receptor and promotes hormone-independent growth in human breast cancer cells. *Oncogene*, 10(12):2435-46.

96. Pinto AE, André S, Pereira T, Nóbrega S, Soares J. 2001. C-erbB-2 oncoprotein overexpression identifies a subgroup of estrogen receptor positive (ER+) breast cancer patients with poor prognosis. *Ann Oncol*, 12(4):525-33.
97. Poonkuzhali B, Lamba J, Strom S, Sparreboom A, Thummel K, Watkins P, Schuetz E. 2008. Association of breast cancer resistance protein/ABCG2 phenotypes and novel promoter and intron 1 single nucleotide polymorphisms. *Drug Metab Dispos*, 36(4):780-95.
98. Prechtel K, Gehm O, Geiger G, Prechtel P. 1994. The histology of mastopathy and cumulative ipsilateral breast cancer sequence. *Pathologe*, 15(3):158-64
99. Price DT, Ridker PM. 1997. Factor V Leiden mutation and the risks for thromboembolic disease: a clinical perspective. *Ann Intern Med*, 127(10):895-903.
100. Prossnitz ER, Arterburn JB, Smith HO, Oprea TI, Sklar LA, Hathaway HJ. 2008. Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30. *Annu Rev Physiol*, 70:165-90.
101. Ravdin PM, De Laurentiis M, Vendely T, Clark GM. 1994. Prediction of axillary lymph node status in breast cancer patients by use of prognostic indicators. *J Natl Cancer Inst*, 86(23):1771-5.
102. Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. 2005. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science*, 307(5715):1625-30.
103. Robert-Koch-Institut, Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Hrsg. 2005. Heft 25 Brustkrebs. Berlin.
104. Robert-Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland eV, Hrsg. 2008. Krebs in Deutschland 2003 – 2004 Häufigkeiten und Trends. Sechste überarbeitete Auflage. Berlin.
105. Rosen PP, Groshen S, Kinne DW, Norton L. 1993. Factors influencing prognosis in node-negative breast carcinoma: analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 patients with long-term follow-up. *J Clin Oncol*, 11(11):2090-100.
106. Sakamoto H, Matsuda K, Hosokawa K, Nishi M, Morris JF, Prossnitz ER, Kawata M. 2007. Expression of G protein-coupled receptor-30, a G protein-coupled membrane estrogen receptor, in oxytocin neurons of the rat paraventricular and supraoptic nuclei. *Endocrinology*, 148(12):5842-50.
107. Siddig A, Mohamed AO, Awad S, Hassan AH, Zilahi E, Al-Haj M, Bernsen R, Adem A. 2008. Estrogen receptor alpha gene polymorphism and breast cancer. *Ann N Y Acad Sci*, 1138:95-107.
108. Silverstein MJ, Skinner KA, Lomis TJ. 2001. Predicting axillary nodal positivity in 2282 patients with breast carcinoma. *World J Surg*, 25(6):767-72.

109. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. 1987. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, 235(4785):177-82.
110. Statistisches Bundesamt, Hrsg. 2011. Statistisches Jahrbuch 2011 Für die Bundesrepublik Deutschland mit "internationalen Übersichten". Wiesbaden.
111. Tandon AK, Clark GM, Chamness GC, Ullrich A, McGuire WL. 1989. HER-2/neu oncogene protein and prognosis in breast cancer. *J Clin Oncol*, 7(8):1120-8.
112. The Cancer and Steroid Hormone Study of the Centers for Disease Control and the National Institute of Child Health and Human Development. 1986. Oral-contraceptive use and the risk of breast cancer. *N Engl J Med*, 315(7):405-11.
113. Thomas G, Jacobs KB, Kraft P, Yeager M, Wacholder S, Cox DG, Hankinson SE, Hutchinson A, Wang Z, Yu K, Chatterjee N, Garcia-Closas M, Gonzalez-Bosquet J, Prokunina-Olsson L, Orr N, Willett WC, Colditz GA, Ziegler RG, Berg CD, Buys SS, McCarty CA, Feigelson HS, Calle EE, Thun MJ, Diver R, Prentice R, Jackson R, Kooperberg C, Chlebowski R, Lissowska J, Peplonska B, Brinton LA, Sigurdson A, Doody M, Bhatti P, Alexander BH, Buring J, Lee IM, Vatten LJ, Hveem K, Kumle M, Hayes RB, Tucker M, Gerhard DS, Fraumeni JF Jr, Hoover RN, Chanock SJ, Hunter DJ. 2009. A multistage genome-wide association study in breast cancer identifies two new risk alleles at 1p11.2 and 14q24.1 (RAD51L1). *Nat Genet*, 41(5):579-84.
114. Thomas P, Pang Y, Filardo EJ, Dong J. 2005. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology*, 146(2):624-32.
115. Valagussa P, Bonadonna G, Veronesi U. 1978. Patterns of relapse and survival following radical mastectomy. Analysis of 716 consecutive patients. *Cancer*, 41(3):1170-8.
116. Volpi A, Nanni O, De Paola F, Granato AM, Mangia A, Monti F, Schittulli F, De Lena M, Scarpi E, Rosetti P, Monti M, Gianni L, Amadori D, Paradiso A. 2003. HER-2 expression and cell proliferation: prognostic markers in patients with node-negative breast cancer. *J Clin Oncol*, 21(14):2708-12.
117. Walsh T, King MC. 2007. Ten Genes for Inherited Breast Cancer Cancer Cell, 11(2):103-5.
118. Walters TK, Zuckerman J, Nisbet-Smith A, Hudson E, Chia Y, Burke M. 1990. Fine needle aspiration biopsy in the diagnosis and management of fibroadenoma of the breast. *Br J Surg*, 77(11):1215-7
119. Wang S, Li W, Liu N, Zhang T, Liu H, Liu J, Liu F, Zhang W, Gebreamlak EP, Niu Y. 2012. Clinicopathologic characteristics and prognosis for molecular subtypes in low-grade breast carcinoma: comparison with grade one invasive ductal carcinoma-not otherwise specified. *Med Oncol*. 2012 Feb 7. [Epub ahead of print]

120. Wenger CR, Beardslee S, Owens MA, Pounds G, Oldaker T, Vendely P, Pandian MR, Harrington D, Clark GM, McGuire WL. 1993. DNA ploidy, S-phase, and steroid receptors in more than 127,000 breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*, 28(1):9-20.
121. www.genecards.org . genaue Adresse http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?id_type=entrezgene&id=2852 . Stand: 03/2012
122. Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins AR, Day IN. 2001. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res*, 29(17):E88-8.
123. Zhao Z, Fu YX, Hewett-Emmett D, Boerwinkle E. 2003. Investigating single nucleotide polymorphism (SNP) density in the human genome and its implications for molecular evolution. *Gene*, 312:207-13.
124. Zheng W, Long J, Gao YT, Li C, Zheng Y, Xiang YB, Wen W, Levy S, Deming SL, Haines JL, Gu K, Fair AM, Cai Q, Lu W, Shu XO. 2009. Genome-wide association study identifies a new breast cancer susceptibility locus at 6q25.1. *Nat Genet*, 41(3):324-8.

6.2 Tabellen

Tabelle 11 SNP rs3808350 Hereditäres Mammakarzinom versus Kontrollen und Nicht-Karzinom. Nachdem die Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht untersucht wurde, wurden Allelfrequenz, Allelpositivität und Genotypfrequenzen ermittelt. Die Odds Ratio wurde bestimmt, indem der häufigere Genotyp als Referenzgruppe fungierte

SNP rs3808350	Genotypfrequenz			Allelfrequenz	
	AA	GG	AG	A	G
Hereditäres Mammakarzinom (n=50)	0.38	0.18	0.44	0.6	0.4
Kontrollen (n=247)	0.39	0.16	0.45	0.61	0.39
p		0.774	0.997		0.803
OR		0.88	1.0		
C.I. 95%		0.37-2.11	0.51-1.96		
Hereditäres Mammakarzinom (n=50)	0.38	0.18	0.44	0.6	0.4
Nicht-CA (n=347)	0.38	0.15	0.47	0.62	0.38
p		0.660	0.880		0.748
OR		0.83	0.95		
C.I. 95%		0.35-1.94	0.49-1.83		

n ist die Anzahl der Proben in den jeweiligen Kategorien

Tabelle 12 SNP rs3808350 Mammakarzinom versus Mastopathie, Fibroadenom und Nicht-Karzinom. Nachdem die Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht untersucht wurde, wurden Allelfrequenz, Allelpositivität und Genotypfrequenzen ermittelt. Die Odds Ratio wurde bestimmt, indem der häufigere Genotyp als Referenzgruppe fungierte

SNP rs3808350	Genotypfrequenz			Allelfrequenz	
	AA	GG	AG	A	G
Mammakarzinom (n=257)	0.39	0.14	0.47	0.63	0.37
Mastopathie (n=54)	0.39	0.07	0.54	0.66	0.34
p		0.296	0.653		0.569
OR		0.55	0.868		
C.I. 95%		0.18-1.71	0.47-1.61		
Mammakarzinom (n=257)	0.39	0.14	0.47	0.63	0.37
Fibroadenom (n=46)	0.35	0.17	0.48	0.59	0.41
p		0.439	0.698		0.450
OR		0.69	0.87		
C.I. 95%		0.27-1.76	0.43-1.75		
Mammakarzinom (n=257)	0.39	0.14	0.47	0.63	0.37
Nicht-CA (n=347)	0.38	0.15	0.47	0.62	0.38
p		0.636	0.926		0.679
OR		0.87	0.98		
C.I. 95%		0.54-1.46	0.69-1.39		

n ist die Anzahl der Proben in den jeweiligen Kategorien

Tabelle 13 SNP rs3808351 Hereditäres Mammakarzinom versus Gesunde und Nicht-Karzinom. Nachdem die Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht untersucht wurde, wurden Allelfrequenz, Allelpositivität und Genotypfrequenzen ermittelt. Die Odds Ratio wurde bestimmt, indem der häufigere Genotyp als Referenzgruppe fungierte

SNP rs3808351	Genotypfrequenz			Allelfrequenz	
	GG	AA	GA	G	A
Hereditäres Mammakarzinom (n=49)	0.47	0.04	0.49	0.71	0.29
Gesunde (n=246)	0.53	0.11	0.36	0.71	0.29
p		0.222	0.178		0.89
OR		0.404	1.542		
C.I. 95%		0.09-1.81	0.82-2.90		
Hereditäres Mammakarzinom (n=49)	0.47	0.04	0.49	0.71	0.29
Nicht-Karzinom (n=336)	0.5	0.1	0.4	0.7	0.3
p		0.251	0.415		0.741
OR		0.43	0.77		
C.I. 95%		0.10-1.90	0.70-1.29		

n ist die Anzahl der Proben in den jeweiligen Kategorien

Tabelle 14 SNP rs3808351 Mammakarzinom versus Mastopathie, Fibroadenom und Nicht-Karzinom. Nachdem die Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht untersucht wurde, wurden Allelfrequenz, Allelpositivität und Genotypfrequenzen ermittelt. Die Odds Ratio wurde bestimmt, indem der häufigere Genotyp als Referenzgruppe fungierte

SNP rs3808351	Genotypfrequenz			Allelfrequenz	
	GG	AA	GA	G	A
Mammakarzinom (n=255)	0.52	0.09	0.39	0.71	0.29
Mastopathie (n=54)	0.39	0.04	0.57	0.68	0.32
p		0.401	0.025*		0.433
OR		0.53	0.5		
C.I. 95%		0.12-2.40	0.27-0.92		
Mammakarzinom (n=255)	0.52	0.09	0.39	0.71	0.29
Fibroadenom (n=36)	0.44	0.12	0.44	0.67	0.33
p		0.586	0.418		0.411
OR		0.72	0.74		
C.I. 95%		0.22-2.35	0.35-1.55		
Mammakarzinom (n=255)	0.52	0.09	0.39	0.71	0.29
Nicht-Karzinom (n=336)	0.5	0.1	0.4	0.7	0.3
p		0.678	0.599		0.555
OR		0.87	0.91		
C.I. 95%		0.50-1.57	0.65-1.29		

*p<0.05, n ist die Anzahl der Proben in den jeweiligen Kategorien

Tabelle 15 SNP rs11544331 Hereditäres Mammakarzinom versus Kontrollen und Nicht-Karzinom. Nachdem die Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht untersucht wurde, wurden Allelfrequenz, Allelpositivität und Genotypfrequenzen ermittelt. Die Odds Ratio wurde bestimmt, indem der häufigere Genotyp als Referenzgruppe fungierte

SNP rs11544331	Genotypfrequenz			Allelfrequenz	
	CC	TT	CT	C	T
Hereditäres Mammakarzinom (n=49)	0.59	0	0.41	0.8	0.2
Gesunde (n=246)	0.52	0.09	0.39	0.72	0.28
p			0.793		0.102
OR			0.92		
C.I. 95%			0.49-1.77		
Hereditäres Mammakarzinom (n=49)	0.59	0	0.41	0.8	0.2
Nicht-Karzinom (n=332)	0.53	0.07	0.40	0.73	0.27
p			0.770		0.186
OR			0.913		
C.I. 95%			0.50-1.68		

n ist die Anzahl der Proben in den jeweiligen Kategorien

Tabelle 16 SNP rs11544331 Mammakarzinom versus Mastopathie, Fibroadenom und Nicht-Karzinom. Nachdem die Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht untersucht wurde, wurden Allelfrequenz, Allelpositivität und Genotypfrequenzen ermittelt. Die Odds Ratio wurde bestimmt, indem der häufigere Genotyp als Referenzgruppe fungierte

SNP rs11544331	Genotypfrequenz			Allelfrequenz	
	CC	TT	CT	C	T
Mammakarzinom (n=251)	0.58	0.07	0.35	0.76	0.24
Mastopathie (n=51)	0.51	0.02	0.47	0.75	0.25
p		0.269	0.172		0.799
OR		0.33	0.65		
C.I. 95%		0.04- 2.59	0.35- 1.21		
Mammakarzinom (n=251)	0.58	0.07	0.35	0.76	0.24
Fibroadenom (n=35)	0.63	0	0.37	0.81	0.19
p			0.958		0.29
OR			0.98		
C.I. 95%			0.47- 2.04		
Mammakarzinom (n=251)	0.58	0.07	0.35	0.76	0.24
Nicht-Karzinom (n=332)	0.53	0.07	0.40	0.73	0.27
p		0.733	0.202		0.305
OR		0.89	0.79		
C.I. 95%		0.46- 1.73	0.56- 1.13		

n ist die Anzahl der Proben in den jeweiligen Kategorien

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 steht. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Danksagung

Ich danke allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Olaf Ortmann danke ich für die Überlassung des anspruchsvollen Themas sowie die Möglichkeit, im Labor seines Institutes zu arbeiten. Dies ermöglichte mir die reibungslose und ungehinderte Durchführung meiner Experimente und erlaubte mir einen exzellenten Einblick in die Welt der Forschung.

Besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. rer. nat. Oliver Treeck für seine Ratschläge in allen praktischen und theoretischen Fragen und die engagierte Betreuung während der gesamten Zeit. Die zahlreichen mit ihm geführten Gespräche haben wesentlich zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen.

Ein ganz herzliches Dankeschön möchte ich Frau Helena Lowack und Herrn Gerhard Piendl für ihre tatkräftige und geduldige Unterstützung beim Erlernen der angewandten Methoden und der Durchführung der Versuche im Labor aussprechen.

Nicht zuletzt gehört mein Dank meinen Eltern und meiner Familie für die immer gewährte Unterstützung und Begleitung auf meinem bisherigen Lebensweg sowie meinem Mann Ferdinand, der mich während der Planung, Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit immer wieder ermutigt und mir geduldig zur Seite gestanden hat.