

Aus dem Lehrstuhl für Gynäkologie und Geburtshilfe
Prof. Dr. O. Ortmann
der medizinischen Fakultät der Universität Regensburg

Genexpressions-Profilung von Östrogenrezeptor beta Splicevarianten in Mammakarzinomen

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der
Fakultät für Medizin der Universität Regensburg

vorgelegt von

Bianca Daniela Mannke

2013

Aus dem Lehrstuhl für Gynäkologie und Geburtshilfe
Prof. Dr. O. Ortmann
der medizinischen Fakultät der Universität Regensburg

Genexpressions-Profilung von Östrogenrezeptor beta Splicevarianten in Mammakarzinomen

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der
Fakultät für Medizin der Universität Regensburg

vorgelegt von

Bianca Daniela Mannke

2013

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

1. Berichterstatter: PD Dr. Oliver Treeck

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Olaf Ortmann

Tag der mündlichen Prüfung: 21.05.2014

I) Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1. Epidemiologie	7
1.2. Therapie	7
1.3. Grading	8
1.4. Östrogen	9
1.5. Östrogenrezeptor	11
1.6. Isoformen des Östrogenrezeptor β	15
1.7. Bedeutung des Östrogenrezeptor β	21
2. Fragestellung	23
3. Material und Methoden	24
3.1. Patientendaten	24
3.2. cDNA	24
3.3. Real-time PCR	26
3.4. Schmelzkurvenanalyse	30
3.5. Technische Geräte und Materialliste	31
3.6. Statistik	31
4. Resultate	33
4.1. Probenprofilauswertung	33
4.2. Korrelationsuntersuchung der ER β Splicevarianten mit ER α	42
4.3. Korrelationsuntersuchung der Hauptsplicevarianten	43
4.4. Korrelationsuntersuchung $\Delta 4$ mit weiteren Splicevarianten	44
4.5. Korrelationsuntersuchung mit Markergenen	47
4.5.1. Korrelationsuntersuchung zwischen den Hauptsplicevarianten und den Markergenen	47
4.5.2. Korrelationsuntersuchung zwischen $\Delta 4$ und den Markergenen	49
4.5.3. Vergleich der Korrelationen von $\Delta 4$ mit den Markergenen und weiteren Splicevarianten mit den Markergenen	49
4.6. Mann-Whitney Test zum Vergleich der Gradings	51
4.7. Matched pairs	59
5. Diskussion	64
5.1. Korrelation mit Markergenen	64
5.2. Hauptvarianten beta 1, beta 2, beta 5	69
5.3. $\Delta 10K/\Delta 10N$	72
5.4. $\Delta 4$	73
5.5. Allgemeine Aspekte	77

6. Zusammenfassung	78
II) Anhang	79
a. Abbildungsverzeichnis	79
b. Diagrammverzeichnis	79
c. Tabellenverzeichnis	79
d. Abkürzungsverzeichnis	80
e. Bibliographie	81
f. Danksagung	88
g. Eidesstattliche Erklärung	88

1. Einleitung

1.1. Epidemiologie

Das Mammakarzinom ist noch immer die am häufigsten zum Tode führende Krebserkrankung bei Frauen in Deutschland und liegt insgesamt auf Platz 4 der Todesursachen bei deutschen Frauen im Jahr 2011, dies entspricht 4% der verstorbenen Personen.¹ Laut Zentrum für Krebsregisterdaten vom RKI gibt es 2012 (neuere Daten liegen noch nicht vor) voraussichtlich ca. 74000 Neuerkrankungen in Deutschland, damit zeigt sich die Tendenz weiter steigend. Das Durchschnittsalter der Erkrankten liegt vor dem 65. Lebensjahr.²

Auch Männer können an Brustkrebs erkranken, jedoch ist dieser Anteil an der Gesamtmenge klein. So wird für 2012 mit ca. 600 erkrankten Männern gerechnet.³

Wichtige Risikofaktoren für die Entstehung dieser Erkrankung sind eine positive Familienanamnese, die genetische Disposition beispielsweise durch die Mutation des BRCA Gens, Adipositas, lange Wirkdauer des körpereigenen Östrogens durch frühe Menarche und späte Menopause, Nulliparität, sowie Mastopathien. Hinzukommen noch weitere Faktoren, wie das Alter, häufig liegt aber ein multifaktorielles Geschehen vor.⁴

1.2. Therapie

Die Therapie des Mammakarzinoms richtet sich individuell nach dem Patienten und basiert auf dem Grading (s.u.), Staging und dem Rezeptorstatus. Insgesamt gibt es fünf Therapiesäulen. Dazu gehören die Operation, die Radiatio, die Chemotherapie, die Hormonbehandlung und die Antikörpertherapie.⁵ Auf die endokrine Therapie, insbesondere die Behandlung mit Tamoxifen wird im Folgenden eingegangen. Die wichtigste Methode dabei ist der Hormonentzug,⁶ dieser gelingt durch selektive Östrogenrezeptormodulatoren (SERM). Tamoxifen bindet an den Estrogenrezeptor (ER) und verdrängt das körpereigene Östrogen. Je nach Ge-

¹ „Staat & Gesellschaft - Todesursachen - Todesursachen - Statistisches Bundesamt (Destatis)“.

² „kid_2012_c50.pdf;jsessionid=50B3FCFE40A3488E542208DFADD2E186.pdf“.

³ Ebd.

⁴ Stauber und Weyerstahl, *Gynäkologie und Geburtshilfe*, 372.

⁵ „S3_Brustkrebs_Update_2012_OL_Langversion.pdf“.

⁶ Stauber und Weyerstahl, *Gynäkologie und Geburtshilfe*, 389.

webe hat es eine agonistische oder antagonistische Wirkung. Die antiöstrogene Wirkung im Brustgewebe führt zu einer verminderten Zellteilung. Gleichzeitig kommt es zu klimakterischen Beschwerden, wie Hitzewallungen. Eine weitere Nebenwirkung ist im Endometrium zu beobachten. Dort fördert Tamoxifen die Proliferation und erhöht dadurch das Risiko für das Endometriumkarzinom.⁷ Tamoxifen kann in verschiedenen Therapieregimen verwendet werden: entweder als Monotherapie über 5 Jahre, in Kombination mit Aromatasehemmern mit einer Gesamteinnahmedauer von 5 Jahren oder als 5 jährige Therapie, gefolgt von einer 5 jährigen Einnahme von Aromatasehemmern. Der Nutzen dieser adjuvanten Therapie ist sehr eindrücklich, so sinkt das Rezidivrisiko um 40% und die Sterblichkeit um 31% in 15 Jahren. Laut S3 Leitlinien von 2012 ist der Einsatz einer adjuvanten Tamoxifentherapie unabhängig vom Alter der Patientin, ihrem Nodalstatus, dem Menopausenstatus oder dem Einsatz einer Chemotherapie, solange die Patientin nicht ER oder PR negativ ist.⁸

1.3. Grading

Um den Malignitätsgrad und damit die Therapieart auswählen zu können, gibt es das Grading, welches die histologischen Charakteristika des Tumors auswertet. Es sollte bei allen invasiven Karzinomen bestimmt werden. Die S3 Leitlinie empfiehlt hierfür die Einteilung modifiziert nach Elston und Ellis. Sie enthält als Parameter die Tubulusausbildung, die Kernpolymorphie und die Mitoserate. Diese drei Werte werden zu einem Summenscore addiert und je nach Wert dem Grading 1-3 zugeordnet (s. Tabelle 1). Die pathologische Untersuchung kann sowohl an Stanz- als auch an Vakuumbiopsien vorgenommen werden. Diese Werte können jedoch vom endgültigen Ergebnis am OP-Präparat abweichen, sodass erst postoperativ das endgültige Grading festgelegt werden kann. Je höher das Grading ausfällt, desto schlechter ist der Tumor differenziert und umso schlechter ist die Prognose des Patienten zu werten.⁹

⁷ „002019.pdf“.

⁸ „S3_Brustkrebs_Update_2012_OL_Langversion.pdf“, 168.

⁹ „S3_Brustkrebs_Update_2012_OL_Langversion.pdf“.

Tabelle 1: Kriterien für das Grading des invasiven Mammakarzinoms (nach Elston, CW et al.)¹⁰

Merkmal	Kriterien	Score
Tubulusausbildung	>75%	1
	10-75%	2
	<10%	3
Kernpolymorphie	Gering	1
	Mittelgradig	2
	Stark	3
Mitoserate	0-5/10HPF	1
	6-11/10HPF	2
	>12/10HPF	3
Summenscore		3-9

„HPF = high power field; Berücksichtigung der individuellen Gesichtsfeldgröße für die Zuordnung der Scorewerte entsprechend Elston und Ellis (Elston, CW et al. 1991). Die hier angegebenen Kriterien gelten für einen Gesichtsfelddurchmesser von 0,45 mm entsprechend einem einfachen Lichtmikroskop mit Sehfeldzahl 18 ohne Großfeldtubus.“¹¹

Summenscore	Malignitätsgrad	G-Gruppe	Definition
3,4,5	Gering	G1	Gut differenziert
6,7	Mäßig	G2	Mäßig differenziert
8,9	Hoch	G3	Schlecht differenziert

1.4. Östrogen

Östrogene gehören in die Gruppe der Steroidhormone, die drei wichtigsten Unterarten sind: Östron (E1), Östradiol (E2) und Östriol (E3). Ihre Grundstruktur besteht aus 18 Kohlenstoffatomen in Form von drei Benzolringen und einem Zykllopentanring, sie unterscheiden sich durch ihre Hydroxylgruppen. Östradiol hat die stärkste biologische Wirkung der dreien und ist das Leithormon der Geschlechtsreife. In der Postmenopause übernimmt diese Funktion das Östron, welches nur noch 1/3 der Wirkung des Östradiols besitzt. Ursprungssubstanzen der Östrogene sind die Androgene, welche durch Aromatase umgewandelt werden. Die Hauptbildungsorte sind die Granulosa- und Theka-interna Zellen der Follikel, sowie zu einem kleineren Teil auch die Nebennieren. In der Postmenopause stammt das Östrogen hauptsächlich aus dem Binde-, Fett- und Muskelgewebe.¹²

¹⁰ Elston und Ellis, „Pathological Prognostic Factors in Breast Cancer. I. The Value of Histological Grade in Breast Cancer“.

¹¹ „S3_Brustkrebs_Update_2012_OL_Langversion.pdf“, 323.

¹² Stauber und Weyerstahl, *Gynäkologie und Geburtshilfe*, 85–89.

Reguliert werden die Östrogene durch den hypothalamischen- hypophysären- ovariellen Regelkreislauf. Dabei schüttet der Hypothalamus GnRH aus, welches im Hypophysenvorderlappen für LH und FSH Freisetzung sorgt. Dieser Stimulus führt zur Östrogen- und Gestagenproduktion der Ovarien. Auf jeder Stufe gibt es eine negative Rückkopplung zur Regulierung der Hormonproduktion. Zusätzlich regulieren sich die Hormone über die Blutspiegel, sodass es je nach Höhe der Konzentration entweder zu einer Verstärkung oder Hemmung der Ausschüttung kommt.¹³

Östrogene sind wichtig für die Reifung und Entwicklung der primären und sekundären Geschlechtsmerkmale der Frau. Insbesondere für das Wachstum und die Proliferation der Brustdrüse (s.u.), des Uterus, der Zervix und der Vagina. Während des Menstruationszyklus sorgt es für die Proliferation des Endometriums und des Vaginalepithels, die Öffnung der Zervix, die Zunahme der Menge und der Spinnbarkeit des Zervixsekretes, sowie für die Abnahme der Viskosität. Des Weiteren hat es eine knochenprotektive Wirkung durch Stimulation der Osteoblasten.¹⁴

Während der Pubertät sorgt Östradiol in der Brust für das Wachstum und die Pigmentation der Areola und die Differenzierung des duktales Gewebes. Das alveoläre Brustgewebe wird durch Gestagene gefördert. Die endgültige Differenzierung erfolgt jedoch erst in der Schwangerschaft durch eine Kombination verschiedener Hormone, wie beispielsweise Östrogen, Progesteron und Prolaktin. Prolaktin sorgt zusätzlich für die Ausbildung der Östrogenrezeptoren. In jedem Zyklus unterliegt die Brust hormonellen Schwankungen und damit auch Veränderungen ihrer Beschaffenheit. Dadurch hat sie in der späten Lutealphase ihre maximale Größe und weist die höchste Mitoserate auf. Auf der anderen Seite nimmt die Anzahl der Östrogenrezeptoren in dieser Zeit ab, die Progesteronrezeptorzahl bleibt jedoch gleich.¹⁵

¹³ Ebd., 78–79,85.

¹⁴ Ebd., 88–89.

¹⁵ Olaf Ortmann, „Benigne Brusterkrankungen“, 581–582.

1.5. Östrogenrezeptoren

Die Östrogenrezeptoren gehören zur Gruppe der Steroidhormonrezeptoren und sind ligandenabhängige nukleäre Transkriptionsfaktoren.¹⁶ Der schon lange bekannte Östrogenrezeptor α , sowie der seit 1996 bekannte ER β haben eine Gesamthomologie von 47%. Codiert wird ER β von dem Gen ESR2 auf Chromosom 14q22-25. Er besteht aus 530 Aminosäuren (AS). ER α besteht hingegen aus 595 Aminosäuren und ist auf Gen ESR1 lokalisiert.¹⁷ Beide Rezeptoren kommen in verschiedenen Geweben, wie beispielsweise der Brust, dem Urogenitaltrakt, den Knochen, dem Gastrointestinaltrakt oder auch dem ZNS vor, und zwar sowohl gemeinsam als auch alleine.¹⁸

Wie alle Steroidhormonrezeptoren ist auch der Östrogenrezeptor β aus 6 Regionen (A – F) mit unterschiedlichen Funktionen aufgebaut. Das N-terminale Ende A/B hat lediglich eine ca. 20% Übereinstimmung mit ER α . Dies könnte ein Hinweis auf die unterschiedliche Wirkungsweise der beiden Rezeptoren sein,¹⁹ da diese Region die activation function 1 (AF-1- Domäne) enthält. Die AF-1 ist ligandenunabhängig und zeigt eine promoter- und zellspezifische Aktivität. Hier wirkt auch der MAP- Kinaseregulationsweg (Mitogen aktivierte Proteinkinase). Er ist eine Verbindung zwischen wachstumsfaktorvermittelter Signalübertragung und Steroidhormonen. Des Weiteren ist hier eine koregulatorische Domäne enthalten, diese wird im Zusammenspiel mit Ko-Aktivatoren und –Repressoren benötigt. Die darauf folgende C-Domäne enthält Zinkfinger, welche der DNA Bindung dienen. Die DNA-Bindungsdomäne (DBD) zeigt eine große Homologie zu ER α , sie ist wichtig für die Rezeptordimerisierung und Bindung an spezifische DNA Abschnitte, die sogenannten estrogen responsive elements (ERE).²⁰ Die D- Region ist die hinge- Region zwischen der DBD und der LBD, sie zeigt eine große Flexibilität und ist von Bedeutung für die nukleäre Translokation. Sie hat eine Übereinstimmung von ca. 30% mit ER α . Darauf folgt die Ligandenbindungsdomäne (LBD), an der Region E. Sie dient u.a. der Dimerisierung des ER β und der Ligandenbindung, wobei ihre Kapazität kleiner ist als die von ER α . Dies führt zu einer veränderten Östrogenaffinität, insbe-

¹⁶ Mitter, Ortmann, und Treeck, „Estrogen receptor Beta isoforms -- functions and clinical relevance in breast cancer“.

¹⁷ Häring u. a., „Role of estrogen receptor β in gynecological cancer“.

¹⁸ Speirs, „Correspondence re“.

¹⁹ Zhao, „Estrogen receptor β “.

²⁰ Nilsson u. a., „Mechanisms of estrogen action“.

sondere zu einer erhöhten Binfähigkeit von ER β mit Phytoöstrogenen.²¹ Bindet ein Ligand an die LBD triggert dieser eine Konformationsänderung des Rezeptors und führt in der Folge zu einer veränderten Transkriptionsrate von Östrogen regulierten Genen. Des Weiteren führt die Bindung zu einer Translokation des Rezeptors in den Zellkern.²² Außerdem enthält die E-Domäne die AF-2 Region, welche hormonabhängig arbeitet. Im Gegensatz zu ER α gibt es bei ER β keine hinge-Domänen induzierte Interaktion zwischen AF-1 und AF-2, da die AF-1 Region nicht mit SCR1 (steroid receptor coactivator 1) interagieren kann. Dies führt zu einer verminderten Transaktivierung von ER β , da dieser Vorgang nur mit Hilfe der AF-2 geschieht.²³ Die letzte Domäne ist die F-Region am C-terminalen Ende, deren Funktion bisher weitestgehend ungeklärt ist, jedoch wird eine Interaktion mit weiteren Transkriptionsfaktoren vermutet.^{24,25,26} Erste Studien konnten zeigen, dass ein Zusammenhang mit der Regulation des proteasomabhängigen Abbaus besteht.²⁷

Die Zuordnung der einzelnen Abschnitte zu den Exons ist wie folgt: Exon 1 repräsentiert die A/B-Region. Exon 2 und 3 codieren für einen Teil der C-Domäne, der restliche Anteil wird von Exon 4 übernommen. Die Exone 5-8 enthalten die Informationen der Region E und das Exon 8 enthält zusätzliche Informationen für die F-Domäne.²⁸

Das Expressionslevel des Rezeptors wird reguliert durch Hypermethylierung des Promoters. Steigt diese, nimmt die mRNA ab, hemmt man jedoch die DNA Methyltransferase und damit auch den Methylierungsprozess, so steigt auch die ER β Expression wieder an.²⁹ Daher vermutet man, dass dieser Vorgang eine wichtige Rolle in der Geninaktivierung (gene silencing) spielt.³⁰

²¹ Le Romancer u. a., „Cracking the Estrogen Receptor’s Posttranslational Code in Breast Tumors“, 598.

²² Nilsson u. a., „Mechanisms of estrogen action“.

²³ Zwart u. a., „The Hinge Region of the Human Estrogen Receptor Determines Functional Synergy between AF-1 and AF-2 in the Quantitative Response to Estradiol and Tamoxifen“.

²⁴ Zhao, „Estrogen receptor β “.

²⁵ Mitter, Ortmann, und Treeck, „Estrogen receptor Beta isoforms -- functions and clinical relevance in breast cancer“.

²⁶ Thomas und Gustafsson, „The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy“.

²⁷ Tateishi u. a., „Turning Off Estrogen Receptor β “.

²⁸ Ascenzi, Bocedi, und Marino, „Structure-Function Relationship of Estrogen Receptor Alpha and Beta“.

²⁹ Zhao, „Estrogen receptor β “.

³⁰ Rody u. a., „Methylation of Estrogen Receptor Beta Promoter Correlates with Loss of ER-Beta Expression in Mammary Carcinoma and Is an Early Indication Marker in Premalignant Lesions“.

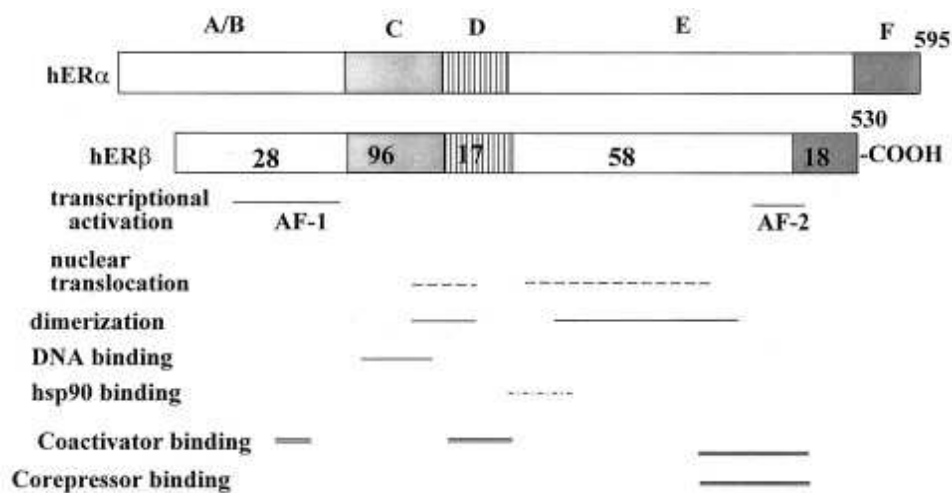


Abbildung 1 zeigt die Homologien zwischen ER α und ER β , sowie die Funktionen der einzelnen Domänen. Die Zahlen geben die prozentuale Übereinstimmung der Aminosäuren zwischen ER α und ER β an.³¹

Im Gegensatz zu ER α findet man ER β sowohl im Zellkern, als auch im Zytoplasma³² bzw. den Mitochondrien und auch in der Plasmamembran.³³ Die Signalübertragung kann ligandenunabhängig, sowie ligandenabhängig geschehen. Im Folgenden werden alle Aktivierungsmöglichkeiten kurz erläutert. Zunächst der klassischen, ligandenabhängigen Weg (vgl. Abb. 2, Weg A): Nachdem Östrogen durch die Zellmembran diffundiert ist, bindet es an die LBD des ER. Infolge dessen lösen sich die Hitzeschockproteine der E-Domäne und der Rezeptor dimerisiert. Entweder homolog zu ER β /ER β - Dimeren oder zu Heterodimeren ER α /ER β . Darauf folgt die Bindung des Rezeptors an das zu regulierende Gen mit Hilfe des ERE und die nachfolgende Aktivierung von Koaktivatoren oder Korepressoren. Je nach Zusammenspiel kommt es im nächsten Schritt zu einer vermehrten oder verminderten Gentranskription. Der Komplex aus Rezeptor und weiteren Faktoren wird durch Methylierung, Acetylierung oder andere Modifikationen wieder gelöst, wobei der Rezeptor durch simultane Ubiquitinierung entweder weiter aktiv bleibt, oder abgebaut wird. Die Bindung von Östrogen an ER α führt regelhaft zu einer Transkriptionsaktivierung. Bindet Östrogen an ER β , kann es einerseits aktivierend wirken, andererseits, bei Bindung an die AP-1 site, auch die Transkriptionsaktivität inhibieren.³⁴ Eine weitere Möglichkeit ist die Interaktion des Rezeptors mit Kotranskriptions-

³¹ Klinge, „Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors“.

³² Younes und Honma, „Estrogen receptor β “.

³³ Leung u. a., „Estrogen Receptor-Beta and Breast Cancer“.

³⁴ Sotoca u. a., „Human ER α and ER β splice variants“.

faktoren wie AP-1, SP-1, CREB, NF- κ B, STAT5 und weiteren (vgl. Abb. 2, Weg B).^{35,36} Die ligandenunabhängige Aktivierung wird durch verschiedene Wachstumsfaktorrezeptoren, wie beispielsweise den insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R), initiiert. Sie sorgen für Phosphorylierung und somit Aktivierung des ER mit Hilfe von Proteinkinasen (vgl. Abb. 2, Weg C). Die letzte Möglichkeit der Aktivierung ist der nicht-genetische Weg. Mit dessen Hilfe kann der ER innerhalb von 3-15 Minuten nach Östrogenkontakt beispielsweise Her2neu aktivieren.

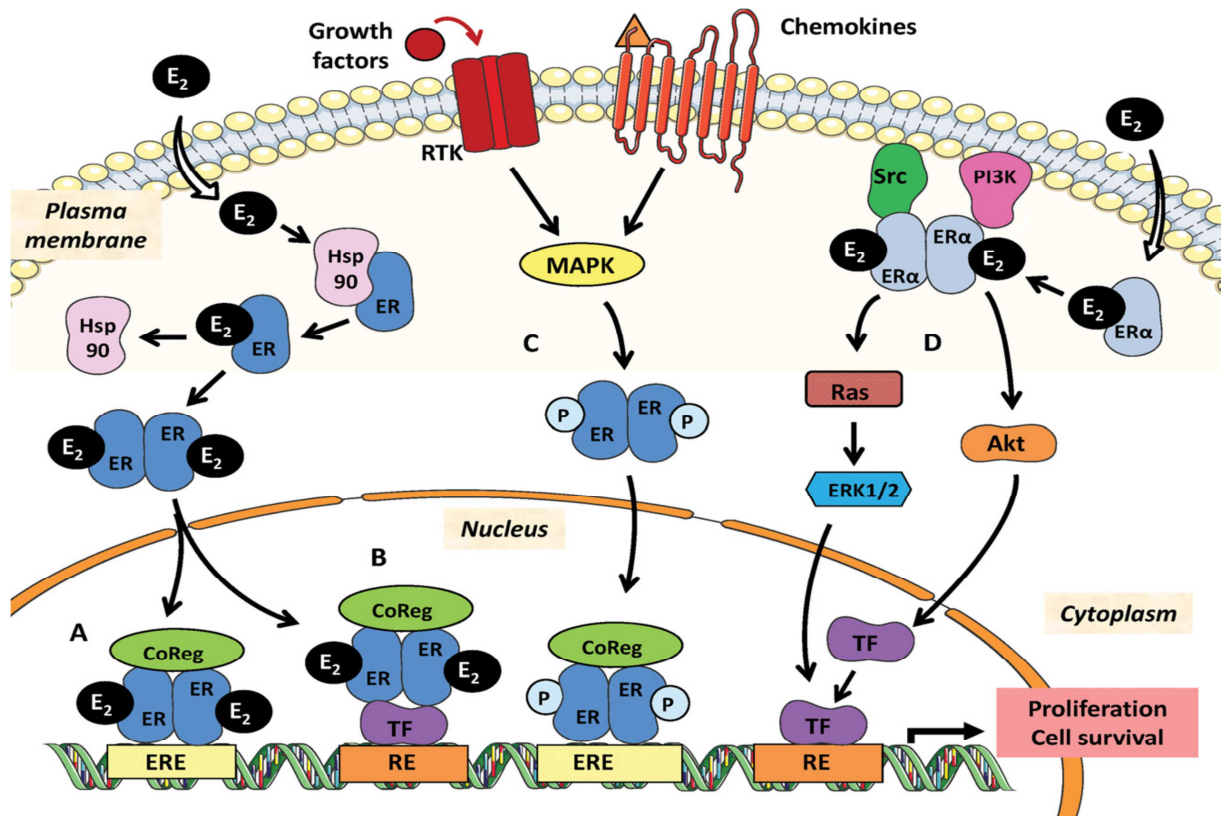


Abbildung 2 aus „Cracking the Estrogen Receptor’s Posttranslational Code in Breast Tumors“: „ER β Signalweg. Wenn ER α und ER β den gleichen Signalweg haben, benennen wir es ER; anderenfalls ist der ER Subtyp spezifiziert. Vier verschiedene Östrogensignalwege des ER werden gezeigt. Signalweg A wird der klassische genomische Signalweg genannt; E₂gebundene ER dimerisieren und gehen nach Konformationsänderung in den Nucleus und binden die ERE und rekrutieren Koaktivatoren, welche die Transkription von Zielgenen aktivieren. Signalweg B, der nicht klassische genomische Signalweg, beinhaltet ER Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren wie AP-1. Signalweg C ist E₂ unabhängig und aktiviert die ER durch Wachstumsfaktor induzierte Phosphorylierung. Signalweg D, der nicht genomische Signalweg, beinhaltet eine kleine Gruppe ER, welche nahe der Membran lokalisiert sind und durch Rekrutierung von Proteinkinasen (Src und PI3K) Signalkaskaden (Akt, MAPK) aktivieren. All diese Signalwege konvergieren zu Zellproliferation und Zellüberleben. RE, responsive element für andere Transkriptionsfaktoren; P, Phosphorylierung; RTK, tyrosin kinase receptor; CoReg, coregulators; TF, transcription factor; Hsp90, heat shock protein 90.“³⁷

³⁵ Mitter, Ortmann, und Treack, „Estrogen receptor Beta isoforms -- functions and clinical relevance in breast cancer“.

³⁶ Thomas und Gustafsson, „The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy“.

³⁷ Le Romancer u. a., „Cracking the Estrogen Receptor’s Posttranslational Code in Breast Tumors“, 600.

1.6. Isoformen des Östrogenrezeptor β

Der Östrogenrezeptor β besteht aus acht Exons, sowie mindestens³⁸ zwei nicht translatierten Exons ON und OK am 5' Ende, und einem Exon cx am 3' Ende. Durch alternatives Splicen, exon skipping, sowie alternative Nutzung des Exons cx können daraus verschiedene ER β Isoformen entstehen (s. Abb. 3). Die verschiedenen Varianten findet man sowohl in gesundem Gewebe, als auch in verändertem.³⁹ Die 5 wichtigsten Transkripte sind die folgenden Isoformen: ER β 1, entspricht dem Wildtyp, sowie β 2 – β 5, diese Varianten enthalten weder Promoter ON noch OK, sodass weitere Promoter vermutet werden. Gemeinsam ist diesen Formen Exon 1-7, sie unterscheiden sich jeweils durch individuelle Sequenzen an ihrem C-Terminus, beginnend ab AS 469 in der LBD. Die unterschiedliche Ausprägung des Exon 8 führt zu einer jeweils veränderten AF-2. Infolgedessen interagieren diese Formen verschieden mit Liganden und Kofaktoren.⁴⁰

ER β 1 enthält 530 AS, ist der Wildtyp und entspricht der full length Form. Seit neuestem sind sowohl eine Kurzform, welche am N-terminus durch Proteolyse verkürzt ist, als auch eine Langform von ER β 1 (entspricht der ursprünglichen ER β 1 Form) bekannt. Es wird vermutet, dass sie unterschiedliche Funktionen bzw. Einflüsse auf die Funktionsweise des Rezeptors haben könnten. Insbesondere die kürzere Form könnte die stabilere Variante sein, da ihr die Bindungsstelle der Ubiquitinligase fehlt, welche normalerweise für den Rezeptorabbau nötig ist.^{41,42} Beta 1 kann durch Heterodimerisierung mit den Formen β 4 und 5 eine verstärkte ligandenabhängige Transaktivierung zeigen.⁴³ Außerdem kann es die Expression von ER α Zielgenen, welche den Zellzyklus beeinflussen, hemmen. Dafür hat beta 1 zwei Möglichkeiten: einerseits über Heterodimerbildung oder durch Aktivierung von antiproliferativen Signalen, welche die pro-proliferativen Signale von ER α neutralisieren.⁴⁴ Des Weiteren kann es in vitro in α + Zellen die Zellproliferation, das Zellwachstum und die Angiogenese durch Interaktion mit verschiedenen Proteinen inhibieren. Eine weitere Eigenschaft von beta 1 ist seine Assoziation mit einem verbesserten Überleben bei triple-negativen Tumoren und ein besseres

³⁸ Smith u. a., „Expression of oestrogen receptor β isoforms is regulated by transcriptional and post-transcriptional mechanisms“.

³⁹ Chi u. a., „Differential expression of estrogen receptor beta isoforms in human breast cancer tissue“.

⁴⁰ Leung u. a., „Estrogen Receptor (ER)-Beta Isoforms“.

⁴¹ Savinov u. a., „Matrix Metalloproteinase 26 Proteolysis of the NH2-Terminal Domain of the Estrogen Receptor Beta Correlates with the Survival of Breast Cancer Patients“.

⁴² Tateishi u. a., „Turning Off Estrogen Receptor β “.

⁴³ Zhao, „Estrogen receptor β “.

⁴⁴ Leung u. a., „Estrogen Receptor-Beta and Breast Cancer“.

Ansprechen auf die Tamoxifentherapie.⁴⁵ Ähnliche Beobachtungen wurden in Studien mit MCF7 Zellen, einer Brustkrebszelllinie⁴⁶, gemacht: Es konnte nachgewiesen werden, dass diese Zellen eine erhöhte Sensitivität für den Tamoxifenmetaboliten Endoxifen haben, wenn sie ER β 1 exprimieren.⁴⁷ Wie bei allen Isoformen und Splicevarianten gibt es auch für den Wildtyp weitere Studien, die gegensätzliche Ergebnisse präsentieren. Vor allem in Untersuchungen mit ER α negativem Gewebe führt eine Überexpression von ER β 1 häufig zu einem Wachstumsstimulus. Mögliche Ursachen für die unterschiedlichen Resultate können darin begründet liegen, dass verschiedene Zellkulturen verwendet werden, der allgemeine Zellstatus, sowie die Höhe des ER β Levels unbekannt sind.⁴⁸

Isoform β 2 (= ER β cx) besteht aus 495 AS und unterscheidet sich vom Wildtyp durch 26 AS am C-Terminus. Da die Aminosäuren im Bereich der AF-2 reduziert wurden, verliert der Rezeptor seine Ligandenbindungsfähigkeit.⁴⁹ β 2 kann durch Dimerisierung mit dem ER α Wildtyp die Transkriptionsaktivität von ER α beeinflussen, insbesondere reduzieren. Diese Interaktion könnte eine mögliche Erklärung sein, wie ER α positive Karzinome eine Tamoxifenresistenz ausbilden. Auffällig ist außerdem, dass β 2 mit einer hohen Expressionsrate, welche die des Wildtyps übersteigt, in Karzinomen auftritt.⁵⁰ Gleichzeitig tritt beta 2 vermehrt in pathologischen Gewebe im Vergleich zu gesundem Gewebe auf (54% vs. 9%).⁵¹ Dies wurde in verschiedenen Studien gezeigt und kann ein Hinweis auf seine Rolle im Verlauf der Tumorgenese sein.⁵² Bei dieser Isoform muss die zytoplasmatische von der nukleären Ausprägung unterschieden werden: So nimmt die nukleäre Form bei vaskulärer Invasion bzw. in Metastasen ab, außerdem ist sie mit einem verbesserten overall survival und krankheitsfreien Überleben, sowie einem besseren Ansprechen auf die endokrine Therapie assoziiert. Diese Unterform sorgt vermutlich auch in der Studie von Vinayagam et al. dafür, dass die Autoren höhere beta 2 Spiegel mit einem verbesserten Outcome nach Tamoxifentherapie assoziieren konnten⁵³ und in weiteren Studien postmenopausale Frauen mit einem Karzinom eine verminder-

⁴⁵ Thomas und Gustafsson, „The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy“.

⁴⁶ Soule u. a., „A Human Cell Line From a Pleural Effusion Derived From a Breast Carcinoma“.

⁴⁷ Wu u. a., „Estrogen Receptor-Beta Sensitizes Breast Cancer Cells to the Anti-Estrogenic Actions of Endoxifen“.

⁴⁸ Murphy und Leygue, „The Role of Estrogen Receptor- β in Breast Cancer“.

⁴⁹ Taylor, Martin-Hirsch, und Martin, „Oestrogen receptor splice variants in the pathogenesis of disease“.

⁵⁰ Mitter, Ortmann, und Treack, „Estrogen receptor Beta isoforms -- functions and clinical relevance in breast cancer“.

⁵¹ Omoto u. a., „Evaluation of oestrogen receptor β wild-type and variant protein expression, and relationship with clinicopathological factors in breast cancers“.

⁵² Esslimani-Sahla u. a., „Increased Estrogen Receptor Bcx Expression during Mammary Carcinogenesis“.

⁵³ Vinayagam u. a., „Association of Oestrogen Receptor Beta 2 (ER Beta 2/ER Beta Cx) with Outcome of

te Expression aufwiesen, als prämenopausale gesunde Frauen⁵⁴. Die zytoplasmatische $\beta 2$ Form hingegen ist mit einem schlechteren Outcome, schlechteren Ansprechen auf Chemotherapie⁵⁵, höherem Grading, Fernmetastasen und Rezidiven assoziiert.^{56,57} Allerdings gibt es auch gegenteilige Ergebnisse, die beta 2 eine protektive Wirkung nachsagen. Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten einerseits auf Grund des unterschiedlichen hormonellen Status bestehen, oder ihren Ursprung in der unterschiedlichen Lokalisation der Rezeptoren (zytoplasmatisch oder nukleär) haben.

ER $\beta 3$ ist eine u.a. hodenspezifische Variante und wird hier nicht weiter erläutert. Außerdem gibt es noch eine seltene ER β 548 Variante, dessen Funktion unbekannt ist. Auch auf ER $\beta 4$ wird hier nicht eingegangen, da sie für diese Arbeit nicht relevant war.

ER $\beta 5$ enthält 472 AS, ist am C-terminus in Vergleich zum Wildtyp verkürzt⁵⁸ und hat daher die Ligandenbindungsfähigkeit eingebüßt.⁵⁹ Genau wie beta 2 kann es Dimere mit dem ER β Wildtyp bilden und diesen beeinflussen, allerdings es hat eine größere Affinität zu ER α Heterodimeren.⁶⁰ Keiner der beiden Isoformen kann jedoch Homodimere formen⁶¹. Untersuchungen konnten zeigen, dass seine Expressionsstärke in normalem und erkranktem Gewebe identisch ist.⁶² Trotzdem konnte auch nachgewiesen werden, dass seine Expression zu einem verbesserten overall survival und einem verbesserten Rezidiv freien Überleben führt.^{63,64} Beta 5 besitzt keine eigene Transkriptionsaktivität.⁶⁵

Adjuvant Endocrine Treatment for Primary Breast Cancer--a Retrospective Study“.

⁵⁴ Girault u. a., „Altered expression pattern of alternatively spliced estrogen receptor β transcripts in breast carcinoma“.

⁵⁵ Shaaban u. a., „Nuclear and Cytoplasmic Expression of ER $\beta 1$, ER $\beta 2$, and ER $\beta 5$ Identifies Distinct Prognostic Outcome for Breast Cancer Patients“.

⁵⁶ Yan u. a., „Nuclear and Cytoplasmic Expressions of ER $\beta 1$ and ER $\beta 2$ Are Predictive of Response to Therapy and Alters Prognosis in Familial Breast Cancers“.

⁵⁷ Shaaban u. a., „Nuclear and Cytoplasmic Expression of ER $\beta 1$, ER $\beta 2$, and ER $\beta 5$ Identifies Distinct Prognostic Outcome for Breast Cancer Patients“.

⁵⁸ Poola u. a., „Estrogen Receptor α -Negative Breast Cancer Tissues Express Significant Levels of Estrogen-Independent Transcription Factors, ER $\beta 1$ and ER $\beta 5$ “.

⁵⁹ Leung u. a., „Estrogen Receptor (ER)-Beta Isoforms“.

⁶⁰ Taylor, Martin-Hirsch, und Martin, „Oestrogen receptor splice variants in the pathogenesis of disease“.

⁶¹ Leung u. a., „Estrogen Receptor (ER)-Beta Isoforms“.

⁶² Girault u. a., „Altered expression pattern of alternatively spliced estrogen receptor β transcripts in breast carcinoma“.

⁶³ Shaaban u. a., „Nuclear and Cytoplasmic Expression of ER $\beta 1$, ER $\beta 2$, and ER $\beta 5$ Identifies Distinct Prognostic Outcome for Breast Cancer Patients“.

⁶⁴ Davies u. a., „Correlation of mRNA for Oestrogen Receptor Beta Splice Variants ERbeta1, ERbeta2/ERbetacx and ERbeta5 with Outcome in Endocrine-Treated Breast Cancer“.

⁶⁵ Leung u. a., „Estrogen Receptor (ER)-Beta Isoforms“.

Des Weiteren entstehen durch alternatives Splicen noch folgende Exondeletionsvarianten: $\Delta 2$, $\Delta 3$, $\Delta 4$, $\Delta 5$, $\Delta 6$, $\Delta 1/2$, $\Delta 2/5$, $\Delta 2/6$, $\Delta 4/5$, $\Delta 5/6$, $\Delta 1/2/2$, $\Delta 2/3/4$, $\Delta 2/3/6$, $\Delta 2/5/6$ und $\Delta 4/5/6$, $\Delta 1/2/5/6$ wobei nicht alle im Brustgewebe nachgewiesen werden konnten.^{66,67}

Zu nennen sind hier die folgenden Varianten:

Die häufigste Deletionsvariante ist $\Delta 2$, bei ihr gibt es keine Expressionsunterschiede im Vergleich von normalem zu erkranktem Gewebe. Sehr häufig tritt sie zusammen mit den Deletionen von Exon 5 oder 6 auf. Das Entfernen dieser Exons führt zu frame shift Mutationen, das heißt, dass komplette Leseraster verschiebt sich und die Translation endet früher. Somit entstehen neuartige Rezeptoren. Diese verbleiben, auf Grund fehlender Kernlokalisierungsmerkmale im Zytoplasma.⁶⁸

$\Delta 3$ hat 39 AS weniger, dies führt dazu, dass eine höhere Hormonkonzentration benötigt wird, um die Transkriptionsaktivität zu beeinflussen. Außerdem wurden veränderte Mechanismen der Kofaktorrekutierung nachgewiesen.⁶⁹

Die Entfernung von Exon 4, dies entspricht 336 Basenpaaren, führt nicht zu einer Veränderung des Leserasters, allerdings fehlen dieser Splicevariante die Kernlokalisierungsmerkmale, sodass sie im Zytoplasma verbleibt.⁷⁰ Darüber hinaus fehlen Teile der hinge-Region und der E-Domäne, welche Östrogen bindet.⁷¹

$\Delta 5$, d.h. eine Splicevariante ohne das Exon 5, hat keine Ligandenbindungsdomäne, sodass es ohne Östrogen transkribieren kann.⁷² Es wird vermutet, dass diese Form sowohl die Funktion von ER α , als auch von ER β dosisabhängig beeinflussen kann, da es eine dominant-negative Wirkung auf Östrogen abhängige Transaktivierung hat. Dies lässt eine Funktion in Richtung

⁶⁶ Mitter, Ortmann, und Treack, „Estrogen receptor Beta isoforms -- functions and clinical relevance in breast cancer“.

⁶⁷ Treack u. a., „Novel Estrogen Receptor Beta Transcript Variants Identified in Human Breast Cancer Cells Affect Cell Growth and Apoptosis of COS-1 Cells“.

⁶⁸ Poola, Abraham, und Baldwin, „Identification of ten exon deleted ER β mRNAs in human ovary, breast, uterus and bone tissues“.

⁶⁹ Price u. a., „A Splice Variant of Estrogen Receptor Beta Missing Exon 3 Displays Altered Subnuclear Localization and Capacity for Transcriptional Activation“.

⁷⁰ Poola, Abraham, und Baldwin, „Identification of ten exon deleted ER β mRNAs in human ovary, breast, uterus and bone tissues“.

⁷¹ Pfeffer u. a., „Estrogen receptor variant messenger RNA lacking exon 4 in estrogen-responsive human breast cancer cell lines“.

⁷² Mitter, Ortmann, und Treack, „Estrogen receptor Beta isoforms -- functions and clinical relevance in breast cancer“.

eines Tumorsuppressors vermuten. Sein Proteinprodukt ist identisch mit dem des Wildtyps, obwohl angenommen wird, dass diese Variante ein Abkömmling der Isoform beta 2 ist.⁷³

ER β Δ 6 ist eine relativ häufige Splicevariante verglichen mit ER α Δ 6. Sie führt zu einem trun-kierten Translationsprodukt.

Exon 7 Deletionen sind sehr selten und schwer nachzuweisen, daher wird diesem Exon eine wichtige Funktion für ER β nachgesagt, beispielsweise für die Stabilität des Rezeptors oder seiner mRNA. Exon 6 und 7 sind beide Teil der Ligandenbindungsdomäne und AF-2 Region.⁷⁴ Da diese Splicevariante sehr selten ist, sind sie nicht in diese Arbeit einbezogen.

Bei Multideletionsvarianten, beispielsweise bei der Kombination von Δ 2 und Δ 5, entstehen inkorrekte Proteine, welche Schwierigkeiten mit der Liganden- und bzw. oder DNA-Bindung haben und somit nicht oder gemindert funktionstüchtig sind.⁷⁵ Fehlen jedoch nur Teilfunk-tionen kann die Splicevariante vor allem zu Effekten führen, indem sie die Hauptvarianten beeinflusst bzw. inaktiviert: Beispielsweise durch kompetitive Ligandenbindung. Dabei konkurrieren beide Versionen um einen Liganden, sodass für die funktionierende Variante letztlich weniger Liganden verfügbar sind. Weitere Möglichkeiten sind die Heterodimerisierung mit gleichzeitiger Inaktivierung, oder Bindung der Exondeletionsvariante an DNA ohne Tran-skriptionsaktivität. Dies führt dazu, dass die funktionstüchtige Variante dort nicht mehr bin-den kann und so indirekt in ihrer Wirkung geschwächt wird.⁷⁶

Das Problem verschiedener Studien ist, dass sich die Isoformen jeweils am C-terminalen En-de unterscheiden, dies führt dazu, dass gängige Antikörper, welche mit dem N-terminalen Ende interagieren, die unterschiedlichen Varianten nicht erkennen und es keine exakten Ergebnisse gibt. Heut zu Tage ist bekannt, dass beispielsweise die Formen β 1, 2 und 5 die Transkriptionsaktivität von ER α beeinflussen bzw. blockieren können. Diese Interaktion könnte eine wichtige Rolle bei ER α positiven Tumoren innehaben, die trotzdem eine Tamoxi-

⁷³ Inoue u. a., „An Estrogen Receptor β Isoform That Lacks Exon 5 Has Dominant Negative Activity on both ER α and ER β “.

⁷⁴ Herynk, „Estrogen Receptor Mutations in Human Disease“.

⁷⁵ Poola, Abraham, und Baldwin, „Identification of ten exon deleted ER β mRNAs in human ovary, breast, uterus and bone tissues“.

⁷⁶ Taylor, Martin-Hirsch, und Martin, „Oestrogen receptor splice variants in the pathogenesis of disease“.

fenresistenz aufweisen.⁷⁷ Hinweise das ERβ Isoformen mit dem unterschiedliche Ansprechen alpha positiver Karzinome zu tun haben zeigen auch Murphy et al.⁷⁸

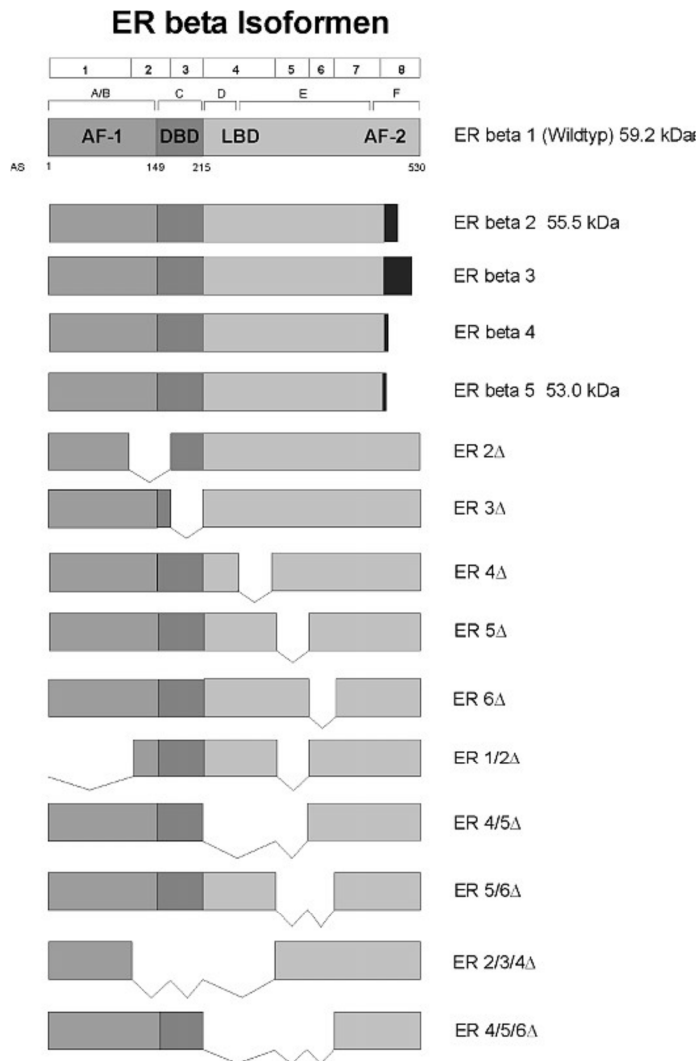


Abbildung 3 aus „Östrogenrezeptor- β -Isoformen – Funktionen und klinische Bedeutung bei Brustkrebs“: „Schematische Darstellung der mRNA des humanen ER β 1(Wildtyp) und seiner Isoformen. Das ER β -Gen ist aus 8 Exons aufgebaut. Die verschiedenen Deletionsvarianten zeichnen sich durch den Verlust eines oder mehrerer Exons aus.“⁷⁹

⁷⁷ Speirs u. a., „Oestrogen receptor β “.

⁷⁸ Murphy u. a., „Relationship of Coregulator and Oestrogen Receptor Isoform Expression to de Novo Tamoxifen Resistance in Human Breast Cancer“.

⁷⁹ Mitter, Ortmann, und Treack, „Estrogen receptor Beta isoforms -- functions and clinical relevance in breast cancer“.

1.7. Bedeutung des Östrogenrezeptor β

ER β gilt als Tumorsuppressorgen und kommt natürlicherweise im Brustgewebe vor, wobei seine Anzahl die von ER α übersteigt. Im Laufe der Karzinogenese kehrt sich dieses Verhältnis jedoch um.^{80,81} Mögliche Mechanismen der Downregulation von ER β sind u.a. posttranskriptionale Modifikationen, wie zum Beispiel Methylierungsvorgänge oder microRNAs.⁸² Auch PES1 (Pescadillo ribosomal biogenesis factor 1) könnte hierbei eine Rolle spielen, da es die beiden Östrogenrezeptoren auf verschiedene Weise beeinflusst, beispielsweise durch Stabilisierung von ER α und Destabilisierung von ER β .⁸³

Darüber hinaus konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass die Expression von ER β mit einer besseren Prognose assoziiert ist. Insbesondere wird dies deutlich bei tripplen negativen (ER neg., PR neg., HER2 neg.) Tumoren, bei denen Patienten mit positivem ER β Status ein besseres Überleben haben, als diejenigen, die ER β negativ sind.⁸⁴ Außerdem gibt es trotz ER α negativem Status ein Ansprechen auf Tamoxifen, wenn die Patienten positiv für ER β sind.^{85,86} Bei einem ER β knockout hingegen gibt es ein vermindertes Ansprechen auf Tamoxifen und es kommt zu einer überschießenden Zellproliferation.⁸⁷ Eine wichtige Bedeutung von ER β in Bezug auf die Tamoxifentherapie lässt sich auch daraus schließen, dass 30-70% aller ER α positiven Patienten im Laufe der Therapie eine Tamoxifenresistenz entwickeln.⁸⁸ Die Ursachen dafür sind bislang unbekannt. Allerdings weiß man, dass 55% aller Mammakarzinome zu Beginn für ER α und β positiv sind, im Verlauf der Erkrankung die Expression von ER β jedoch abnimmt, sodass dieser Vorgang die mögliche Ursache der Resistenz sein könnte.⁸⁹ Auf Grund der scheinbar starken Einflussnahme von ER β sollte daher überlegt werden, ob die Patientengruppe mit dem Profil ER α -/ER β + nicht auch eine Tamoxi-

⁸⁰ Häring u. a., „Role of estrogen receptor β in gynecological cancer“.

⁸¹ Mitter, Ortman, und Treack, „Estrogen receptor Beta isoforms -- functions and clinical relevance in breast cancer“.

⁸² Zhu u. a., „Dynamic Regulation of Estrogen Receptor-Beta Expression by DNA Methylation during Prostate Cancer Development and Metastasis“.

⁸³ Thomas und Gustafsson, „Targeting PES1 for restoring the ER β “.

⁸⁴ Honma u. a., „Clinical importance of estrogen receptor-beta evaluation in breast cancer patients treated with adjuvant tamoxifen therapy“.

⁸⁵ Younes und Honma, „Estrogen receptor β “.

⁸⁶ Gruvberger-Saal u. a., „Estrogen receptor beta expression is associated with tamoxifen response in ER α -negative breast carcinoma“.

⁸⁷ Latrich, Ortman, und Treack, „Östrogenrezeptor β wirkt antiproliferativ auf humane Mammazellen“.

⁸⁸ AL-BADER u. a., „Real-Time PCR“, 4147.

⁸⁹ Murphy u. a., „New insights into estrogen receptor function in human breast cancer“.

fentherapie erhalten sollte. Dies lässt Hoffnung aufkeimen, für die Patienten, die momentan auf Grund ihrer Rezeptornegativität nur mit Chemotherapie behandelt werden können.

Die Östrogenrezeptoren können wechselseitig die Aktivität des anderen durch Heterodimerbildung beeinflussen. So konnte gezeigt werden, dass ER β , insbesondere beta 2 und 5, die Transkriptionsrate und Proliferation von ER α hemmen kann, in dem er die Bindung weiterer Transkriptionsfaktoren an den Rezeptor verhindert.^{90,91} Darüber hinaus wird die Tumorsuppressorfunktion von ER β 1 und 2 deutlich, in dem nachgewiesen werden konnte, dass sie die Transkriptionsfähigkeit von ER α und damit die Zellzyklusprogression hemmen können.⁹² Auch Sotoca et al. präsentierten in ihren Untersuchungen die Wirkung von ER β , die sie insbesondere als Gegenspielerfunktion beschreiben. In ihren mit Genistein behandelten ER β Zellkulturen kam es zur Downregulation des Zellwachstums, zum Zellzyklusarrest und zur Apoptoseinduktion. Daraus leiteten sie eine verminderte Zellmotilität und vermindertes Potential für Metastasen ab.⁹³

Nicht vergessen werden sollte, dass es immer wieder Studien gibt, die eine gegenteilige Wirkung des Rezeptors, wie eine vermehrte Proliferation oder schlechtere Prognose, nachweisen.^{94,95} Möglicherweise ist dies die Folge einiger Splicevarianten, die sich anders verhalten, als die bisher hauptsächlich untersuchten Hauptformen.

Aus den oben genannten Punkten ergibt sich, dass dem ER β eine größere Bedeutung in der Diagnostik in Hinblick auf Therapie und Prognose eingeräumt werden sollte.

⁹⁰ Hartman u. a., „Tumor Repressive Functions of Estrogen Receptor Beta in SW480 Colon Cancer Cells“, 6100–6106.

⁹¹ AL-BADER u. a., „Real-Time PCR“.

⁹² Lin u. a., „Inhibitory effects of estrogen receptor beta on specific hormone-responsive gene expression and association with disease outcome in primary breast cancer“.

⁹³ Sotoca u. a., „Quantitative Proteomics and Transcriptomics Addressing the Estrogen Receptor Subtype-Mediated Effects in T47D Breast Cancer Cells Exposed to the Phytoestrogen Genistein“.

⁹⁴ Jensen u. a., „Estrogen Receptors and Proliferation Markers in Primary and Recurrent Breast Cancer“, 18. Dezember 2001.

⁹⁵ O’Neill u. a., „Wild-Type Oestrogen Receptor Beta (ERbeta1) mRNA and Protein Expression in Tamoxifen-Treated Post-Menopausal Breast Cancers“.

2. Fragestellung

In einem Review von 2012 untersuchten Leung et al. die bisher veröffentlichten Daten zu ER β . Dabei stellten sie fest, dass in 15 Jahren Forschung zum Thema Östrogenrezeptor beta noch immer viele Fragen offen sind. Insbesondere die Isoformen des Rezeptors betreffend.

In der Diagnostik wird bisher lediglich der ER α Wildtyp bestimmt und die Therapie danach ausgerichtet.⁹⁶ Jedoch konnten verschiedenen Studien, unter anderem von Al-Bader et al. 2011, nachweisen, dass ER negativ deklarierte Tumoren, sowohl Splicevarianten von ER α , als auch von ER β (Wildtyp und/oder Varianten) enthalten und deren Genprodukte auch exprimiert werden.⁹⁷ Die meist durchgeführten Immunhistochemien wechselwirken nur mit dem N-terminale Ende der Proteine, nicht jedoch mit dem hier wichtigen, da sich ändernden, C-terminale Ende.⁹⁸ Daher ist häufig der exakte ER β Status nicht oder nur unzureichend bekannt.

Da ER β , wie in 1.7. bereits diskutiert, viele wichtige Funktionen nachgesagt werden, ist die genauere Untersuchung dieses Rezeptors und vor allem der Isoformen essentiell. Durch alternatives Splicen entstehen beispielsweise Rezeptorformen, welche unterschiedlich mit Transkriptionsfaktoren interagieren. Um die Isoformen exakt zu analysieren nutzen wir cDNA als Substrat für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Das Ziel dieser Arbeit ist die Relevanz und das Verhalten der ER β Varianten, insbesondere $\Delta 4$, darzustellen. Es interessieren hierbei vor allem die Häufigkeit des Auftretens innerhalb der verschiedenen Gradingstufen, sowie das Verhalten im Verlauf der Tumorgenese. Darüber hinaus wird die Korrelation innerhalb der einzelnen Varianten, sowie mit ER α genauer beleuchtet und das Verhalten in Bezug auf verschiedene Markergene. Diese Untersuchungen sollen bei der Funktionseinordnung der Isoformen helfen. Die genaueren Erkenntnisse über die einzelnen Isoformen sollen dem Ziel einer individuell auf den Genotyp angepassten Therapie der Patienten als Zukunftsvision dienen.

⁹⁶ Younes und Honma, „Estrogen receptor β “.

⁹⁷ Al-Bader u. a., „Analysis of Estrogen Receptor Isoforms and Variants in Breast Cancer Cell Lines“.

⁹⁸ Leygue und Murphy, „A Bi-Faceted Role of Estrogen Receptor Beta in Breast Cancer“.

3. Material und Methoden

3.1. Patientendaten

Verwendet wurden Daten von 85 Patienten. Die Gewebeproben wurden von der Pathologie der Universität Regensburg bewertet und anonymisiert zur Verfügung gestellt. Aus ihnen wurde die für die Untersuchung benötigte cDNA gewonnen. Alle Patienten waren mit der Teilnahme an der Studie einverstanden und unterschrieben eine schriftliche Einverständniserklärung.

Unter den 85 Patienten befanden sich 31, die zusätzlich gesunde Gewebeproben zur Verfügung gestellt haben. Die 85 pathologischen Proben wurden in drei Gruppen unterteilt. Dabei fielen 30 in die Gruppe der gut differenzierten Karzinome mit positivem ER α (G1 α +). Die Gruppe G3 α + enthielt 29 Patienten und die Patientengruppe mit der potentiell schlechtesten Diagnose G3 α - enthielt 26 Patienten. Wird in dieser Arbeit das Wort Probe verwendet, bezieht sich dies auf die cDNA, welche aus dem von den Patienten zur Verfügung gestellten Gewebe gewonnen wurde.

3.2. cDNA

Die Herstellung von cDNA (copy/complementary DNA) erfolgt aus mRNA. mRNA kann nicht direkt verwendet werden, da sie einerseits keine Ausgangssubstanz für die PCR ist und darüber hinaus sehr fragil ist. Beispielsweise kann sie durch ubiquitär vorkommende RNasen, die schwer zu inaktivieren sind, leicht zerstört werden.

Zunächst wird mit Hilfe von reverser Transkriptase, Nukleosidtriphosphaten, Primern, sowie eines Puffers ein DNA-RNA Hybrid gebildet. Dafür binden die Primer an das 3' Ende des Poly-A Schwanzes und werden von dort verlängert. Im nächsten Schritt folgt die Bildung eines zweiten DNA Stranges, der zum ersten komplementär ist.^{99,100} Dafür wird mit Hilfe der RNase H der ursprüngliche mRNA-Strang abgebaut. In die entstehenden Lücken synthetisiert die DNA Polymerase I neue cDNA und baut gleichzeitig übrig gebliebene RNA-Anteile ab. Im letz-

⁹⁹ Graw, *Genetik*, 92.

¹⁰⁰ Jansohn, Rothhämel, und Rothhämel, *Gentechnische Methoden*, 2011, 151.

ten Schritt werden die cDNA-Abschnitte durch eine DNA-Ligase miteinander verbunden.¹⁰¹
Das Prinzip der cDNA Synthese ist in Abbildung 4 dargestellt.

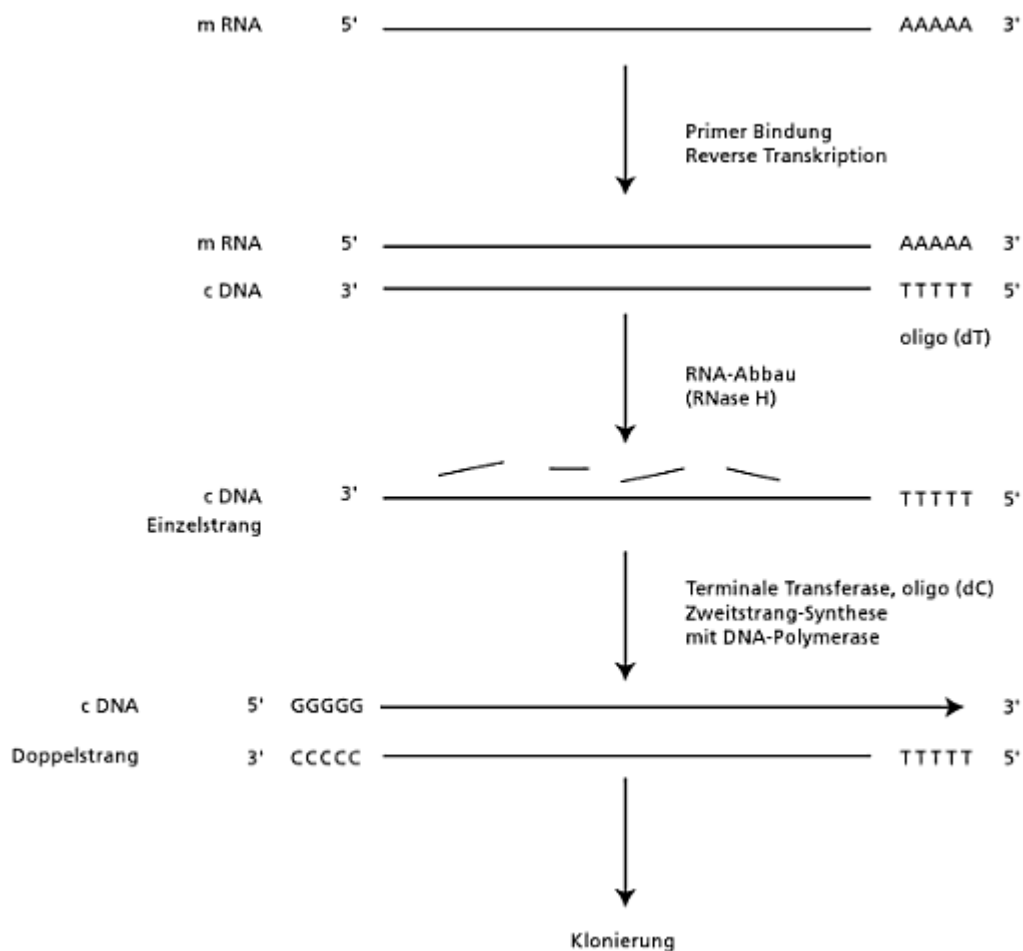


Abbildung 4 aus „Gentechnische Methoden“: „Die reverse Transkriptase-Reaktion beginnt mit der Bindung des Oligo (dT) Primers an die RNA-Matrize. Die Reverse Transkriptase synthetisiert ausgehend von dem Primer an der RNA eine einzelsträngige DNA (cDNA). Anschließend sorgt die RNase H für den Abbau der RNA. Mit Hilfe der Terminalen Transferase wird an das 3' Ende des DNA-Einzelstrangs ein oligo (dC) angefügt. Dort kann sich dann ein oligo (dG)-Primer anlagern, von dem ausgehend eine DNA-Polymerase die Zweitstrangsynthese vornimmt. Die resultierende doppelsträngige cDNA kann für weitere Versuche (z.B. eine Klonierung) eingesetzt werden.“¹⁰²

Wichtig ist zu bedenken, „dass nicht alle Gene in jeder Zelle exprimiert werden, und somit auch nicht jedes Gen in einer cDNA-Präparation repräsentiert sein kann.“¹⁰³ Dieser Prozess wird als differenzielle Genexpression bezeichnet. Die Ursache liegt in den Vorgängen der

¹⁰¹ Graw, *Genetik*, 92–93.

¹⁰² Jansohn, Rothhämel, und Rothhämel, *Gentechnische Methoden*, 2011, 150.

¹⁰³ Ganten, Bader, und Ruckpaul, *Grundlagen Der Molekularen Medizin*, 398.

Proteinbiosynthese. Hierbei kann ein Gen sowohl aktiviert bzw. inaktiviert werden kann, als auch dessen Expressionsrate und das Genprodukt beeinflusst werden. Gene können beispielsweise durch Methylierung der DNA inaktiviert werden, indem Transkriptionsfaktoren an der Bindung gehindert werden. Alternative Promotoren, sowie alternatives Splicen können zusätzlich für unterschiedliche Genprodukte sorgen.¹⁰⁴

Der Vorteil der cDNA gegenüber der RNA ist zum einen, dass direkt eine PCR Untersuchung angeschlossen werden kann, mit RNA ist dies nicht möglich. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist, dass cDNA genaue Informationen über das Endprotein erbringt, da mRNA, welche als Vorlage für die cDNA dient, nur aus transkribierten DNA Bereichen besteht. Darüber hinaus sind Splicevorgänge, bzw. alternative Splicevorgänge auch in der cDNA sichtbar, sodass Aussagen über die genaue Aminosäuresequenz eines Proteins getroffen werden können. Damit hat die cDNA einen höheren Informationswert als die ursprüngliche DNA, da sie genauere Aussagen über das Genprodukt ermöglicht.

3.3. Real- time PCR

PCR bedeutet polymerase chain reaction und ist ein Verfahren zur Vervielfältigung bestimmter DNA bzw. cDNA Abschnitte in vitro (s. Abb.4). Der Einfachheit halber wird in diesem Abschnitt nur von DNA gesprochen, alle Abläufe gelten aber auch für die verwendete cDNA. Der Prozess läuft in drei sich wiederholenden Schritten ab. Diese entsprechen dem natürlichen Vorgang der Replikation: Zunächst kommt es zur Denaturierung (melting), also dem Auftrennung der Wasserstoffbrückenbindungen. Hierfür wird das Gemisch aus DNA, Polymerasen, Primern, Nukleotiden (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) und weiteren Zusätzen, wie beispielsweise Magnesium, erhitzt, sodass sich der DNA-Doppelstrang aufspaltet. Wichtig ist, insbesondere bei der ersten Erhitzung (initiation), eine ausreichende Dauer, damit sich die komplette DNA, sowie die Primer voneinander lösen. Um eine Wiederanlagerung der beiden Einzelstränge zu verhindern, wird danach die Temperatur abgesenkt. Der zweite Schritt ist das sogenannte Annealing, oder auch Primerhybridisierung genannt, bei dem die freien Primer an die DNA binden. Dabei sind die Primer derart gewählt, dass sie den zu vermehrende DNA- Abschnitt einrahmen. Die Temperatur muss dabei so exakt sein, dass sie weder zu

¹⁰⁴ Knust und Janning, *Genetik*, 217,226,227.

niedrig ist, denn dies würde zu unspezifischer Bindung führen, aber auch nicht zu hoch, denn das hätte zu lockere oder fehlende Bindung der Primer zur Folge. Im letzten Schritt folgt die Amplifikation oder auch Elongation, bei der die Polymerase entlang der Matrize einen komplementären DNA Strang synthetisiert.

Insgesamt finden in der Regel 20-50 Zyklen statt, wobei in jedem neuen Zyklus die DNA Menge verdoppelt wird, das heißt es findet eine exponentielle Vervielfältigung statt und der Vorgang benötigt nur relativ wenig Zeit. Um die Veränderung der DNA Menge in Echtzeit beobachten zu können, wird ein Farbstoff, beispielsweise SYBR Green hinzugefügt. Dieser fluoresziert nach Bindung an die DNA und kann mit Hilfe des LightCyclers graphisch dargestellt werden. Hieraus kann der Ct- Wert (cycle threshold) bestimmt werden. Dieser ist ein quantitatives Maß für die DNA-Menge. Er zeigt an, bei welcher Zykluszahl die Fluoreszenz einer Probe erstmals signifikant die Hintergrundfluoreszenz überschritten hat. Je mehr DNA in der Probe ist, desto früher steigt die Fluoreszenz an. Dies bedeutet, dass ein niedriger Ct-Wert einer hohen DNA Konzentration entspricht.¹⁰⁵

¹⁰⁵ Jansohn, *Gentechnische Methoden*, 135–171.

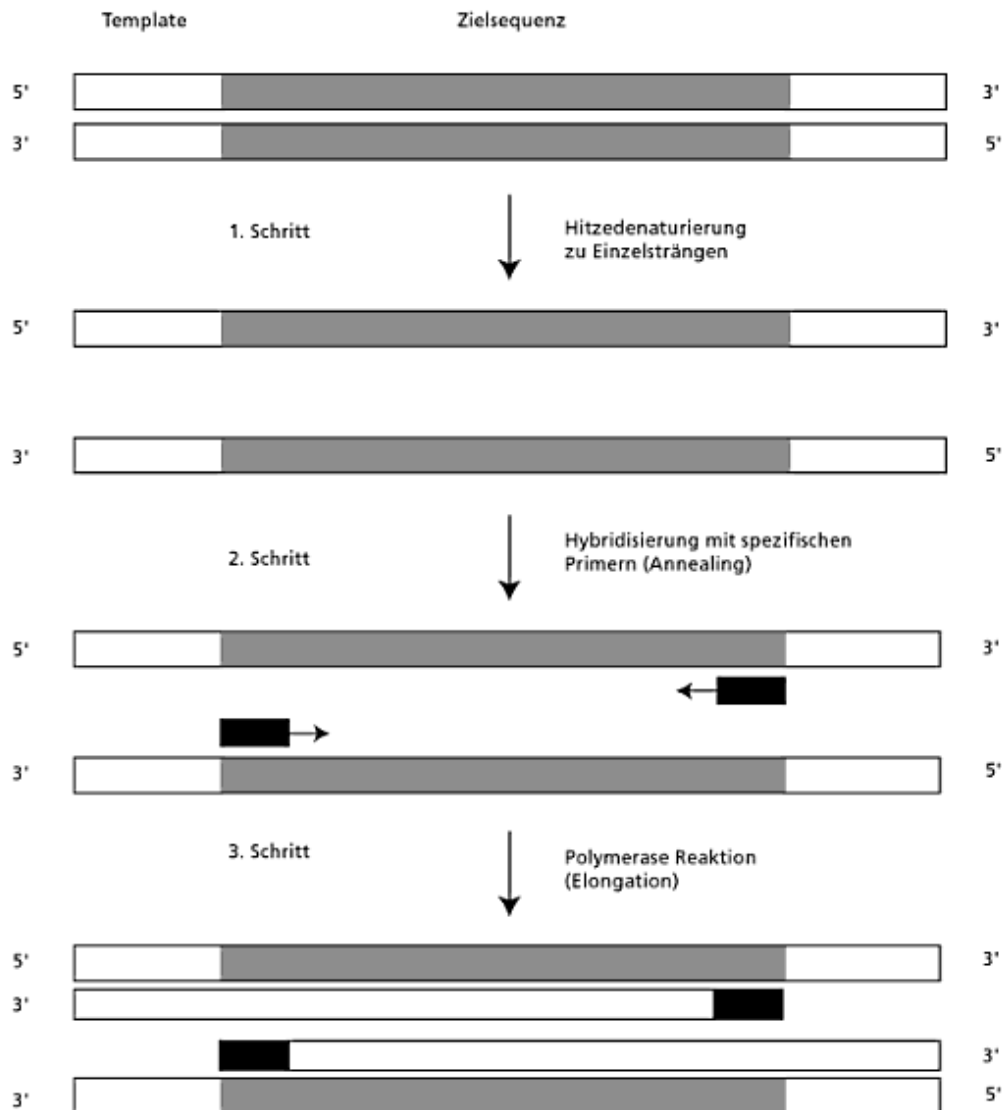


Abbildung 5 aus „Gentechnische Methoden“: „Schematischer Ablauf einer Polymerase-Kettenreaktion. Im ersten Schritt wird die Template-DNA durch thermische Denaturierung in einzelsträngige DNA überführt. An dieser hybridisieren im folgenden Schritt die Oligonukleotid-Primer (Annealing). Davon ausgehend synthetisiert die DNA-Polymerase im letzten Schritt die komplementären Stränge (Elongation). Durch mehrfache Wiederholung diese aus drei Schritten bestehenden Zyklus erfolgt eine exponentielle Amplifikation.“¹⁰⁶

Für die PCR dieser Arbeit wurde zunächst ein Mastermix hergestellt. Dazu wurden 3,4µl H₂O, 0,6µl MgCl₂, 0,5µl Primer forward, sowie 0,5µl Primer reverse und 1µl DNA Master SYBR Green gemischt. Die Primer sind jeweils auf die zu untersuchende Splicevariante abgestimmt (vgl. Tabelle 2). Diese 6µl werden nun mit 4µl cDNA (in einer Konzentration von entweder 1:20 oder 1:5 (Δ3, Δ4, Δ4/5, Δ1/2/3ON, Δ3/4/5, Δ4/5/6)) vermischt und dann in die LightCycler Glaskapillaren pipettiert. Die cDNA, sowie die Primer lagern bis zur Nutzung bei -20°C, die

¹⁰⁶ Jansohn, Rothhämel, und Rothhämel, *Gentechnische Methoden*, 2011, 136.

anderen Bestandteile des Mastermix bei 4°C. Die Erstellung des Mastermix erfolgte jeweils auf Eis. Um eine Qualitätskontrolle zu haben, gab es jeweils zwei Positiv- und eine Negativkontrolle.

Die hier verwendeten Programmeinstellungen für den LightCycler waren die folgenden:

Zunächst erfolgte eine Denaturierung über 15min. bei einer Zieltemperatur von 95°C. Daran schlossen sich die folgenden Schritte an:

Denaturierung für 10 sec. bei 95°C.

Primerhybridisierung (Annealing) für 5sec. bei 60°C. Folgende Proben hatten eine andere Temperatur: pan ERß: 62°C, beta 1: 64°C, beta 2: 62°C, beta 5: 64°C und Δ10K: 68°C.

DNA-Synthese (Elongation) für 12sec. bei 72°C.

Der darauf folgende Schritt ist die Schmelzkurvenerstellung. Hierbei steigt die Temperatur kontinuierlich auf 95°C an, gleichzeitig wird regelmäßig die Fluoreszenz gemessen. Bei einer für das Amplifikat spezifischen Temperatur denaturiert die DNA erneut und der Farbstoff löst sich. Die sich daraus ergebene Fluoreszenzabnahme kann gemessen werden. Der Schmelzpunkt der DNA, abhängig vom CG- Gehalt, ist erreicht, wenn 50% der DNA denaturiert sind. Da die Schmelztemperatur der gewünschten DNA Abschnitte bekannt ist, kann man diese von unspezifischen PCR Produkten, wie beispielweise Primerdimeren, unterscheiden. Der letzte Schritt ist das Herunterkühlen auf 40°C.

Tabelle 2: Verwendete Primer (entsprechend der untersuchten Splicevarianten) mit Namen und Sequenzen

Variante	Forward	Reverse
beta 1	GGCATGCGAGTAACAAGGGC	GGGAGCCCTCTTTGCTTTT
beta 2	GTTTGGGTGATTGCCAAGAG	CATGCGAGGGCAGA
beta 5	GTTTGGGTGATTGCCAAGAG	CGTACCTCGCATGCCTGA
Δ10K	CAGGCATGCGAGTAACAAGGGC	GACTTGCACCCGCGAAGCAC
Δ10N	TATCTGCAAGAGAGACACTGAAAGG	GGCCTTACATCCTTCACACG
Δ3	TCAAGGCTCCCGGAGAGAG	CAGGAGGGTGAGCACTAGC
Δ4	TTTGTCCAGCTACAAATCAGTG	TCCACAAAGCCACACTTCAC
Δ4/5	AAGTGTGGGATGAGGGGAAA	GATCATGGCCTTGACACAGA
Δ1/2/30N	CTCGCTTCTCAACAGGTG	CGGGAGCCTTGACAGATAAAV
Δ3/4/5	ATTCAAGGGATGAGGGGAAA	GATCATGGCCTTGACACAGA
Δ4/5/6	AAGTGTGGTATGTACCCTCTGG	GACAGGAGCATCAGGAGGTT
pan	AGATTCCCGCTTTGTGGAGC	CGCCACATCAGCCATCAT

Pan ist eine Primervariante, welche an die N-terminalen Region bindet und daher als genereller ER β Marker verwendet werden kann. Sie sorgt nicht für die Vervielfältigung einer einzelnen Splicevariante, sondern gibt einen Überblick über die gesamte ER β Expressionsstärke.

3.4. Schmelzkurvenanalyse

Die Schmelzkurvenanalyse ist wichtig, um unspezifische PCR Produkte zu entdecken. Dafür wird die erste Ableitung der Schmelzkurven verwendet. Diese zeigt einen Peak bei der spezifischen Schmelztemperatur, welche durch die Zusammensetzung der Primer bekannt ist. Die Höhe des Peaks lässt außerdem Rückschlüsse auf die Menge der vorhandenen cDNA zu. Um einen Referenzwert zu haben, laufen bei jeder PCR zwei Kalibratoren mit, die anzeigen, wo sich die spezifische Schmelztemperatur in dem jeweiligen Lauf befindet.

Anhand der Kalibratoren wurde auch die noise band gesetzt. Diese bezieht sich auf den Ct-Wert vorheriger Experimente und dient dem Vergleich unterschiedlicher Läufe. Auf Höhe der gesetzten noise band werden alle Werte abgelesen, d.h. am Ende kann bei allen Proben festgestellt werden, welche den spezifischen cDNA Abschnitt enthalten und bei welcher Zykluszahl erstmals ein signifikanten Anstieg der Fluoreszenz aufgetreten ist.

Um diese gewonnenen Werte wiederum vergleichen zu können, wurde mit dem housekeeping Genprodukt β -Actin ein Δ Ct gebildet. Ein housekeeping Gen (Haushaltsgen) stellt Produkte her, welche unabhängig von äußeren Einflüssen und Zellzuständen sind und damit immer konstant vorliegen. Das Strukturprotein β -Actin ist ein solches Produkt und kann damit hervorragend zur relativen Quantifizierung genutzt werden.

Im Weiteren wurde dann nach der $\Delta\Delta$ Ct-Methode vorgegangen.^{107,108} Dabei gilt:

Δ Ct= Ct Zielgen - Ct Referenzgen (hier β -Actin)

$\Delta\Delta$ Ct= Δ Ct Patient – Δ Ct Kontrolle

Ratio= $2^{-\Delta\Delta$ Ct}

Im letzten Schritt wurden diese Werte für eine bessere Verarbeitung mit 1000 multipliziert.

Dies sind die Ausgangswerte aller in dieser Arbeit folgenden Berechnungen.

¹⁰⁷ Grody u. a., *Molecular Diagnostics*, 11.

¹⁰⁸ Pfaffl, „Real-time RT-PCR“.

3.5. Technische Geräte und Materialliste

Folgende Geräte und Materialien wurden für die PCR- Untersuchung verwendet:

Gerät/Material	Hersteller
Biosphere® Filterspitzen 100µl, 20µl, 10µl	Sarstedt®, Nümbrecht, D
Flächendesinfektion Propanol 70%	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
LightCycler® 2.0 Instrument	Roche, Mannheim, D
LightCycler Software 4.0	Roche, Mannheim, D
LightCycler® Capillaries	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
LightCycler® FastStart DNA Master (PLUS) SYBR Green 1	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
Mikrozentrifuge	Qualitron Inc.
MS2 Minishaker	IKA – Werke GmbH & Co. KG, Staufen, D
PCR 8er Cap Strips 0,2ml	Biozym scientific GmbH, Oldendorf, D
Pipetten 100µl, 20µl, 10µl	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, D
Primer forward + reverse	Metabion international AG, Martinsried, D
Werkbank HeraSafe	Kendro, Langenselbold, D

3.6. Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von GraphPad InStat 3 (Kalifornien, USA), sowie mit IBM SPSS Statistics 20 (New York, USA) für die Berechnung der Normalverteilung. Die Datenverwaltung erfolgte mit Excel 2010.

Die Normalverteilung wurde mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov und Shapiro-Wilk Test überprüft. Signifikanz wurde hierbei angenommen bei einem $p < 0,05$.

Auf Grund der zum größeren Teil nicht normalverteilten Werte, wurde die Korrelation mit Hilfe der Spearman-Rank-Korrelation getestet, da dieser mit Rangzahlen arbeitet. Auch hier wurden Werte von $p < 0,05$ als signifikant gewertet.

Um Zusammenhänge zwischen gesunden und kranken Proben, sowie den verschiedenen Gradings herstellen zu können, wurde einerseits den Mann-Whitney Test genutzt. Dies ist ein non-parametrischer, ungepaarter und zweiseitiger Test, der das Verhältnis verschiedener Gruppen miteinander vergleicht. Für den gepaarten, non-parametrischen, zweiseitigen Test

wurde der Wilcoxon matched-pairs signed-ranks Test genutzt. Bei beiden galt $p < 0,05$ als signifikant.¹⁰⁹

Der exakte Fisher-Test, sowie der χ^2 - Test wurden verwendet, um Zusammenhänge bzw. Unterschiede der einzelnen Gradings darstellen zu können. Der Fisher- Test ist auch für kleine Stichproben gültig und betrachtet unabhängige Variablen.¹¹⁰ Signifikant gelten auch hier Werte ab $p < 0,05$.

¹⁰⁹ Rowe, *Statistik für Mediziner und Pharmazeuten*, 226–239.

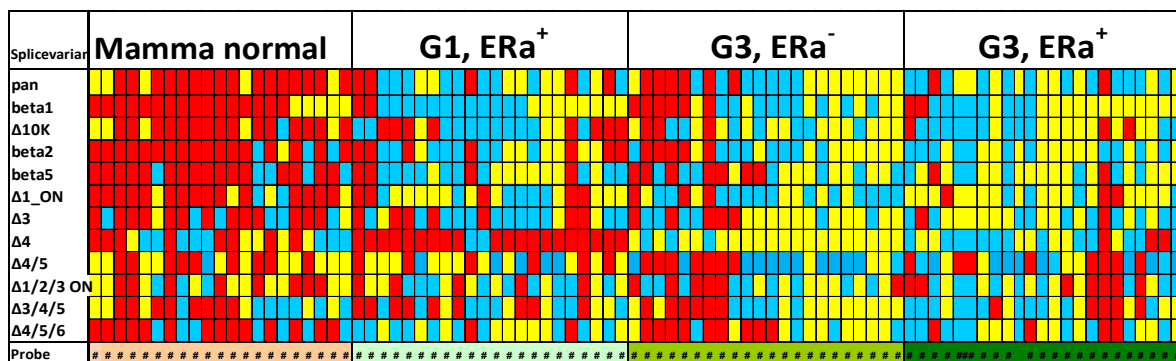
¹¹⁰ Duller, *Einführung in die Nichtparametrische Statistik mit SAS und R*, 249.

4. Resultate

4.1. Probenprofilauswertung

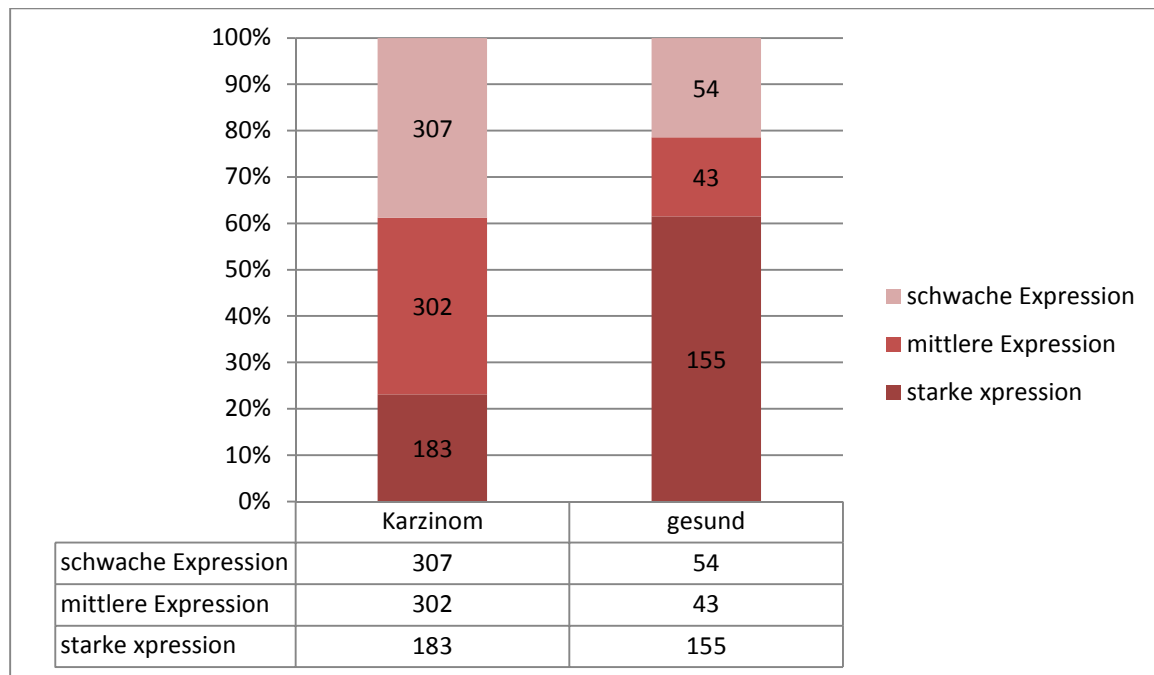
Zunächst wird ein Probenprofil (s. Abbildung 5) erstellt. Dieses besteht aus cDNA-Proben von 66 erkrankten Patienten. Hinzu kommen 21 cDNA Proben welche aus gesundem Gewebe generiert wurden. Daraus ergeben sich 87 cDNA- Proben die jeweils auf 12 ERß Isoformen untersucht wurden, sodass insgesamt 1044 Einzelergebnisse vorliegen. Die einzelnen Isoformen werden im Probenprofil in der y-Achse dargestellt und die Patientenproben, gegliedert nach normalem Brustgewebe „no“ (21 Proben), G1α+ (22 Proben), G3α- (22 Proben) und Gα+ (22 Proben), in der x-Achse. Die Expression der einzelnen Isoformen wird in drei gleich große Gruppen unterteilt und den Farben rot (starke Expression), blau (mittlere Expression) und gelb (niedrige, keine Expression) zugeordnet.

Abbildung 6: Probenprofil, rot= starke Expression, blau= mittlere Expression, gelb= schwache/keine Expression



Um einen ersten Überblick über die Daten zu bekommen, wird zunächst verglichen, wie viele Proben im gesunden Gewebe im Vergleich zu pathologisch verändertem Gewebe eine starke bzw. eine schwache Expression aufweisen. Dabei zeigt sich ein signifikanter Unterschied der Ausprägung. Es gibt 183 Proben starker Ausprägung und 307 mit schwacher Ausprägung im karzinomatösen Gewebe und 155 Proben mit starker Ausprägung und 54 mit schwacher Ausprägung im Normalgewebe. Diagramm 1 zeigt die Verhältnisse der Proben mit starker, mittlerer und keiner Expression für die veränderten und normalen Proben.

Diagramm 1: Verhältnis der Proben mit starker, mittlerer und schwacher Expression



Die nächste Berechnung vergleicht die Anzahl der Proben mit starker Expression mit der Probenzahl mit schwacher Expression. Aufgeteilt nach Splicevarianten und getrennt nach no- bzw. Karzinom-Proben. Diagramm 2 zeigt die signifikanten Ergebnisse, Tabelle 3 die dazugehörigen p- Werte. Bei den folgenden Varianten unterscheiden sich die Gruppe nicht signifikant voneinander: $\Delta 4$, $\Delta 4/5$, $\Delta 3/4/5$ und $\Delta 1/2/30N$.

Diagramm 2: Anzahl der Proben mit starker und schwacher Expression jeweils im Vergleich von gesunden und pathologischen (G1-G3) Proben, Proben mit mittlerer Expression bleiben unberücksichtigt

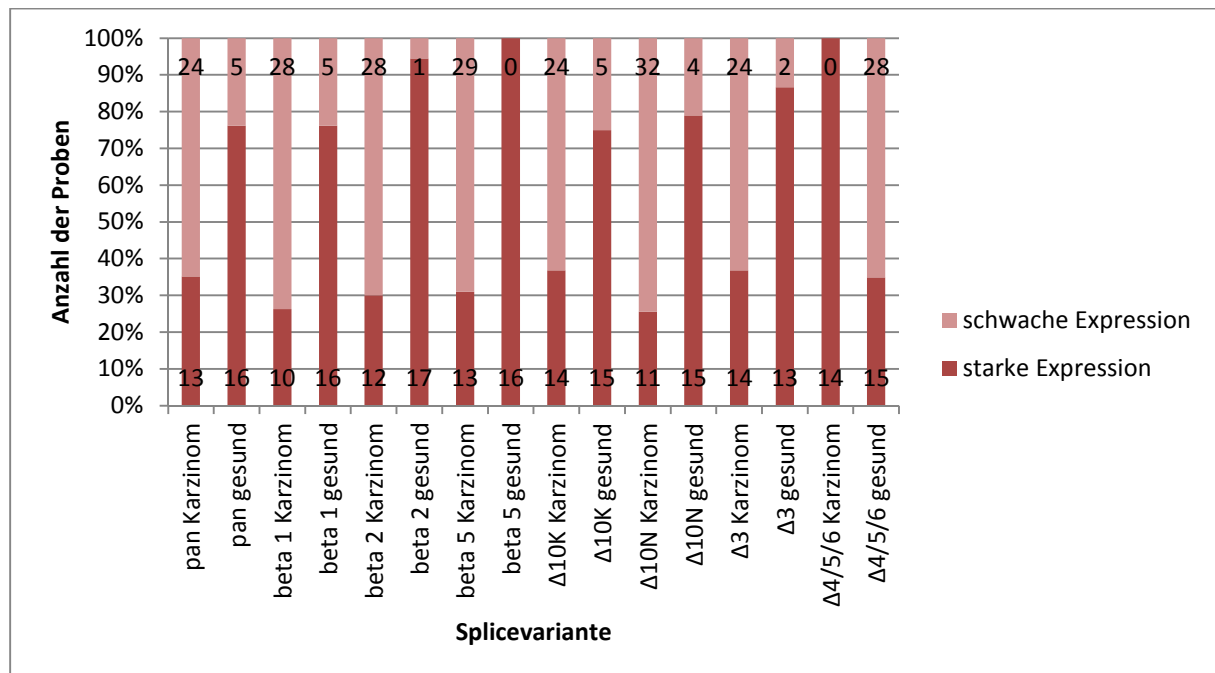


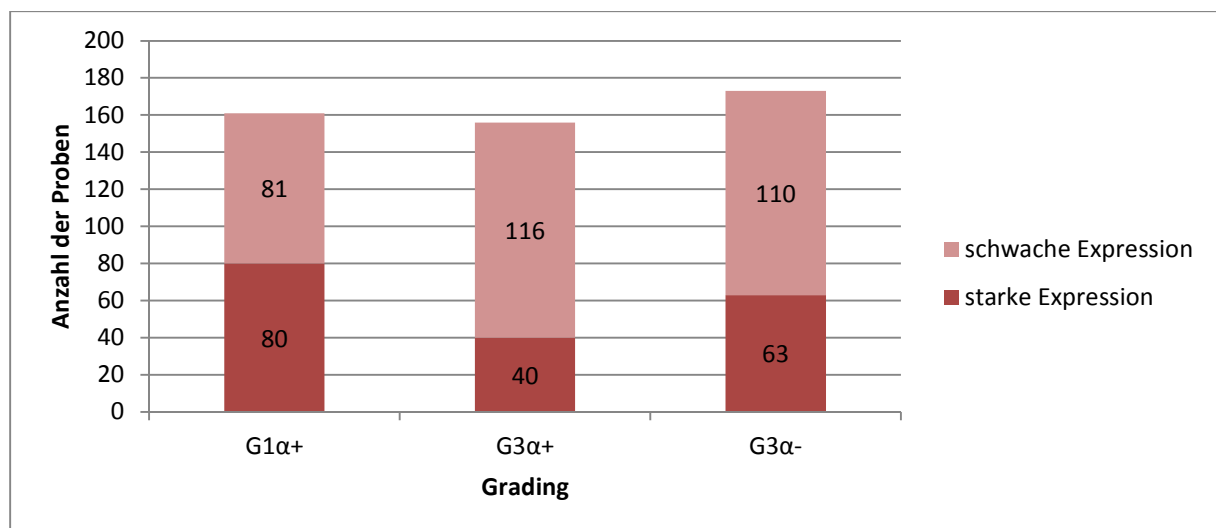
Tabelle 3: Signifikanzen der Vergleiche von gesunden und pathologischen Proben mit starker und schwacher Expressionsstärke

Variante	Signifikanz
pan	p=0,0056
beta 1	p=0,0003
beta 2	p<0,0001
beta 5	p<0,0001
Δ10K	p=0,0119
Δ10N	p=0,0002
Δ3	p=0,0018
Δ4/5/6	p<0,0001

Dabei zeigen sich hohe Expressionswerte in der Gruppe des physiologischen Brustgewebes: von 252 Proben weisen 155 eine starke Expression auf, dies entspricht 61%. Wenn zusätzlich noch die Proben mit mittlerer Expression (43 Proben) gewertet werden, stellt diese Gruppe 78% der Proben. Dies ist bei der Annahme, dass ERβ ein Tumorsuppressor ist, zu erwarten. In den erkrankten Gruppen zeigt sich hingegen eine wesentlich niedrigere Expressionsrate der einzelnen ERβ Isoformen und zwar nach dem Schema G1α+ (183 rote+ blaue Proben) > G3α- (154 rote+ blaue Proben) > G3α+ (148 rote+ blaue Proben). Wird der Rezeptorstatus unberücksichtigt gelassen, zeigt sich eine deutliche Expressionsabnahme von G1 zu G3. In G1

ER α + haben 69% Proben eine starke oder mittlere Expression. In dem Stadium G3 α + präsentieren sich 56% der Proben mit roter (15%) oder blauer (41%) Färbung und in der Gruppe mit der schlechtesten Prognose G3 α - 57% (rot 23%, blau 34%). Damit unterscheiden sich die Expression von G1 α + von G3 α + signifikant ($p=0,0029$), genau wie die Expression von G1 α + im Vergleich zu G3 α - ($p= 0,0066$).Vergleicht man nur die Expressionsstärke rot mit der Expressionsstärke gelb in den Gruppen G1 α + vs. G3 α -, so ist $p<0,0001$ und in der Gruppe G1 α + vs. G3 α + ist $p=0,0152$ und somit sind beide Ergebnisse signifikant. Diagramm 3 zeigt die absoluten Zahlen.

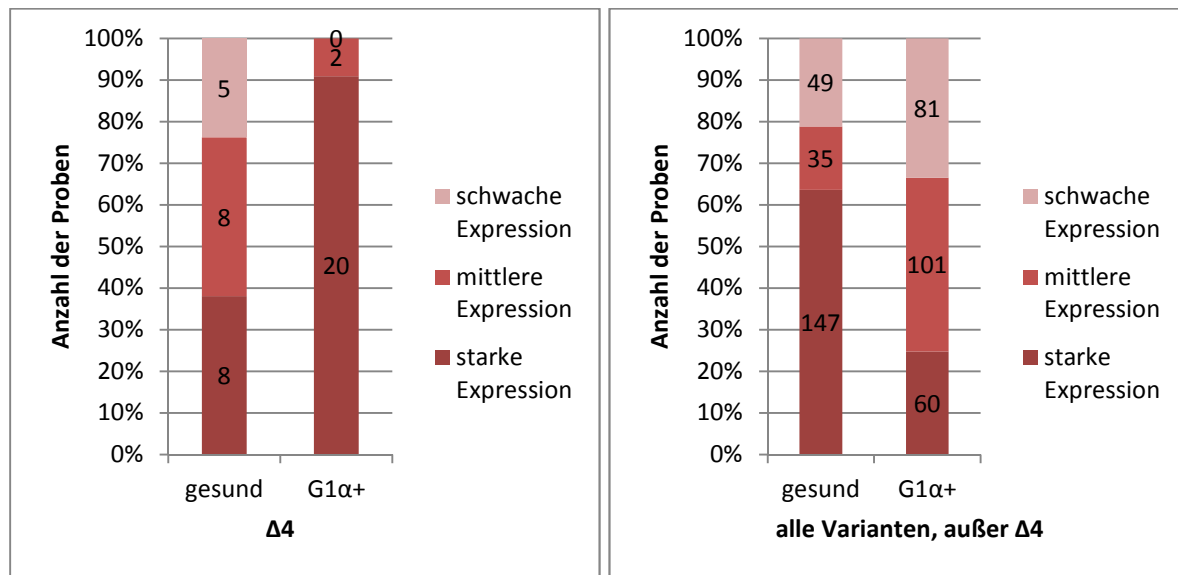
Diagramm 3: Anzahl der Proben mit starker (rot) und schwacher (gelb) Expression je G-Stadium (alle Varianten eingeschlossen)



Besonders auffällig im Probenprofil zeigt sich die Variante $\Delta 4$. Ihre Expression ist in der Gruppe G1 α + mehr vertreten, als in der Gruppe mit dem nicht erkrankten Gewebe. So zeigten 90% der Proben eine starke Expression in der G1 α + Gruppe im Vergleich zu 38% starker Expression in der Gruppe des normalen Gewebes. Dies stellt ein signifikantes Ergebnis mit $p<0,0001$ dar. Es bleibt auch signifikant, wenn die Gruppe „starke Expression“ mit der Gruppe „mittlere Expression“ zusammenfasst wird ($p=0,0211$).

Beim Vergleich der Expressionsraten aller Splicevarianten, außer $\Delta 4$, der Stadien G1 α + vs. „no“, zeigt sich auch dort ein signifikanter ($p<0,0001$) Unterschied. Hier beruht er allerdings auf einer stärkeren Expression im Stadium „no“. Das Verhältnis zwischen „no“ und G1 α + ist also das genaue Gegenteil von dem von $\Delta 4$.

Diagramm 4: Vergleich Probenzahl von $\Delta 4$, sowie der anderen Varianten mit starker, mittlerer und schwacher Expression in Normalgewebe im Vergleich zum Stadium G1 α +

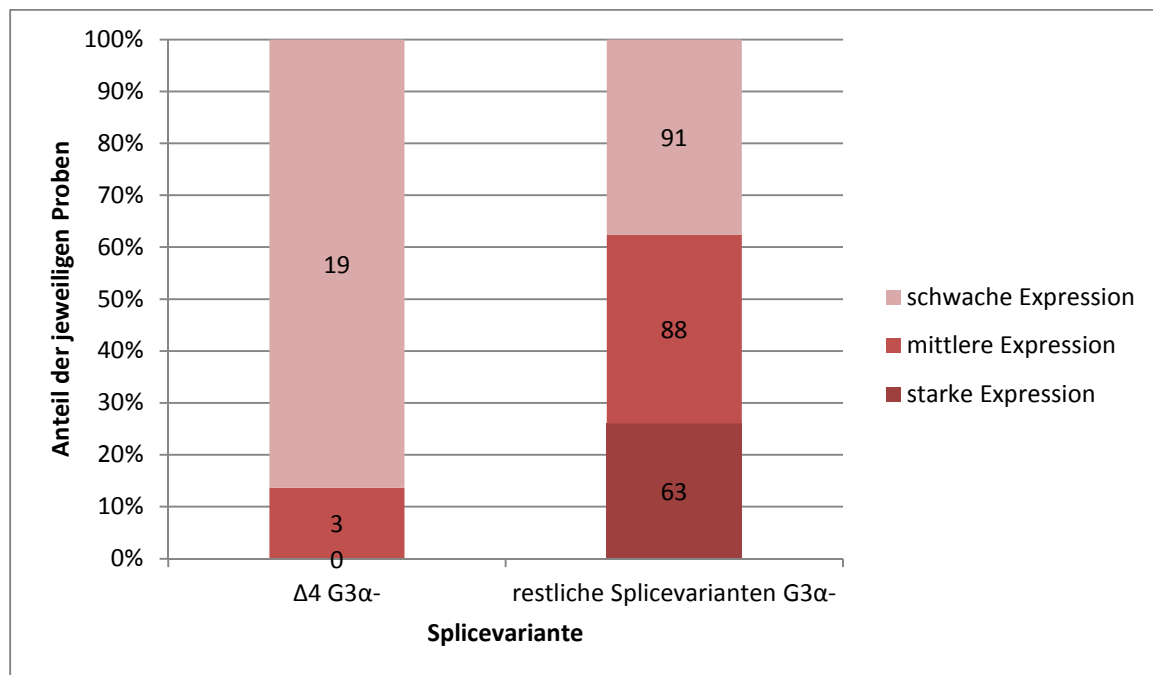


Die Anzahl der Proben von $\Delta 4$ mit starker Expression im Stadium G1 α +, ist auf Grund dessen starken Expression in diesem Stadium signifikant ($p < 0,0001$) anders, als die der anderen Spleisvarianten.

Im Vergleich zu den anderen Isoformen zusammen, verhält sich $\Delta 4$ im gesunden Gewebe normentsprechend, d.h. es ist nicht signifikant unterschiedlich, wenn die Anzahl der Proben mit mittlerer und starker Expression addiert werden. Vergleicht man nur die Proben mit starker und schwacher Expression, so ergibt auch dies kein signifikantes Ergebnis ($p = 0,3275$).

Es fällt auf, dass $\Delta 4$ im Stadium G3 α - keine einzige Probe mit starker Expression besitzt, alle anderen Varianten zeigen mindestens drei Proben mit starker Expression. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant ($p = 0,0057$). Beim Vergleich der Proben mit starker und mittlerer Expression von $\Delta 4$ zu den anderen Varianten zusammen, ist dieses Verhältnis jedoch nicht signifikant anders.

Diagramm 5: Expressionslevel in G3 α - von $\Delta 4$, sowie den restlichen Splicevarianten (zusammengefasst)



Warum $\Delta 4$ in G1 α + so stark exprimiert ist und in G3 α - so gering ist unbekannt. Anhand der hohen Expression in G1 α + könnte vermutet werden, dass es sich bei dieser Isoform um eine Ausprägung in Form eines Onkogen handelt, jedoch wäre dann wahrscheinlich, dass es auch in den weiteren G-Stadien stärker vertreten wäre und nicht wie alle anderen Varianten in der Anzahl der positiven Proben abnimmt. Es kann aber auch an einer Assoziation mit ER α liegen, die zu einer verminderten Expression von ER β $\Delta 4$ in ER α - Tumoren führt. So zeigt der Fisher-Test einen signifikanten Unterschied ($p=0,0328$) beim Vergleich von $\Delta 4$ in G3 α + mit $\Delta 4$ in G3 α -, sowohl wenn nur die Proben mit maximaler (rot) Expressionsstärke einbezogen werden, als auch wenn die Gruppe „rot“ und „blau“ zusammenfasst und mit „gelb“, also keine oder schwache Expression, verglichen werden ($p=0,0005$).

Mit Hilfe des exakten Fisher-Tests und des Chi²-Tests wird im Weiteren der Expressionsstärkenunterschied der einzelnen Splicevarianten untersucht. Dafür wurden die Farben rot und blau zur Gruppe „exprimiert“ zusammengefasst und der Gruppe gelb, entsprechend „nicht exprimiert“ gegenüber gestellt. In einem zweiten Test wird die Gruppe mit der stärksten Expression (rot) mit der Gruppe der schwächsten Expression (gelb) verglichen. Im Verlauf dieser Arbeit werden ähnliche Tests mit den in der PCR gemessenen Werten durchgeführt. In dieser Untersuchung werden folgende Konstellationen miteinander verglichen: G1 α + vs. G3 α +, G1 α + vs. G3 α -, G3 α + vs. G3 α -, no vs. G1 α +, no vs. G3 α + und no vs. G3 α +. Dabei zei-

gen die Hauptsplicevarianten keine signifikanten Ergebnisse im Vergleich der Gradings, in den Gruppen „exprimiert“ vs. „nicht exprimiert“. Das bedeutet, in allen Stadien gibt es anteilig gleich viele positive Proben. Vergleicht man die Anzahl der Proben mit starker Expression mit denen mit schwacher Expression, so zeigen sich schon im Gradingvergleich signifikante Ergebnisse. Nur der Vergleich von G3 α + mit G3 α - ist in den wenigsten Fällen statistisch signifikant unterschiedlich. Die meisten Unterschiede aller Varianten gibt es im Vergleich von der Stadien G1-G3 mit den gesunden Proben durch die eindeutige Abnahme ER β positiver Patienten. Tabelle 4 zeigt die signifikanten Ergebnisse.

Tabelle 4: Exakter Fisher und Chi² Test zum Probenprofil. Verglichen wurden die Gruppen „exprimiert“ (rot/blau) und „nicht-exprimiert“ (gelb), sowie „starke exprimiert“ (rot) und „nicht-exprimiert“ (gelb) der einzelnen Gradingstufen je Splicevariante, es sind nur die signifikanten Ergebnisse dargestellt. OR= Odds Ratio, ges. =gesamt (=G3 α + und G3 α -)

Variante	Gruppe	rot+blau vs. gelb	OR	rot vs. gelb	OR
alle Varianten	G1 α + vs. G3 α +	p=0,0022 ^{1,2}	1,771	p<0,0001 ^{1,2}	2,864
	G1 α + vs. G3 α -	p=0,111 ¹ p=0,112 ²	1,614	p=0,0152 ¹ p=0,0193 ²	1,724
	G3 α + vs. G3 α -			p=0,0429 ¹ p=0,0471 ²	0,602
	no vs. G1 α +	p=0,021 ¹ p=0,022 ²	1,623	p<0,0001 ^{1,2}	2,906
	no vs. G3 α +	p<0,0001 ^{1,2}	2,874	p<0,0001 ^{1,2}	8,324
	no vs. G3 α -	p<0,0001 ^{1,2}	2,619	p<0,0001 ^{1,2}	5,012
	no vs. G3 ges.	p<0,0001 ^{1,2}	27,439	p<0,0001 ^{1,2}	6,298
pan	no vs. G3 α +			p=0,0057 ¹ p=0,041 ¹	12,8
	no vs. G3 α -			p=0,01 ²	4,8
	no vs. G3 ges.			p=0,0037 ¹ p=0,0071 ²	6,8
beta 1	no vs. G1 α +			p=0,0057 ¹ p=0,01 ²	12,8
	no vs. G3 α +	p=0,0305 ¹ p=0,0419 ²	4,622	p=0,0005 ¹ p=0,0007 ²	20,8
	no vs. G3 ges.			p=0,0014 ¹ p=0,0026 ²	8
beta 2	G1 α + vs. G3 α +			p=0,0007 ¹ p=0,0023 ²	53,571
	G1 α + vs. G3 α -			p=0,0071 ¹ p=0,0194 ²	25,909
	G3 α + vs. G3 α -			p=0,0425 ²	0,0691
	no vs. G1 α +	p=0,0459 ¹	9,333		

	no vs. G3α+	p=0,0006 ¹ p=0,0013 ²	24	p<0,0001 ^{1,2}	291,667
	no vs. G3α-	p=0,0093 ¹ p=0,0145 ²	13,846	p=0,0006 ¹ p=0,0015 ²	30,6
	no vs. G3 ges.	p=0,0006 ¹ p=0,0017 ²	18,261	p<0,0001 ^{1,2}	71,4
beta 5	G3α+ vs. G3α-			p=0,0457 ¹	0,143
	no vs. G1α+	p=0,0036 ¹ p=0,0076 ²	25,207	p=0,0002 ¹ p=0,0006 ¹	62,333
	no vs. G3α+	p<0,0001 ^{1,2}	73,353	p<0,0001 ^{1,2}	191,4
	no vs. G3α-	p=0,0089 ¹ p=0,0159 ²	20,607	p=0,0017 ¹ p=0,0017 ²	33
	no vs. G3 ges.	p<0,0001 ¹ p=0,0004 ²	39,340	p<0,0001 ^{1,2}	74,684
Δ10N	G3α+ vs. G3α-	p=0,148 p=0,0158 ²	0,175	p=0,0148 ¹	0,4
	no vs. G1α+			p=0,0068 ¹ p=0,0125 ²	8,25
	no vs. G3α+	p=0,0019 ¹ p=0,0033 ²	9,107	p=0,0002 ¹ p=0,0005 ²	18,75
	no vs. G3α-			p=0,0346 ¹	7,5
	no vs. G3 ges.	p=0,0317 ¹	3,880	p=0,0002 ¹ p=0,0005 ²	13,125
Δ10K	G1α+ vs. G3α+			p=0,0391 ¹ p=0,149 ¹	8
	G1α+ vs. G3α-	p=0,0109 ²	7,6	p=0,0222 ²	10,667
	no vs. G3α+			p=0,01 ¹ p=0,167 ²	9
	no vs. G3α-			p=0,002 ¹ p=0,004 ²	12
	no vs. G3 ges.			p=0,0004 ¹ p=0,001 ²	10,5
Δ3	G1α+ vs. G3α+	p=0,0452 ¹ p=0,0474 ²	5,278	p=0,0274 ¹ p=0,0359 ²	11,667
	no vs. G3α+	p=0,0157 ¹ p=0,0223 ²	7,917	p=0,0004 ¹ p=0,0012 ²	32,5
	no vs. G3α-	p=0,0217 ¹ p=0,0235 ²	3,562	p=0,0032 ¹ p=0,0058 ²	14,3
	no vs. G3 ges.	p=0,0073 ¹ p=0,0146 ²	5,783	p=0,0002 ¹ p=0,0004 ²	19,5
Δ4	G1α+ vs. G3α+	p=0,0089 ¹ p=0,0134 ²	21,774	p<0,0001 ^{1,2}	87,857
	G1α+ vs. G3α-	p<0,0001 ^{1,2}	250,71	p<0,0001 ^{1,2}	1599
	G3α+ vs. G3α-	p=0,0005 ¹ p=0,0007 ²	13,571	p=0,0328 ¹	18,2

	no vs. G1α+	p=0,0211 ¹	0,067	p=0,0054 ¹ p=0,0119 ²	0,038
	no vs. G3α-	p<0,0001 ¹ p=0,0001 ²	20,267	p=0,0001 ¹ p=0,0004 ²	60,273
	no vs. G3 ges.	p=0,0092 ¹ p=0,0165 ²	4,622	p=0,0012 ¹ p=0,0019 ²	13,867
Δ4/5	G1α+ vs. G3α-	p=0,0217 ¹ p=0,0235 ²	0,158		
	no vs. G3α+	p=0,0268 ¹ p=0,0422 ²	0,202		
	no vs. G3α-	p=0,0097 ¹ p=0,0171 ²	0,144		
	no vs. G3 ges.	p=0,0034 ¹ p=0,0055 ²	0,172		
Δ4/5/6	no vs. G1α+	p=0,0005 ¹	13,514	p<0,0001 ^{1,2}	121,8
	no vs. G3α+	p=0,0014 ¹ p=0,0035 ²	30,259	p=0,0002 ¹ p=0,0007	61,222
	no vs. G3α-	p=0,0014 ¹ p=0,0035 ²	30,259	p=0,3448 ¹ p=0,0064 ²	29
	no vs. G3 ges.	p=0,0003 ¹ p=0,0016 ²	30,019	p=0,0002 ¹ p=0,0008 ²	39,741

¹Fisher-Test; ²Chi²-Test

Besonders auffällig ist, dass Δ4 die Variante ist, in der sich alle Konstellationen signifikant voneinander unterscheiden. Um diese Auffälligkeit weiter zu untersuchen, wird ein weiterer exakter Fisher-Test angeschlossen (vgl. Tabelle 5), der eine Übersicht gibt über die Unterschiede der Expressionsstärke von Δ4 zu den anderen Splicevarianten. Es wird verglichen, wie häufig Δ4 pro angegebener Gradingstufe exprimiert (rot+blau bzw. nur rot) ist, im Vergleich zu den jeweiligen Splicevarianten. In G1α+ und G3α- zeigen sich beinahe ausnahmslos signifikante Unterschiede in der Expression. Vermutlich begründet in der hohen Anzahl von Proben mit Expression von Δ4 in G1α+, und der niedrigen Anzahl positiver Proben in G3α-. Im Stadium G3α+ und in den „no“ Proben, zeigen sich jeweils nur zwei Varianten mit einer signifikant anderen Positivität als ERβΔ4. Daraus lässt sich schließen, dass die Expressionsrate von Δ4 in G3α+ und no dem Level der anderen Varianten entspricht.

Tabelle 5 Zeigt die signifikanten Ergebnisse des Fisher-Tests, indem die Ausprägung der jeweiligen Splicevariante und $\Delta 4$ für die unterschiedlichen Stadien verglichen wurde. Angegeben ist jeweils der p-Wert

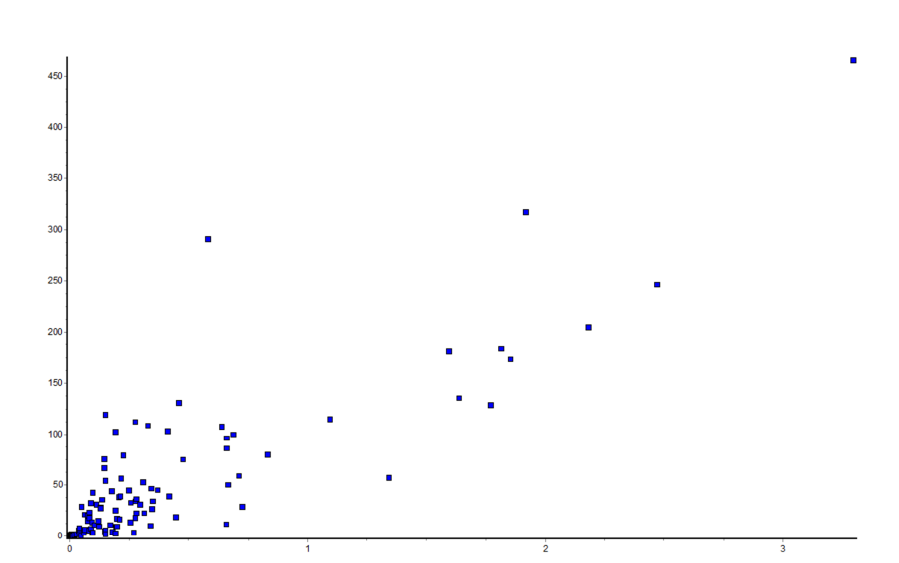
Splicevariante	no ¹	no ²	G1 α ¹	G1 α ²	G3 α ¹	G3 α ²	G3 α ⁻¹	G3 α ⁻²
pan			0,0089	0,0002			0,004	0,0037
beta 1			0,0036	<0,0001			0,0005	0,0019
beta 2			0,0089	0,0006			0,004	0,0084
beta 5	0,048	0,011	0,0036	<0,0001	0,069		0,0016	0,0008
$\Delta 10N$			0,0002	<0,0001	0,0337		0,0002	0,0256
$\Delta 10K$			<0,0001	0,0367			0,0452	
$\Delta 3$				0,0926			0,0217	0,0135
$\Delta 4/5$			0,0002	<0,0001			0,004	<0,0001
$\Delta 3/4/5$			0,0485	0,0072			0,0217	0,0064
$\Delta 4/5/6$	0,048	0,016	0,0005	<0,0001			0,004	0,0004
$\Delta 1/2/30N$			0,0036	<0,0001			0,0005	0,0019

¹rot+blau vs. gelb; ²rot vs. gelb

4.2. Korrelationsuntersuchung der ER β Splicevarianten mit ER α

Im Folgenden wird eine Spearman Korrelationsuntersuchung durchgeführt, um den Zusammenhang zwischen den ER β Splicevarianten und dem ER α Wildtyp darzustellen. Dabei zeigt keine ER β Variante eine Korrelation mit ER α , außer $\Delta 4$. Diese Konstellation weist ein extrem signifikantes Ergebnis ($p < 0,0001$) mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,7860$ auf, der auf eine starke Beziehung zwischen diesen beiden Varianten hindeutet.

Diagramm 6: Korrelation zwischen $\Delta 4$ (horizontal) und ER α (vertikal)

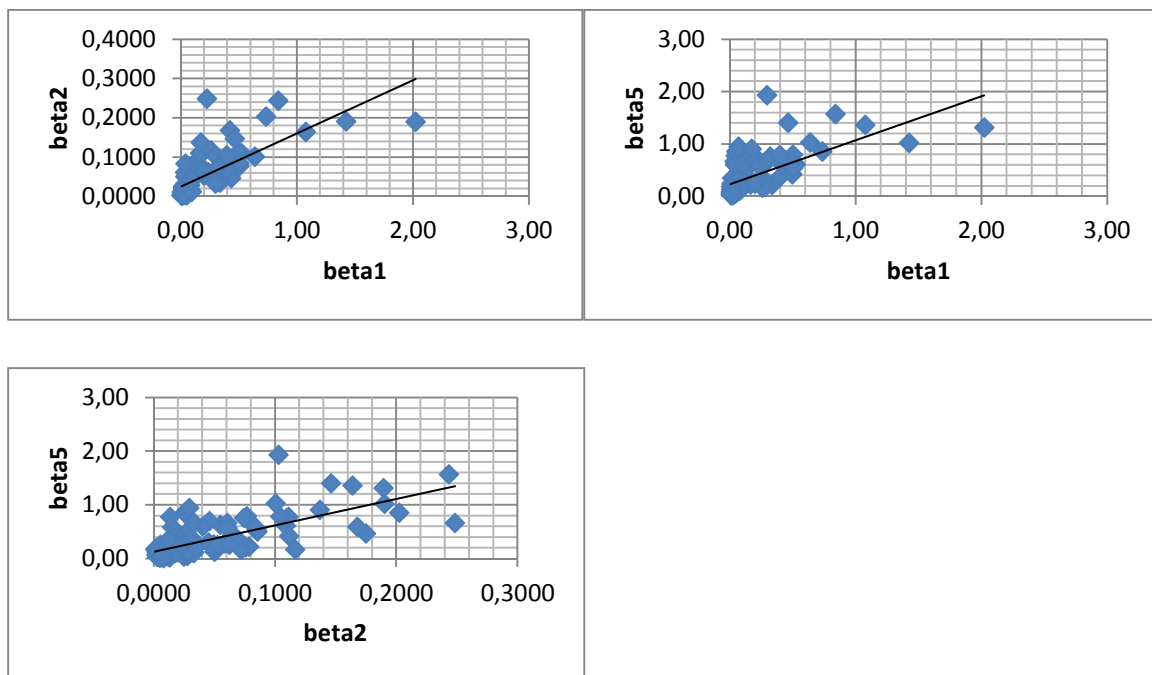


4.3. Korrelationsuntersuchung der Hauptsplicevarianten, pan und $\Delta 10K$

Korreliert man die Hauptvarianten (beta 1, beta 2, beta 5), sowie $\Delta 10K$ und pan von ER β miteinander zeigt sich folgendes Ergebnis: die Varianten zeigen extrem signifikante und starke Korrelationen miteinander. Daraus lässt sich schließen, dass sich diese Varianten gleichsinnig verhalten. Dadurch wird das Verhalten von $\Delta 4$ noch interessanter, da es wie in 4.4. gezeigt nur sehr selten und schwach mit anderen Varianten korreliert, ausgenommen im Stadium G3 α -.

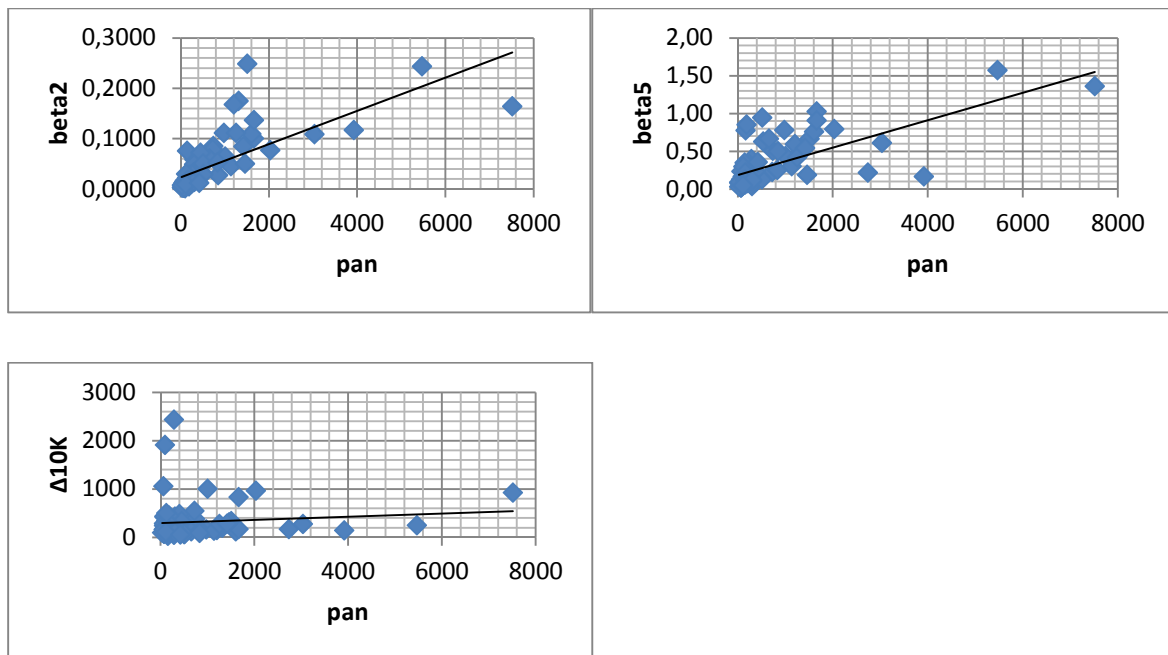
Starke und extrem signifikante ($p < 0,001$) Korrelationen wurden deutlich zwischen beta 1 und beta 2, hierbei ist $r = 0,7749$, sowie zwischen beta 1 und beta 5, hier ist $r = 0,664$. Auch beta 2 und beta 5 korrelieren stark positiv ($p < 0,001$, $r = 0,7356$) miteinander. Daraus könnte man schließen, dass der gleichartige Aufbau dieser drei Varianten dafür sorgt, dass sie sich in den verschiedenen Krankheitsstadien ähnlich verhalten.

Diagramm 7: Korrelationen mit beta 1



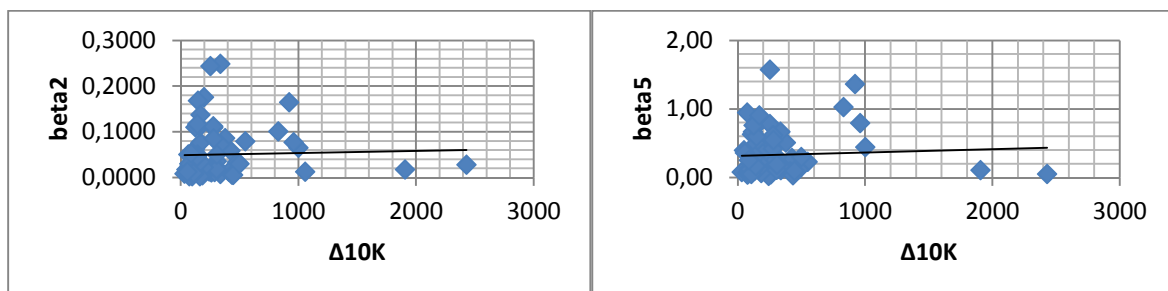
PanER β korreliert extrem signifikant ($p < 0,0001$) mit ER β $\Delta 10K$ und zeigt dabei eine starke positive Korrelation $r = 0,6826$, noch stärker ist die Korrelation mit beta 5, hier beträgt der Korrelationskoeffizient $0,7251$. Der stärkste Zusammenhang zeigt sich jedoch mit beta 2: $r = 0,8644$.

Diagramm 8: Korrelationen mit pan



Auch zwischen $\Delta 10K$ und beta 2 und 5 zeigen sich extrem signifikante Korrelationen. So ist der Spearman Korrelationskoeffizient von $\Delta 10K$ und beta 2 $r=0,5104$ und mit beta 5 $r=0,3884$.

Diagramm 9: Korrelationen mit $\Delta 10K$



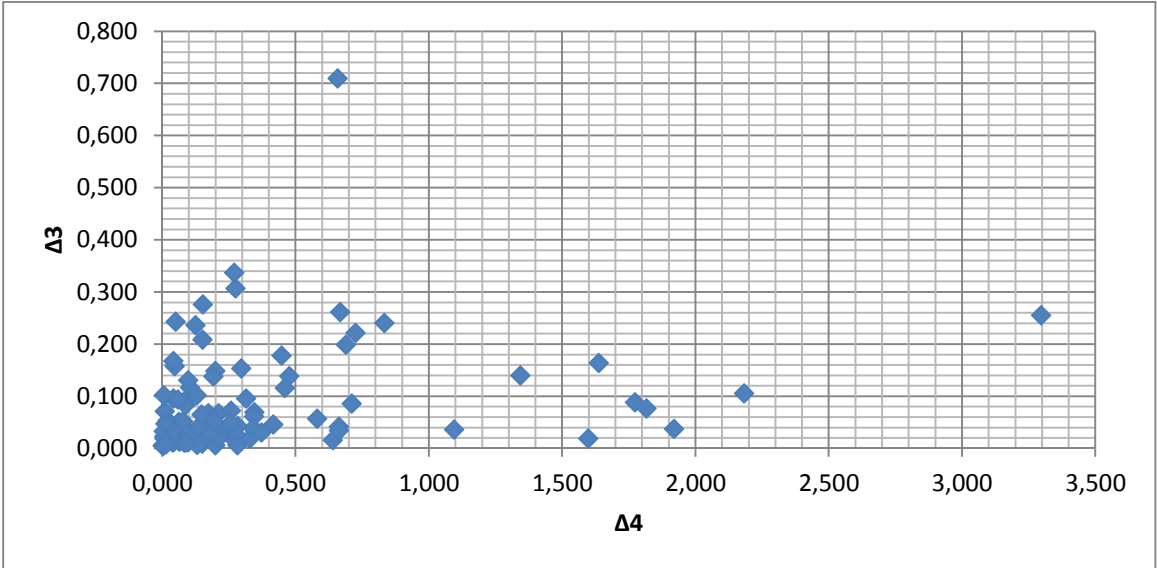
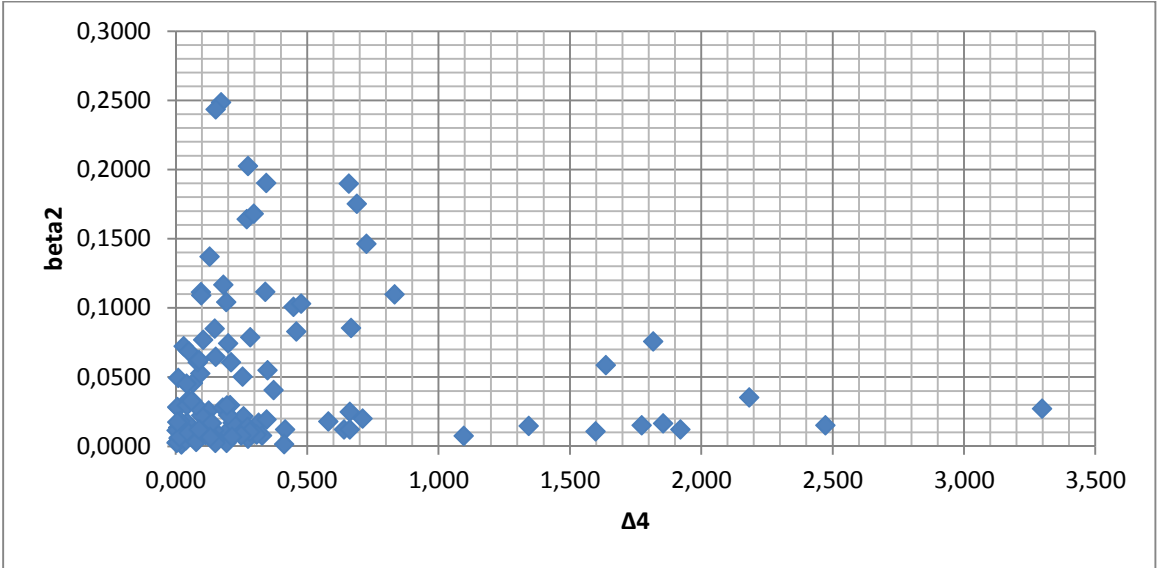
4.4. Korrelationsuntersuchung von $\Delta 4$ mit weiteren Splicevarianten

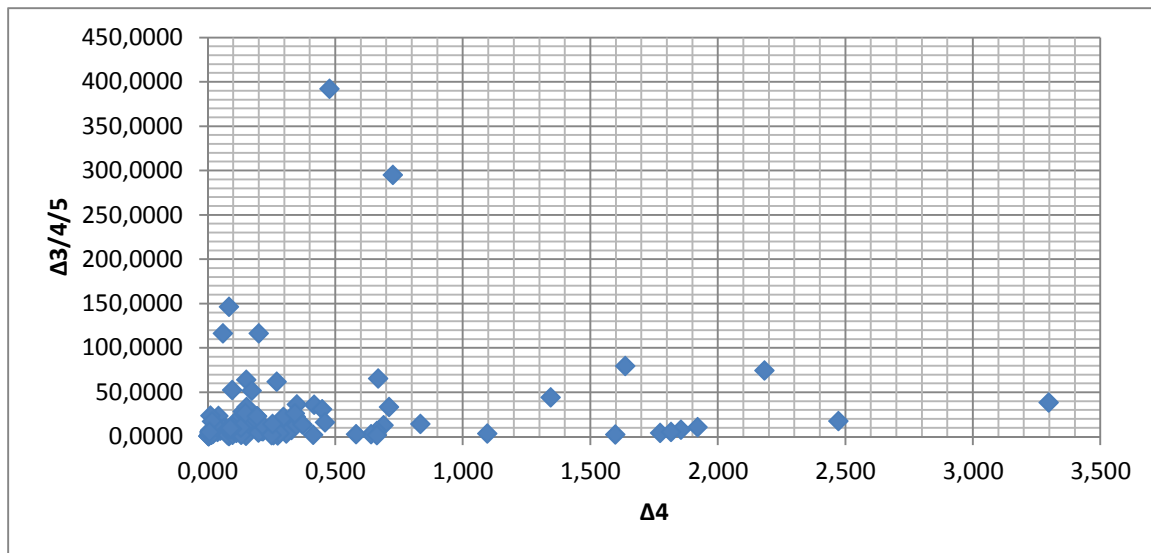
Für eine genauere Analyse von $\Delta 4$, wird eine Korrelationsuntersuchung mit den anderen Splicevarianten vorgenommen. Diese Untersuchung stärkt den Verdacht, dass sich $\Delta 4$ anders verhält und dieser Variante eine besondere Aufmerksamkeit gelten sollte.

Die Spearmankorrelationsuntersuchung ergibt Folgendes: $\Delta 4$ zeigt überhaupt keinen signifikanten Zusammenhang mit dem folgenden Varianten: pan, beta 1, beta 5, $\Delta 10K$, $\Delta 10N$, $\Delta 4/5$,

$\Delta 1/2/30N$, $\Delta 4/5/6$. Lediglich mit den folgenden Splicevarianten zeigt sich eine signifikant positive Korrelation: $\Delta 3$ ($p=0,0002$, $r=0,3596$), $\Delta 3/4/5$ ($p=0,0088$, $r=0,2633$) und $\beta 2$ ($p=0,0310$, $r=0,2068$). Allerdings ist zu beachten, dass auch hier die Korrelation nur sehr schwach positiv ist.

Diagramm 10: Korrelationen mit $\Delta 4$





Da insbesondere die Rolle der Varianten im erkrankten Gewebe interessiert, enthält eine weitere Korrelationsuntersuchung von $\Delta 4$ nur Werte pathologischer Proben, d.h. nur G1-G3. Dies entspricht 66 Patienten. Hierbei zeigen sich folgende Ergebnisse: Lediglich die Varianten $\Delta 3$ ($p= 0,0014$, $r=0,3638$) und $\Delta 3/4/5$ ($p= 0,0185$, $r=0,2707$) korrelieren schwach positiv mit $\Delta 4$. Alle anderen Isoformen (pan, beta1, beta2, beta5, $\Delta 4/5$, $\Delta 1/2/30N$, $\Delta 4/5/6$, $\Delta 10K$ und $\Delta 10N$) korrelieren nicht signifikant.

Die wenigen Korrelationen mit $\Delta 4$ bedeuten, dass diese Variante sowohl in pathologisch verändertem Gewebe (G1-G3), als auch in der Gesamtzahl der Proben (no+G1-G3) eine Sonderrolle einnimmt, dies kann zurückzuführen sein, auf die stärkere Expression im G1 α + Stadium und die kaum vorhandene Expression in Stadium G3 α -.

Um die Proben im Stadium G1- G3 genauer untersuchen zu können, werden sie nochmal getrennt nach Gradings miteinander korreliert. Hierbei korrelieren alle Varianten, bis auf beta 5 und $\Delta 10K$, mit der Gruppe G3 α - von $\Delta 4$ (s.Tabelle 6). In den anderen Gruppen hingegen zeigt lediglich $\Delta 3$ in der Gruppe G1 α + eine Signifikanz ($p=0,0201$, $r=0,4448$), sowie $\Delta 1/2/30N$ in der Gruppe G3 α + ($p=0,0465$, $r=-0,439$).

Tabelle 6: Spearmankorrelation von $\Delta 4$ mit Splicevarianten, Ergebnisse in der Gruppe G3 α -

Variante	p-Wert	Korrelationskoeffizient
beta 1	$p=0,0025$	$r=0,6372$
beta 2	$p=0,0102$	$r=0,5475$
pan	$p=0,0008$	$r=0,7328$
$\Delta 10N$	$p=0,0238$	$r=0,6550$
$\Delta 3$	$p=0,0017$	$r=0,6429$

Δ4/5	p=0,0002	r=0,7607
Δ1/2/30N	p=0,009	r=0,6293
Δ3/4/5	p<0,0001	r=0,7854
Δ4/5/6	p=0,0265	r=0,4831

Obwohl es zunächst so aussieht, als wäre Δ4 komplett isoliert im Verhalten zu den anderen Varianten, so zeigt sich nun in Stadium G3α- eine starke Korrelation mit allen anderen Varianten, außer Δ10K. Bestehen bleibt die Sonderrolle von Δ4 für die Stadien G1α+ und G3α+, sowie in der Gesamtheit aller Stadien.

4.5. Korrelationsuntersuchung mit Markergenen

Damit das Verhalten der einzelnen Varianten intensiver analysiert wird, folgt eine Spearman Korrelationsuntersuchung. Es wurden Marker gewählt, die auch im Oncotype DX assay[®] vorkommen. Diese Markergene sind schon lange bekannt und ihre Funktionen sind relativ eindeutig zuzuordnen. Der Oncotype DX assay[®] wird von Kliniken eingesetzt um den Nutzen einer Chemotherapie und die Rezidivwahrscheinlichkeit abschätzen zu können. Dadurch soll eine individualisierte Therapie ermöglicht werden.¹¹¹ In diese Analyse fallen folgende Markergene des Oncotype DX assay[®]: als Proliferationsmarker Ki-67, STK15, Cyclin B1 und MYBL2. In die Gruppe Invasion fallen Stromyelsin3 und Cathepsin L2. GRB7 und Her2 gehören zur Übergruppe Her2. Bcl2 und SCUBE2 sind Östrogen assoziiert. Außerdem enthalten sind noch GSTM1, CD68 und BAG1. Hinzu kommen noch die folgenden Gene PTEN, p21/WAF und E-Cadherin, die in die Gruppe der Tumorsuppressoren fallen.

4.5.1. Korrelationsuntersuchung zwischen den Hauptspllicevarianten und den Markergenen

Bei der Spearmankorrelationsuntersuchung zwischen beta 1, 2 und 5 und den Markergenen zeigen sich die unten folgenden Ergebnisse. Es werden jeweils alle Proben, d.h. G1 – G3 zusammen mit den no-Proben, korreliert.

¹¹¹ „What is the Oncotype DX[®] assay?“.

Beta 1 korreliert bei dieser Untersuchung positiv mit den folgenden Markergenen: PTEN ($p < 0,0001$, $r = 0,6085$), Bcl2 ($p = 0,0036$, $r = 0,3162$) und GSTM1 ($p = 0,0057$, $r = 0,3292$). Eine negative Korrelation zeigt sich bei folgenden Markern: STK15 ($p = 0,0013$, $r = -0,3479$), MYBL2 ($p < 0,0001$, $r = -0,5155$), Stromyelsin3 ($p = 0,0369$, $r = -0,2448$) und Ki-67 ($p = 0,0018$, $r = -0,3542$).

Für beta 2 zeigen sich folgende signifikante Resultate: positive Korrelationen gibt es mit PTEN ($p < 0,0001$, $r = 0,4804$), Bcl2 ($p = 0,0097$, $r = 0,2457$) und GRB7 ($p = 0,043$, $r = 0,1989$). Negativ korreliert beta 2 mit STK15 ($p = 0,0002$, $r = -0,3494$), MYBL2 ($p < 0,0001$, $r = -0,4335$), Stromyelsin3 ($p = 0,0242$, $r = -0,23$), Ki-67 ($p = 0,0446$, $r = -0,2044$) und Cyclin B1 ($p = 0,0235$, $r = -0,2264$).

Auch beta 5 wird mit den Markern korreliert und hierbei zeigen sich folgende positive Korrelationen: PTEN ($p < 0,0001$, $r = 0,5211$), Bcl2 ($p = 0,0232$, $r = 0,2144$) und GSTM1 ($p = 0,0067$, $r = 0,278$). Negativ korreliert beta 5 mit den folgenden Markern: STK15 ($p = 0,003$, $r = -0,279$), MYBL2 ($p < 0,0001$, $r = -0,4168$) und Stromyelsin3 ($p = 0,0112$, $r = -0,2564$).

Tabelle 7: Korrelationskoeffizienten und p-Wert der Hauptsplicevarianten und Markergene

Gen	beta 1	beta 2	beta 5
Bcl2	$p = 0,0036$ $r = 0,3162$	$p = 0,0097$ $r = 0,2457$	$p = 0,0232$ $r = 0,2144$
Cyclin B1		$p = 0,0235$ $r = -0,2264$	
GRB7		$p = 0,043$ $r = 0,1989$	
GSTM1	$p = 0,0057$ $r = 0,3292$		$p = 0,0067$ $r = 0,278$
Ki-67	$p = 0,0018$ $r = -0,3542$	$p = 0,0446$ $r = -0,2044$	
MYBL2	$p < 0,0001$ $r = -0,5155$	$p < 0,0001$ $r = -0,4335$	$p < 0,0001$ $r = -0,4168$
PTEN	$p < 0,0001$ $r = 0,6085$	$p < 0,0001$ $r = 0,4804$	$p < 0,0001$ $r = 0,5211$
STK15	$p = 0,0013$ $r = -0,3479$	$p = 0,0002$ $r = -0,3494$	$p = 0,003$ $r = -0,279$
Stromyelsin3	$p = 0,0369$ $r = -0,2448$	$p = 0,0242$ $r = -0,23$	$p = 0,0112$ $r = -0,2564$

Es zeigt sich, dass die Hauptvarianten recht ähnliche Korrelationen aufweisen, wobei beta 2 am häufigsten korreliert. Auch die Richtung der Korrelation ist jeweils identisch: so zeigen

alle Varianten einen negativen Korrelationskoeffizienten für MYBL2, STK15 und Stromyelsin3, sowie beta 1 und 2 für Ki-67 und einen positiven für die anderen Marker.

4.5.2. Korrelationsuntersuchung zwischen $\Delta 4$ und den Markergenen

Zur weiteren Untersuchung von $\Delta 4$ folgt auch mit dieser Variante eine Spearmankorrelation mit den verschiedenen Markern. Hierbei zeigen sich Korrelationen mit folgenden Markern: s. Tabelle 8.

Tabelle 8: Korrelation zwischen $\Delta 4$ und den Markergenen

Gen	Signifikanz	Korrelationskoeffizient
BAG1	p<0,0001	r=0,5161
Bcl2	p<0,0001	r=0,5234
E-Cadherin	p=0,0094	r=0,3
GRB7	p=0,0002	r=0,3652
Her2	p<0,0001	r=0,4346
Ki-67	p=0,024	r=-0,2353
MYBL2	p<0,0001	r=-0,4274
p21/WAF	p<0,0001	r=0,4155
PTEN	p<0,0001	r=0,4155
SCUBE2	p<0,0001	r=0,6189
STK15	p=0,004	r=-0,2796

Keine Korrelation zeigt sich mit den Markern Cathepsin L2, Stromyelsin3, Cyclin B1, GSTM1 und CD68. Entsprechend den Hauptvarianten korreliert $\Delta 4$ negativ mit Ki-67, MYBL2 und STK15.

4.5.3. Vergleich der Korrelationen von $\Delta 4$ mit den Markergenen und den weiteren Splevarianten mit den Markergenen

Vergleicht man die Korrelationen zwischen $\Delta 4$ und den Markern mit den Korrelationen der Varianten beta 1, beta 2 und beta 5 und den Markern fällt auf, dass nur $\Delta 4$ mit den Tumorsuppressoren SCUBE2 (p<0,0001, r=0,6189), p21/WAF (p<0,0001, r=0,4155) und E-Cadherin (p=0,0094, r=0,3) positiv korreliert. Betrachtet man die restlichen Gene, korreliert $\Delta 4$ als einzige Variante mit Her2neu (p<0,0001, r=0,4346) und BAG1 (p<0,0001, r=0,5161). Allen Vari-

anten gemeinsam ist, dass sie eine extrem signifikante positive Korrelation mit dem Suppressor PTEN aufweisen und nicht mit CD68 korrelieren.

Bei Aufteilung der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte in Gruppen nach normalem und verändertem Gewebe und erneuter Korrelation, zeigt sich als Erstes, dass die Varianten beta 1, 2 und 5 kaum mehr signifikante Korrelationen mit den Markern in den pathologischen (G1-G3) oder gesunden Proben aufweisen (vgl. Tabelle 9 und 10). $\Delta 4$ hingegen korreliert hingegen in den pathologischen Proben noch mit einer Reihe von Markern, dies lässt auf einen stärkeren Zusammenhang schließen.

Tabelle 9: Korrelation zwischen Markergenen und Varianten in pathologischen Proben (G1-G3)

Gen	beta 1	beta 2	beta 5	$\Delta 4$
BAG1				p<0,0001 r=0,5774
Bcl2	p=0,0277 r=0,2691	p=0,0442 r=0,2217	p=0,0394 r=0,228	p<0,0001 r=0,6171
Cathepsin L2				p=0,0338 r=-0,2541
CD68	p=0,0007 r=0,3966	p=0,0001 r=0,4005		
E-Cadherin				p=0,0045 r=0,3616
GRB7	p=0,0027 r=0,3668	p=0,0046 r=0,0222		p<0,0001 r=0,4453
Her2				p<0,0001 r=0,4781
Ki-67				p=0,0123 r=-0,2859
MYBL2				p<0,0001 r=-0,4857
p21/WAF				p<0,0001 r=0,549
PTEN			p=0,004 r=0,3105	p<0,0001 r=0,4994
SCUBE2				p<0,0001 r=0,651
STK15				p=0,0012 r=-0,3557

Tabelle 10: Korrelation zwischen Markergenen und Varianten in gesunden Proben (no)

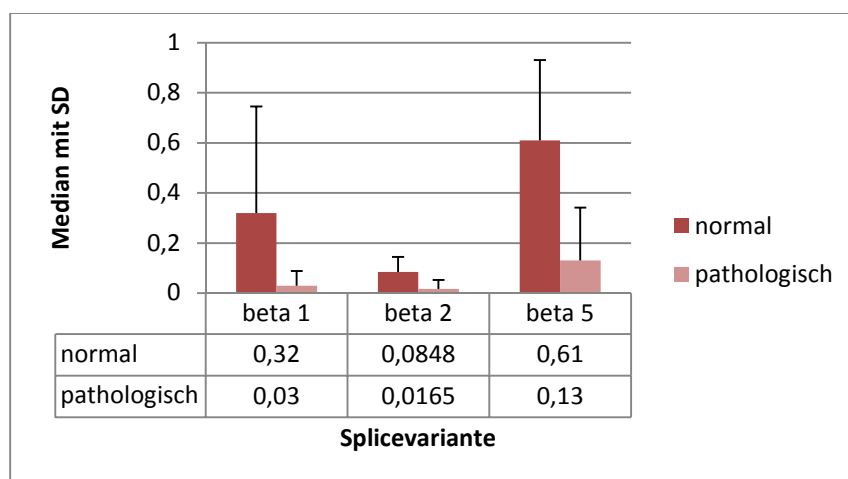
Gen	beta 1	beta 2	beta 5	Δ4
MYBL2			p=0,0492 r=-0,3751	
SCUBE2	p=0,0175 r=-0,4378			p=0,0047 r=0,5097

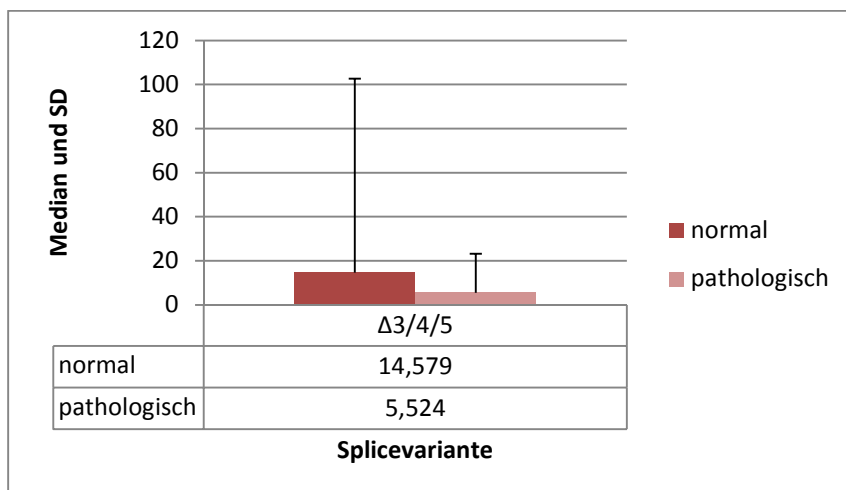
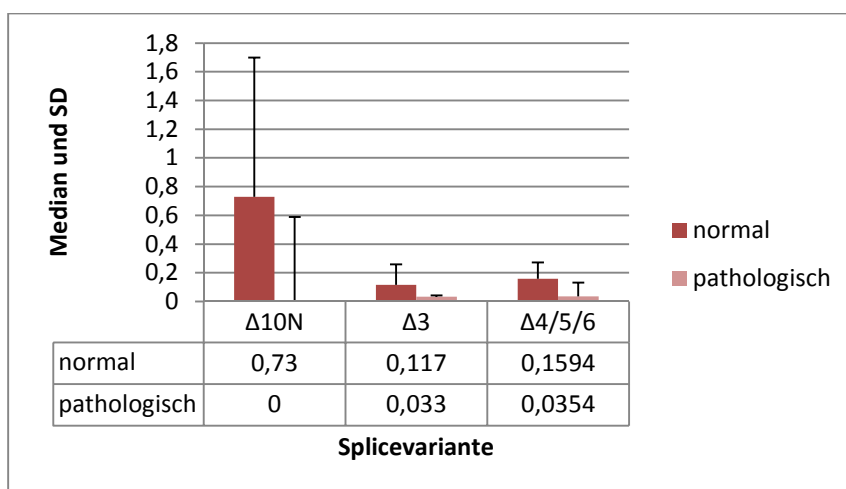
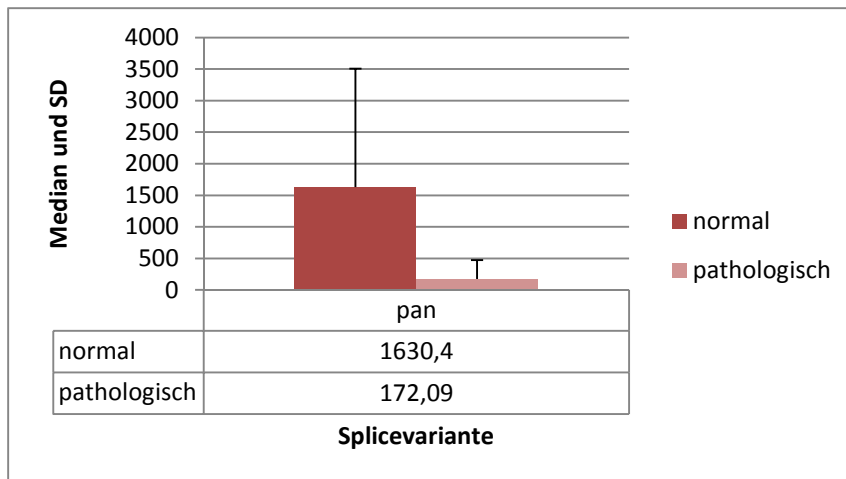
Insgesamt lässt sich keine Splicevariante nur mit einer Art von Markern in Verbindung bringen. Die Funktion der einzelnen Varianten ist also komplexer als eine einfache Zuordnung zu benigne oder maligne.

4.6. Mann-Whitney Test zum Vergleich der Gradings

Als weiterer Test wird der Mann-Whitney Test verwendet. Dies ist ein parameterfreier Test, der ungepaart und zweiseitig ist und die Mediane vergleicht. Pro Splicevariante werden zunächst die gesunden mit den pathologisch veränderten Proben verglichen. Dabei gibt es bei fast allen Vergleichsgruppen signifikante Unterschiede. Nur Δ10K, Δ4, Δ4/5 und Δ1/2/30N unterscheiden sich nicht signifikant. Die signifikanten Ergebnisse zeigt Diagramm 11. Die p-Werte gelten dabei wie folgt: beta 1, 2, 5, Δ10N, Δ3, Δ4/5/6 und pan: $p < 0,0001$ und Δ3/4/5: $p = 0,0252$.

Diagramm 11 Zeigt die Mediane und die Standardabweichungen (SD) ausgehend von den ΔΔCt-Werte. Gezeigt werden die signifikanten Ergebnisse des Mann-Whitney Tests zwischen den normalen und pathologischen Proben G1-G3





Die Diagramme zeigen, dass bei allen signifikanten Ergebnissen die normalen Proben einen höheren Median aufweisen und somit eine höhere Expressionsstärke haben.

Um einen genaueren Einblick zu bekommen werden im nächsten Schritt die Proben getrennt nach G-Stadien untersucht (s. Tabelle 11) und die einzelnen G-Stadien (G1α+ gegen G3α pos.

bzw. neg.) miteinander verglichen (s. Tabelle 8). Hierbei soll gezeigt werden, wie sich die Variante im Krankheitsverlauf verhält. Ausgangswerte sind die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte.

Tabelle 11 Zeigt die signifikanten Ergebnisse des Mann-Whitney Testes zwischen den gesunden Proben und den G-Stadien:

Variante	Testgröße	Signifikanz	Median
pan	no vs. G1 α +	p<0,0001	no: 1630,4
	no vs. G3 α -	p<0,0001	G1α+: 209,5
	no vs. G3 α +	p<0,0001	G3α-: 187,7 G3α+: 151,77
beta 1	no vs. G1 α +	p<0,0001	no: 0,32
	no vs. G3 α -	p<0,0001	G1α+: 0,03
	no vs. G3 α +	p<0,0001	G3α-: 0,04 G3α+: 0,02
beta 2	no vs. G1 α +	p<0,0001	no: 0,085
	no vs. G3 α -	p<0,0001	G1α+: 0,018
	no vs. G3 α +	p<0,0001	G3α-: 0,17 G3α+: 0,01
beta 5	no vs. G1 α +	p<0,0001	no: 0,61
	no vs. G3 α -	p<0,0001	G1α+: 0,18
	no vs. G3 α +	p<0,0001	G3α-: 0,17 G3α+: 0,11
Δ10K	no vs. G3 α +	p=0,0172	no: 208,62 G3α+: 99,961
Δ10N	no vs. G1 α +	p<0,0001	no: 0,73
	no vs. G3 α -	p=0,0004	G1α+: 0
	no vs. G3 α +	p<0,0001	G3α-: 0,09 G3α+: 0
Δ3	no vs. G1 α +	p=0,0064	no: 0,117
	no vs. G3 α -	p=0,0006	G1α+: 0,043
	no vs. G3 α +	p<0,0001	G3α-: 0,028 G3α+: 0,026
Δ4	no vs. G1 α +	p=0,0001	no: 0,192
	no vs. G3 α -	p<0,0001	G1α+: 0,651 G3α-: 0,01
Δ3/4/5	no vs. G3 α -	p=0,0464	no: 14,579
	no vs. G3 α +	p=0,0167	G3α-: 4,045 G3α+: 5,448
Δ4/5/6	no vs. G1 α +	p<0,0001	no: 0,159
	no vs. G3 α -	p=0,0009	G1α+: 0,035
	no vs. G3 α +	p<0,0001	G3α-: 0,043 G3α+: 0,035

Die genauere Untersuchung der G-Stadien zeigt, dass $\Delta 4$, welche im allgemeinen Vergleich von gesunden zu tumorösen Proben keine signifikanten Unterschiede zeigte, sich nun im Vergleich von no vs. G1 α + und no vs. G3 α - als signifikant verschieden erweist.

Des Weiteren zeigen diese Tabellen deutlich, dass es bei den meisten Varianten zwischen Normalgewebe und Tumorgewebe starke Unterschiede in der Ausprägung der einzelnen Splicevarianten gibt. Die Ursache hierfür ist eine Veränderung der Expression im Verlauf der Karzinogenese. Vergleicht man jedoch innerhalb der unterschiedlichen Gradingstufen (s. Tabelle 12) sind nur noch bei fünf Varianten Unterschiede auszumachen. Besonders auffällig ist die Variante $\Delta 4$. Vergleicht man gesundes Gewebe mit dem erkrankten zeigt es in der Stufe G3 α + keine Unterschiede. Vergleicht man jedoch die unterschiedlichen Gradings miteinander, zeigen sich signifikante Unterschiede. Dies entspricht den Daten des Probenprofils. Dort wird eine Sonderrolle von G3 α - deutlich, da diese Gradingstufe keine Probe mit starker Expression aufweist und lediglich drei Proben mit mittlerer Expression. Gleiches gilt für G1 α + welche im Vergleich zu den anderen Varianten extrem viele Proben mit starker Expression zeigt.

Tabelle 12 Zeigt die signifikanten Ergebnisse des Gradingvergleichs.

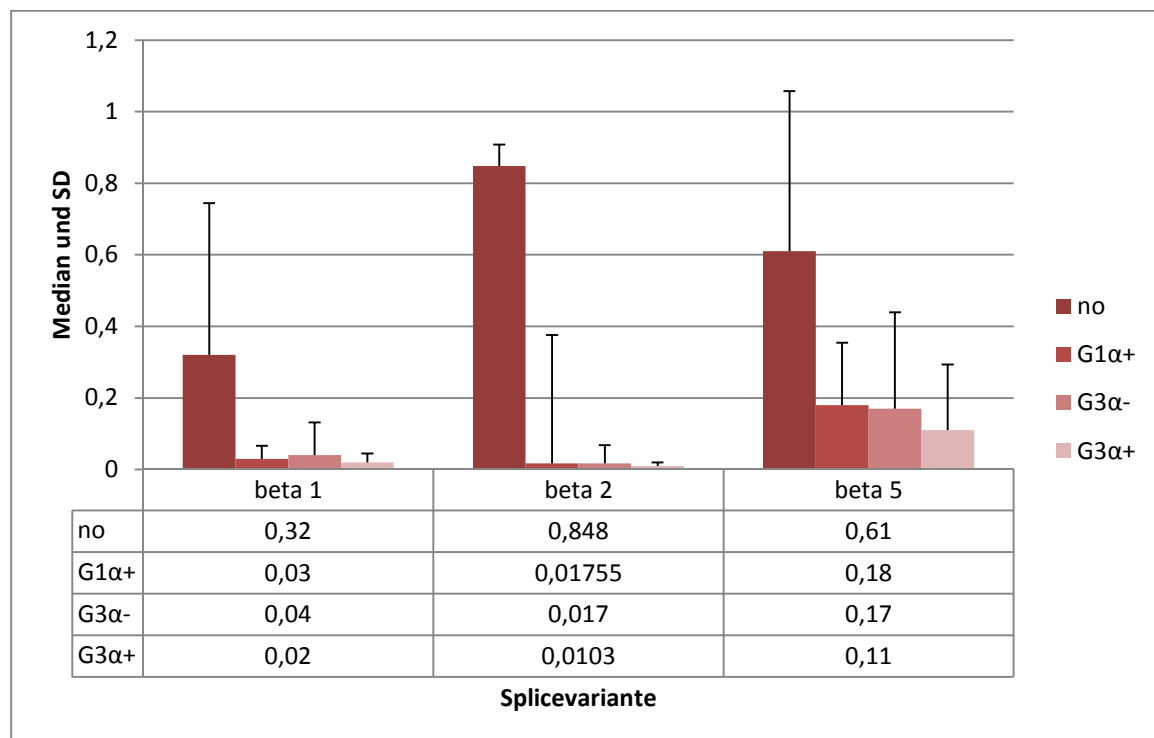
Variante	Vergleichspaare	Signifikanz	Mediane
beta 2	G1 α + vs. G3 α +	p=0,0177	G1 α +: 0,01755 G3 α +: 0,0103
beta 5	G1 α + vs. G3 α +	p=0,0337	G1 α +: 0,18 G3 α +: 0,11
$\Delta 10K$	G1 α + vs. G3 α +	p=0,0199	G1 α +: 249,57 G3 α +: 99,961
$\Delta 3$	G1 α + vs. G3 α +	p=0,0486	G1 α +: 0,0425 G3 α +: 0,026
$\Delta 4$	G1 α + vs. G3 α +	p< 0,0001	G1 α +: 0,651
	G1 α + vs. G3 α -	p< 0,0001	G3 α +: 0,15 G3 α -: 0,0095

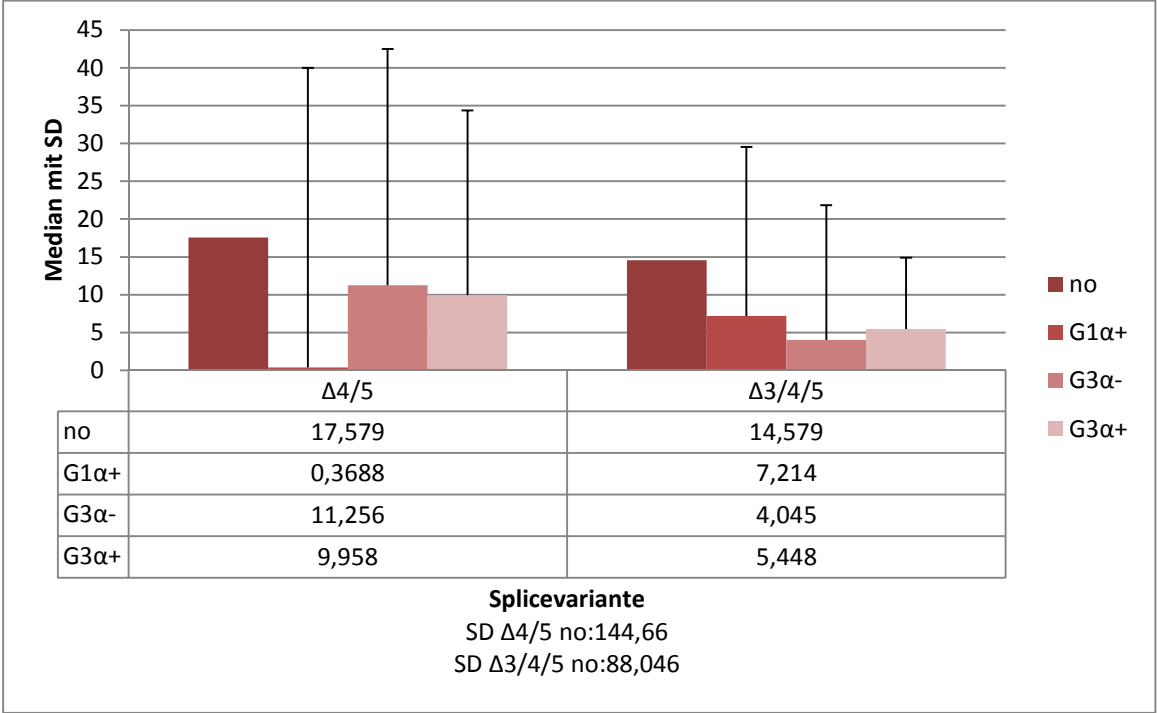
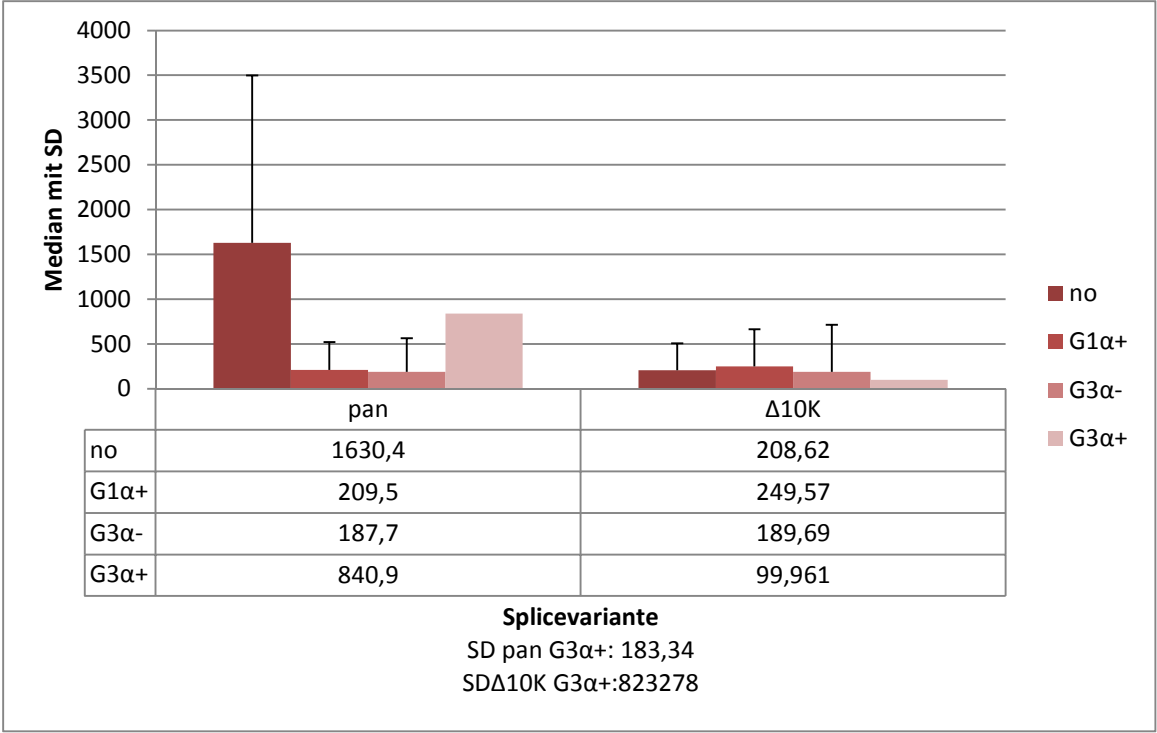
Es fällt auf, dass sich vor allem das Stadium G1 α + vom Stadium G3 α + unterscheidet. Nur bei $\Delta 4$ ergibt sich zusätzlich ein signifikantes Ergebnis im Vergleich von G1 α + zur Gruppe G3 α -.

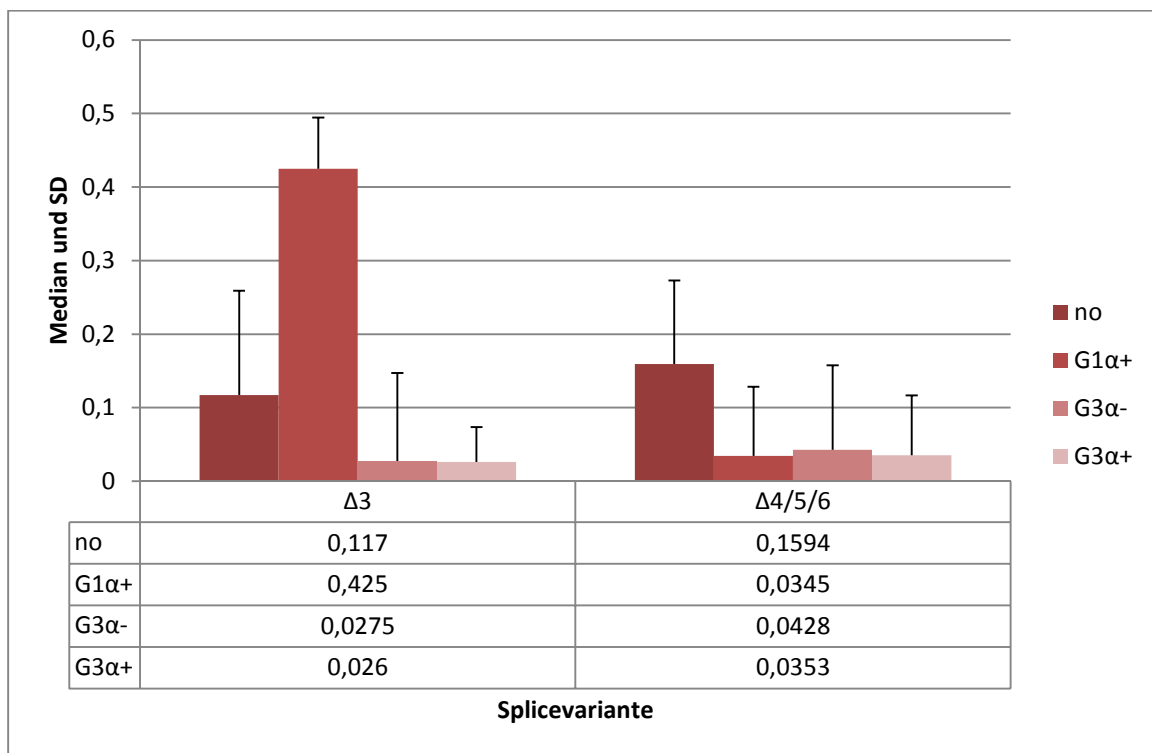
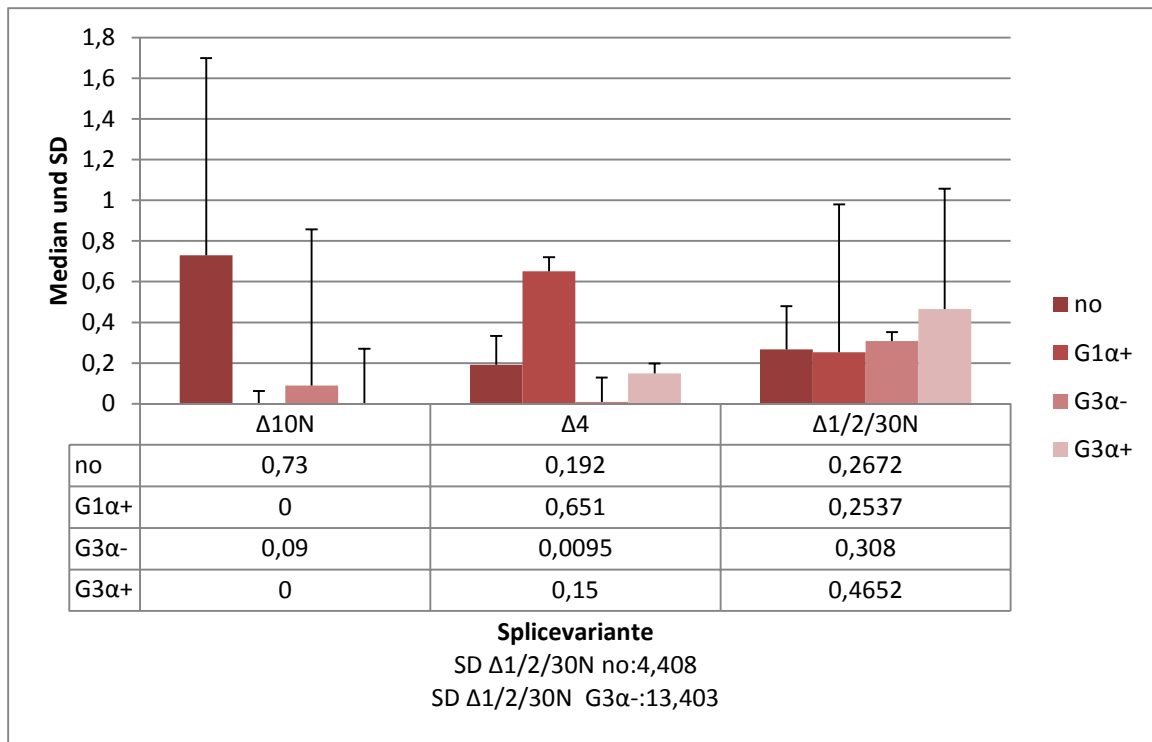
Überhaupt keine signifikanten Ergebnisse gibt es für die folgenden Varianten: beta 1, $\Delta 10N$, $\Delta 4/5$, $\Delta 1/2/30N$, $\Delta 3/4/5$, $\Delta 4/5/6$ und pan. Außerdem sind die Vergleiche folgender Varianten nicht signifikant: beta 2 (G1 α + vs. G3 α -), beta 5 (G1 α + vs. G3 α -), $\Delta 10K$ (G1 α + vs. G3 α -), $\Delta 3$

(G1 α + vs. G3 α -) und pan (G1 α + vs. G3 α -). Da sich diese Varianten, bis auf Δ 10K, Δ 4/5 und Δ 1/2/30N signifikant unterschiedlich im Vergleich von no vs. alle pathologischen Proben zeigen, lässt dies darauf schließen, dass sich die Variante nur zu Beginn der Erkrankung verändert, d.h. ihre Expressionsstärke ändert, jedoch nicht mehr im Verlauf, bzw. nur noch sehr wenig. Die Mediane, die in Tabelle 11 und 12 dargestellt sind, zeigen eine Abnahme der Expressionsstärke von G1 α + zu G3. Insbesondere ist interessant, dass die meisten Varianten einen höheren Median in der Gruppe G3 α - zeigen, als in G3 α +. Dies trifft unter anderem für die Hauptvarianten beta 1-5 zu. Δ 4 und Δ 3/4/5 weisen hingegen eine höhere Expression in G3 α + auf. Dieses Ergebnis passt zu der in 4.2. nachgewiesenen Korrelation zwischen Δ 4 und ER α , bzw. der nicht vorhandenen Korrelation von ER α mit den restlichen Varianten.

Diagramm 12 zeigt die Mediane der einzelnen Gradingstufen und des gesunden Gewebes







In den Diagrammen sieht man deutlich die starke Expression der einzelnen Varianten in gesundem Gewebe, insbesondere beim Wildtyp und den Varianten beta 2 und beta 5. Außerdem wird die in der Literatur¹¹² beschriebene, beta 1 übertreffende Ausprägung von beta2

¹¹² Mitter, Ortman, und Treack, „Estrogen receptor Beta isoforms -- functions and clinical relevance in breast cancer“.

hier bestätigt. $\Delta 10K$, $\Delta 3$, $\Delta 4$ und $\Delta 1/2/30N$ haben allerdings als Gruppe mit der stärksten Expression nicht das gesunde Gewebe, sondern $G1\alpha+$, bzw. $\Delta 1/2/30N$ die Gruppe $G3\alpha+$.

Um noch einmal die im Probenprofil aufgefallenen Unterschiede zwischen $\Delta 4$ und den anderen Varianten genauer zu beleuchten, werden die unterschiedlichen Erkrankungsstadien von $\Delta 4$ und den weiteren Varianten verglichen. Das Ergebnis zeigt Tabelle 13:

Tabelle 13: Vergleich von $\Delta 4$ und der angegebenen Variante, je angegebener Gradingstufe. Angegeben ist der jeweilige p-Wert der signifikanten Ergebnisse, sowie der entsprechende Median

Variante	no	$G1\alpha+$	$G3\alpha-$	$G3\alpha+$
Median $\Delta 4$	0,192	0,043	0,028	0,026
pan	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Median	1630,4	209,5	187,7	151,77
beta 1		0,0004		0,0076
Median	0,32	0,03	0,04	0,02
beta 2			0,0455	
Median	0,085	0,018	0,17	0,01
beta 5		0,0012		0,0232
Median	0,61	0,18	0,17	0,11
$\Delta 10K$	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Median	208,62	249,57	189,69	99,961
$\Delta 10N$		0,0002		0,0024
Median	0,73	0	0,09	0
$\Delta 3$		0,0026		0,0394
Median	0,117	0,043	0,028	0,026
$\Delta 4/5$			<0,0001	0,0005
Median	17,579	0,3688	11,256	9,958
$\Delta 3/4/5$	0,0023	0,0003	<0,0001	<0,0001
Median	14,579	7,214	4,045	5,448
$\Delta 4/5/6$	0,0238		0,0293	
Median	0,159	0,035	0,043	0,035
$\Delta 1/2/30N$				
Median	0,2672	0,2537	0,3080	0,4652

Die Tabelle zeigt, dass auch im Vergleich der Mediane sich die normalen Proben der Varianten nur sehr selten signifikant von $\Delta 4$ unterscheiden. Dies entspricht dem Ergebnis des Probenprofils, welche auch keine signifikanten Unterschiede in der Ausprägung von $\Delta 4$ und den anderen Proben zeigt, wenn man rot und blau als eine Gruppe betrachtet. Somit ist $\Delta 4$ in gesundem Brustgewebe entsprechend allen anderen Varianten ausgeprägt.

Auch die starken Unterschiede in der Gruppe G1 α + spiegeln sich hier wieder. Vergleicht man die Mediane, so liegen die signifikanten Ergebnisse bei fast allen Varianten, an einer höheren Expression von $\Delta 4$. Nur pan, $\Delta 10K$ und $\Delta 3/4/5$ haben als Ursache selber den höheren Median.

In der Gruppe G3 α + gibt es ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen $\Delta 4$ und den anderen Varianten. Im Probenprofil konnte dieser Sachverhalt beim Vergleich von roten und blauen Proben mit den gelben nachgewiesen werden. Die Varianten pan, $\Delta 10K$, $\Delta 3/4/5$ und $\Delta 4/5$ weisen insgesamt ein höheres Expressionslevel als $\Delta 4$ auf, sodass hier die Signifikanz auf höheren Werten dieser Varianten beruht. Die anderen oben aufgezeigten signifikanten Ergebnisse sind auf niedrigere Mediane der Varianten zurück zu führen.

Die Beobachtung aus dem Probenprofil, dass es im Stadium G3 α - keine einzige Probe mit starker Expression gibt, spiegelt sich auch in diesem Daten wieder. Daher weisen die meisten Varianten signifikante Unterschiede zu $\Delta 4$ in diesem Stadium auf.

4.7. Matched pairs

Für einen weiteren Test werden jeweils Paare gebildet. Das heißt, es gab von einigen Karzinompatienten auch Proben mit physiologischem Gewebe. Diese Proben werden im folgenden Test karzinomatösen Proben gegenüber gestellt. Insgesamt gibt es 27 dieser Paare. Angewandt wurde der Wilcoxon matched-pairs signed-ranks Test. Dies ist ein verteilungsfreier Test, der gepaart und zweiseitig ist und für nicht-normalverteilte Werte gilt. Er vergleicht die Mediane. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 14.

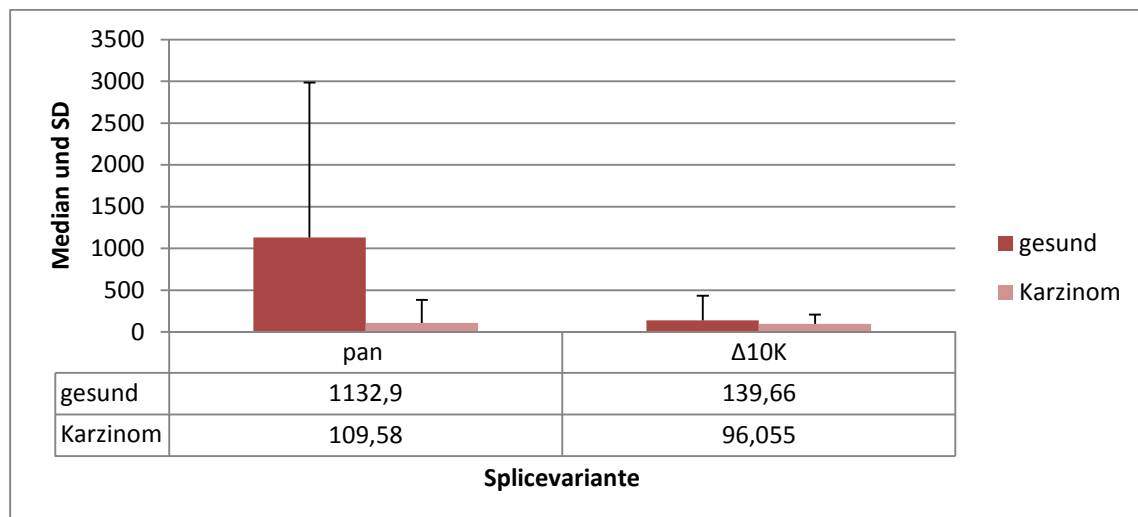
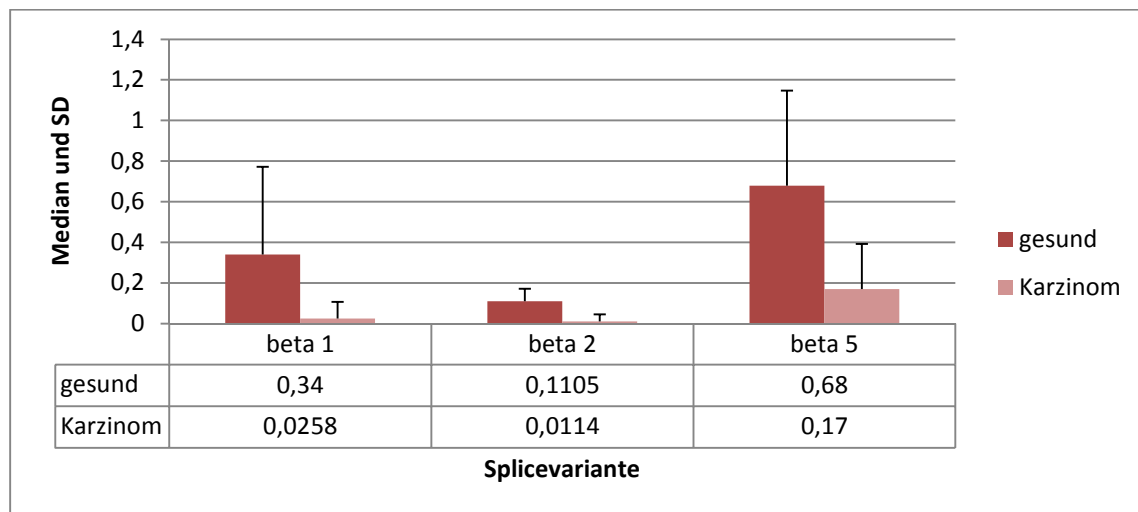
Ziel des Testes ist es, den Verlauf der einzelnen Varianten im Krankheitsverlauf zu zeigen und zu kennen, d.h. zu wissen, in welcher Art sich eine Variante von gesundem zu pathologischem Gewebe verändert.

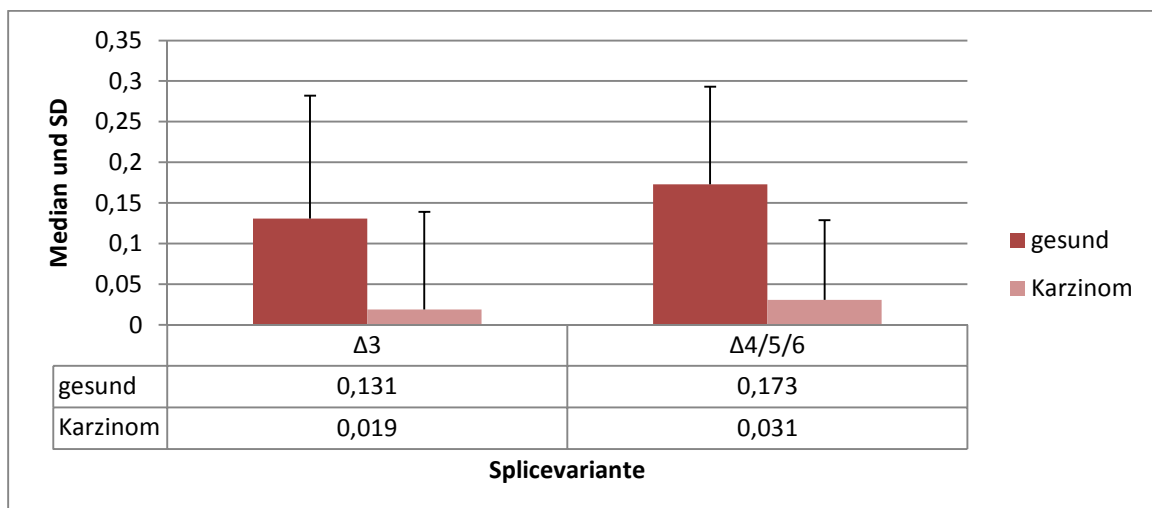
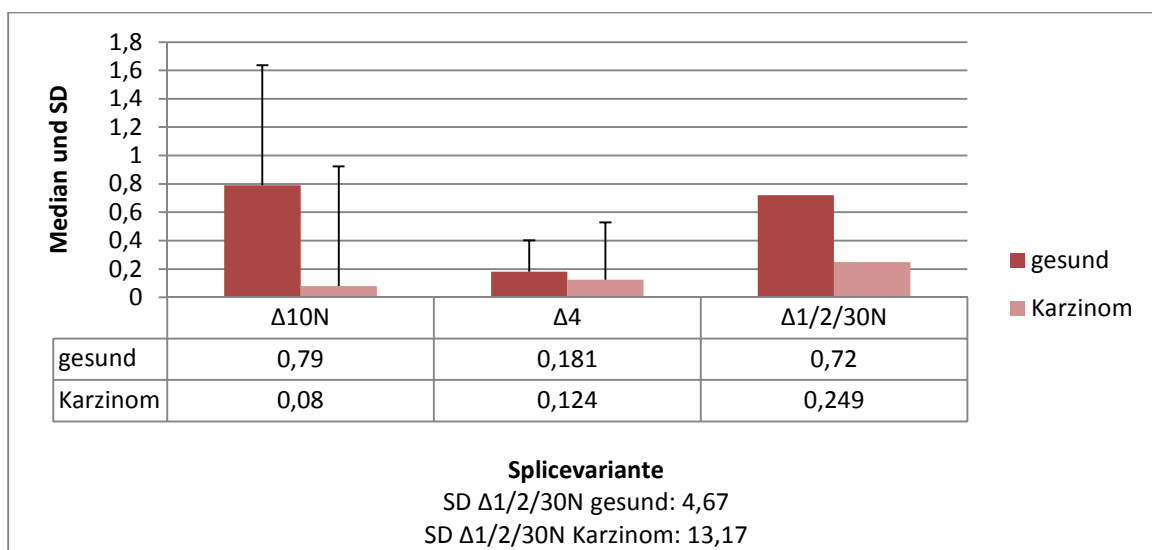
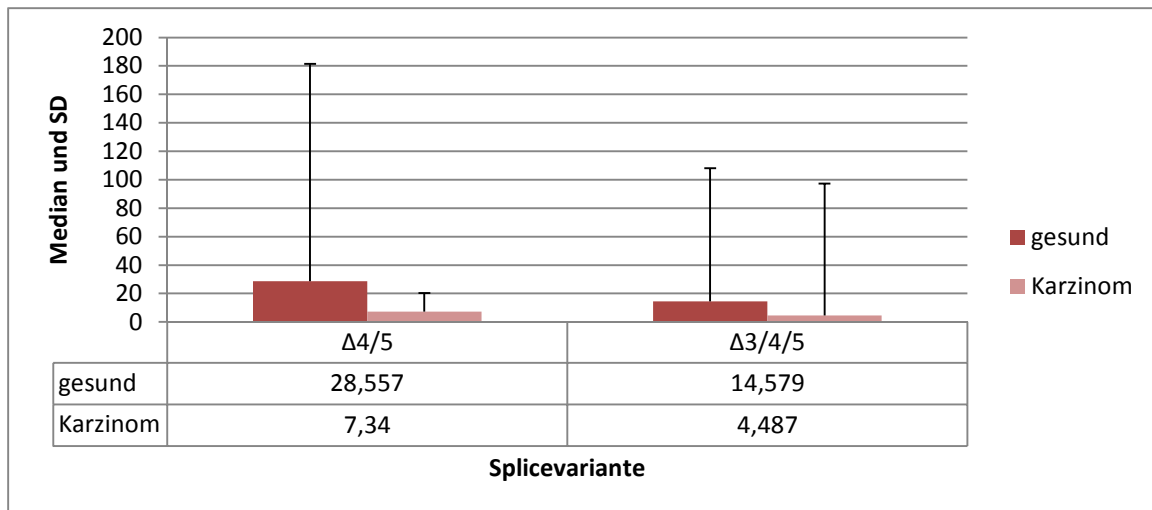
Tabelle 14: Wilcoxon matched pairs Test in gesundem und krankem (alle G-Stadien) Gewebe

Variante	p-Wert	Spearman Korrelationskoeffizient
beta 1	p<0,0001	r= 0,2843
beta 2	p<0,0001	r= 0,3553
beta 5	p<0,0001	r= 0,1039

$\Delta 10K$	nicht signifikant	
$\Delta 10N$	$p=0,0003$	$r= 0,4729$
$\Delta 3$	$p= 0,0059$	$r= -0,08313$
$\Delta 4$	nicht signifikant	
$\Delta 4/5$	$p=0,0056$	$r= -0,181$
$\Delta 1/2/30N$	nicht signifikant	
$\Delta 3/4/5$	$p=0,0055$	$r= 0,03356$
$\Delta 4/5/6$	$p<0,0001$	$r= 0,01007$
pan	$p=0,0003$	$r= 0,4188$

Diagramm 13: Mediane und Standardabweichungen aller matched pairs





Die meisten Paare unterscheiden sich im Wilcoxon matched pairs Test signifikant voneinander, und auch wenn sie es nicht tun, zeigt sich in den Tabellen deutlich, dass die Expression im Normalgewebe höher ist, als im pathologischen Gewebe. Die Korrelationskoeffizienten

sind überwiegend positiv, d.h. die Werte verändern sich gleichsinnig. Daraus kann geschlossen werden, dass sich das Niveau der Expressionsstärke von gesund zu pathologisch verändert. $\Delta 3$ und $\Delta 4/5$ hingegen weisen einen negativen Korrelationskoeffizienten auf, d.h. steigen die Werte in der einen Gruppe, sinken die Werte der anderen Gruppe. Daraus könnte man beispielsweise herleiten, dass je höher Expression in gesundem Gewebe ist, desto stärker nimmt sie im Krankheitsverlauf ab. Den Varianten gemeinsam ist, dass die Korrelationskoeffizienten relativ klein sind und der Zusammenhang daher nur recht schwach ausgeprägt ist.

Auffällig bei den matched pairs ist, dass die Variante $\Delta 4$ wieder eine Sonderrolle innehat. Denn dies ist die einzige Splicevariante, zusammen mit $\Delta 1/2/30N$ und $\Delta 10K$, bei der sich die Mediane der Paare im Gesunden nicht signifikant von den Medianen im karzinomatösen Gewebe unterscheiden. Bei allen dreien entspricht diese Beobachtung allerdings der aus dem Vergleich der Mediane (vgl. 4.7.).

Genau wie bei der Betrachtung der gesamten Proben (vgl. 4.7.) kann auch hier im Detail untersucht werden, ob die unterschiedliche Ausprägung der Varianten auch auf ein bestimmtes G-Stadium zutrifft. Von den 27 Paaren, fielen 10 Paare auf die Gruppe $G1\alpha+$, 10 auf die Gruppe $G3\alpha+$ und 7 auf die Gruppe $G3\alpha-$. Tabelle 15 zeigt die signifikanten Ergebnisse.

Tabelle 15: Wilcoxon-matched-pairs Test, aufgeteilt nach G-Stadien, jeweils im Vergleich mit no
r= Spearmankorrelationskoeffizient, n.s.= nicht signifikant

Variante	$G1\alpha+$	Median	$G3\alpha+$	Median	$G3\alpha-$	Median
beta 1	p=0,002 r= 0,516	no: 0,02 G1+: 0,025	p=0,004 r=0,27	no: 0,31 G3+: 0,025	p=0,031 r=-0,252	no: 0,42 G3-: 0,04
beta 2	p=0,027 r=0,552	no: 0,102 G1+: 0,021	p=0,004 r=0,430	no: 0,09 G3+: 0,08	p=0,016 r=0,214	no: 0,013 G3-: 0,11
beta 5	p=0,02 r=0,346	no: 0,59 G1+: 0,18	p=0,01 r=0,261	no: 0,805 G3+: 0,12	p=0,016 r=-0,180	no: 0,76 G3-: 0,17
$\Delta 10N$	p=0,039 r=0,706	no: 0,445 G1+: 0,085	p=0,008 r=0,0195	no: 1,095 G3+: 0,03	n.s.	
$\Delta 3$	n.s.		p=0,02 r=-0,511	no: 0,098 G3+: 0,016	n.s.	
$\Delta 4$	n.s.		n.s.		p=0,009 r=-0,2	no: 0,151 G3-: 0,009
$\Delta 4/5$	p=0,039 r=0,053	no: 24,523 G1+: 0	n.s.		n.s.	
$\Delta 1/2/30N$	p=0,02 r=-0,236	no: 1,282 G1+: 0	n.s.		n.s.	

Δ3/4/5	n.s.	p=0,037 r=-0,135	no: 20,704 G3+: 4,043	n.s.	
Δ4/5/6	n.s.	p=0,01 r=-0,430	no: 0,197 G3+: 0,023	p=0,031 r=0,286	no: 0,187 G3-: 0,042

Die genauere Untersuchung zeigt, dass die Hauptvarianten sich auch in den Untergruppen signifikant unterscheiden. Dabei weisen sie positive Korrelationskoeffizienten auf, außer in G3α- der Varianten beta 1 und 5. Die weiteren Splicevarianten zeigen in unterschiedlichen Gradings signifikante Unterschiede. ERβΔ10K und pan zeigen bei dieser Untersuchung keine signifikanten Resultate. Für Δ10K ist dies übereinstimmend mit den Ergebnissen aus Tabelle 14, daher scheint es stabil innerhalb eines Patienten ausgeprägt zu sein. Pan unterscheidet sich nur, wenn man alle Gradingstufen zusammen vergleicht.

Die Zusammenschau beider Untersuchungen zeigt, dass Δ4 bei genauerer Betrachtung signifikante Unterschiede zwischen „no“ und G3α- zeigt, obwohl es im allgemeinen Vergleich keine Unterschiede aufwies. Das heißt, die Mediane in G3α- scheinen sich stärker vom normalen Gewebe zu unterscheiden, als es die Mediane der anderen Gradings von Δ4 tun.

5. Diskussion

5.1. Korrelation mit Markergenen

Als Tumorsuppressoren werden Gene bezeichnet, welche ungehindertes Zellwachstum, sowie ungehinderte Zellteilung hemmen. Dies geschieht unter anderem indem sie die Apoptose einleiten, wenn sie beschädigte DNA detektieren. Dafür interagieren sie mit dem Zellzyklus.¹¹³ In diesem Sinne werden SCUBE2, E-Cadherin, PTEN¹¹⁴ und p21/WAF gewertet, da sie im Falle einer Dysfunktion eine Tumorentstehung begünstigen. Es konnte gezeigt werden, dass Mutationen von PTEN zu aggressiveren Formen des Mammakarzinoms führen. Diese Tumoren weisen eine schlechtere Prognose, schlechtere Therapieoptionen und –ansprechen auf. Des Weiteren beeinflusst die Expressionsstärke von PTEN das Outcome der Patienten. Zu beachten ist allerdings auch, dass nur wenige Patienten in die Gruppe des mutierten oder wenig exprimierten PTEN fallen.¹¹⁵ E-Cadherin gehört zu der Gruppe der transmembranen Adhäsionsproteine und kommt vor allem im Epithel vor. Sein Verlust führt zu Entdifferenzierung und Invasion von Karzinomen. Im Falle des Mammakarzinoms ist eine verminderte Expressionsrate bzw. eine abnehmende Rate die erste Veränderung in der Karzinogenese des lobulären, invasiven Karzinoms und E-Cadherin somit ein guter Marker der bei der Differenzierung zwischen einem carcinoma in situ und einem invasiven Karzinom hilft.^{116,117} p21/WAF ist ein cyclinabhängiger Kinaseinhibitor. Seine Hauptfunktion ist die Regulation des Zellzyklus, wobei es einen Arrest in der G₁-, G₂- oder S- Phase hervorrufen kann. Des Weiteren kann es die Zellproliferation, sowie die Apoptose inhibieren. p21/WAF wird unter anderem durch p53, einem weiterer Tumorsuppressor, aktiviert. Die Funktion als Tumorsuppressor wird besonders in p21/WAF knockout Mäusen deutlich, da diese nach ca. 16 Monaten spontane Tumoren entwickeln.¹¹⁸

Mit allen genannten Suppressorgenen korreliert $\Delta 4$, die Hauptsplicevarianten hingegen sind nur mit PTEN positiv assoziiert. Die Variante $\Delta 4$ zeigte eine starke oder extrem signifikante

¹¹³ Chau und Wang, „Coordinated regulation of life and death by RB“.

¹¹⁴ Mutter, „PTEN, a Protean Tumor Suppressor“.

¹¹⁵ Alimonti, „PTEN breast cancer susceptibility“.

¹¹⁶ Singhai u. a., „E-Cadherin as a diagnostic biomarker in breast cancer“.

¹¹⁷ Chintamani u. a., „Expression of E-Cadherin in breast carcinomas and its association with other biological markers -- a prospective study“.

¹¹⁸ Gartel und Radhakrishnan, „Lost in Transcription“.

positive Korrelation mit allen Proben (s. 4.5.2.), sowie den pathologischen Proben (s. Tabelle 9). Betrachtet man es genauer, gilt die Korrelation insbesondere für die Gruppe der G1 α + Karzinome. Sowohl SCUBE2 ($p=0,0118$, $r=0,4535$), als auch E-Cadherin ($p=0,0186$, $r=0,5086$) und p21/WAF ($p=0,032$, $r=0,5876$) zeigen bei diesen Proben signifikante Ergebnisse. Zusätzlich korreliert SCUBE2 auch noch mit der Gruppe G3 α - ($p=0,0035$, $r=0,6834$) und p21/WAF mit G3 α + ($p=0,0368$, $r=0,3963$). Im Weiteren zeigt sich auch zwischen SCUBE2 und beta 1 ($p=0,0175$, $r=-0,4378$) und $\Delta 4$ ($p= 0,0047$, $r=0,5097$) in den gesunden Gewebeproben ein signifikanter Zusammenhang, jedoch einmal positiv und einmal negativ. Dies ist besonders interessant, da Cheng et al. zeigen konnten, dass Patienten mit SCUBE2 exprimierenden Tumoren ein besseres krankheitsfreies Überleben haben und es die Proliferation der malignen Zellen unterdrückt.¹¹⁹ Zwei Jahre später konnten sie nachweisen, dass die Wachstumshemmung unter anderem durch Unterdrückung des β -Catenin Signalweg erfolgt.¹²⁰ Diese Resultate passen zu der Vorstellung von ER β als Tumorsuppressor, da die Expression von $\Delta 4$ in pathologisch verändertem Gewebe gemeinsam mit den Tumorsuppressormarkern niedrig ist. Gleiches gilt für die Hauptvarianten, lediglich die negative Korrelation von beta 1 und SCUBE2 passt nicht ins dieses Bild.

Sowohl die Hauptvarianten, als auch $\Delta 4$ korrelieren positiv mit Bcl2, dies entspricht den Beobachtungen von Hori et al., die ebenfalls eine Assoziation zwischen ER und dem antiapoptotischen Bcl2 nachweisen konnten.¹²¹ B-cell lymphoma 2 (Bcl2) ist ein wichtiges Protein in der Regulation des Zellzyklus.¹²² Es ist assoziiert mit einem besseren Überleben und zwar umso mehr, je stärker die Positivität für Bcl2 ist, somit gilt dieser Marker als ein Indikator für eine günstige Prognose.¹²³ Bcl2 ist korreliert mit BAG1¹²⁴ und wird unter anderem von MYBL2 (=Myb related protein B 2) reguliert. Mit diesem Gen besteht eine negative Korrelation der vier Varianten: beta 1,2 und 5, sowie $\Delta 4$. Das Gen codiert für ein Protein, welches ein Transkriptionsfaktor ist und in den Zellzyklus involviert ist. Es tritt vermehrt im Tumorgewebe auf. Seine Anwesenheit ist ein Indikator für ein schlechteres Überleben, was vermutlich daran liegt, dass eine hohe Expressionsrate vor allem in basal-like Tumoren vorkommt. In die-

¹¹⁹ Cheng u. a., „SCUBE2 Suppresses Breast Tumor Cell Proliferation and Confers a Favorable Prognosis in Invasive Breast Cancer“.

¹²⁰ Lin u. a., „Domain and Functional Analysis of a Novel Breast Tumor Suppressor Protein, SCUBE2“.

¹²¹ Hori u. a., „Expression of Bcl-2 in Human Breast Cancer“.

¹²² Pietenpol u. a., „Paradoxical Inhibition of Solid Tumor Cell Growth by bcl2“.

¹²³ Dawson u. a., „BCL2 in Breast Cancer“.

¹²⁴ Townsend u. a., „BAG-1 Expression in Human Breast Cancer“.

ser Unterart sorgt es allerdings gleichzeitig für ein verbessertes Ansprechen auf anthrazyklinhaltige Chemotherapie. Eine hohe Expressionsrate von MYBL2 gilt als Risikofaktor für die Entwicklung eines basal-like Tumors.¹²⁵ Er ist im Oncotype dx array© in der Gruppe der Proliferationsmarker zu finden und gehört somit zur Gruppe der Onkogene. Durch die negative Korrelation der oben genannten Varianten wird deren Position als Tumorsuppressor dargestellt. Des Weiteren zeigen $\Delta 4$ und beta 1,2 und 5 eine negative Korrelation mit STK15. STK15, auch Aurora A Kinase genannt, ist Teil der Kinasefamilie und in Karzinomen überexprimiert.¹²⁶ Auch dieses Gen fällt in die Gruppe der Proliferationsmarker im Oncotype dx array©. Neuste Studien konnten zeigen, dass das STK15 Expressionslevel jenes von Ki-67 übersteigt. Hohe Ki-67 Level, ein PR negativer Status und ein hoher LK-Status führen zu hohen Aurora A Kinase mRNA Leveln. Zusammen sind diese Faktoren mit einem schlechteren Rezidiv freien Überleben assoziiert. Ein weiteres wichtiges Ergebnis der Studie von Yamamoto et al. ist, dass das Expressionslevel von Aurora das Proliferationspotential eines Tumors aufdecken kann.¹²⁷ Die negative Korrelation der Varianten mit STK15, lässt auch hier auf eine Tumorsuppressorfunktion von $\Delta 4$ und beta 1,2 und 5 schließen, da sie scheinbar in der Expressionsstärke im Vergleich zu diesem Markergen abnehmen. Ein weiterer Proliferationsmarker ist Ki-67. Sein Auftreten ist mit einem guten Ansprechen auf Chemotherapie assoziiert, was aber vermutlich an dem erhöhten Basisrisiko der Patienten mit hohem Ki-67 liegt.¹²⁸ Wichtig ist er für die Einteilung des Karzinoms in Luminal A oder B, wenn die Tumoren ER und/oder PR positiv und Her2 negativ sind. Sie werden dann unterschieden durch ihre Ki-67 Expressionsstärke. Ist diese unter 14%, so liegt Typ A vor, ist sie gleich oder größer 14% liegt Typ B vor. Momentan sind die Meinungen jedoch geteilt, ob der luminal Typ Einfluss auf die Therapieentscheidung haben soll, der St. Gallen Konsensus empfiehlt dies, die S3-Leitlinie hingegen nicht.¹²⁹ In unserer Untersuchung zeigten sich beta 1, beta 2 und $\Delta 4$ negativ korrelierend mit diesem Marker und entsprechen damit den Ergebnissen verschiedener Studien u.a. von Roger et al.¹³⁰, sowie Skliris et al.¹³¹, die ebenfalls eine negative Korrelation zwischen

¹²⁵ Thorner u. a., „In Vitro and In Vivo Analysis of B-Myb in Basal-Like Breast Cancer“.

¹²⁶ Tanaka u. a., „Centrosomal Kinase AIK1 Is Overexpressed in Invasive Ductal Carcinoma of the Breast“.

¹²⁷ Yamamoto u. a., „A comprehensive analysis of Aurora A; transcript levels are the most reliable in association with proliferation and prognosis in breast cancer“.

¹²⁸ Schmidt u. a., „Biomarkers in Breast Cancer – An Update“, 828–829.

¹²⁹ „S3_Brustkrebs_Update_2012_OL_Langversion.pdf“, 104.

¹³⁰ Roger u. a., „Decreased Expression of Estrogen Receptor B Protein in Proliferative Preinvasive Mammary Tumors“.

¹³¹ Skliris u. a., „Expression of oestrogen receptor- β in oestrogen receptor- α negative human breast tumours“.

ER β und Ki-67 nachweisen konnten. Skliris et al. konnten jedoch lediglich eine Assoziation in ER α - Karzinomen zwischen beta 1, sowie pan und Ki-67 zeigen, wohingegen in unserer Studie auch beta 2 mit Ki-67 korreliert. Dieser negative Zusammenhang mit dem Proliferationsmarker lässt auf jeden Fall den Rückschluss zu, dass ER β in irgendeiner Form mit der Proliferation in Zusammenhang steht. Eine antiproliferative Funktion vermuten auch die beiden oben genannten Autoren. Andere¹³² konnten keinen Zusammenhang feststellen, sodass Skliris diese These nur für alpha negative Tumoren als möglich ansah. Unsere Daten unterscheiden in dieser Untersuchung jedoch nicht den alpha-Status und zeigen trotzdem eine negative Korrelation, sodass scheinbar der negative ER α -Status nicht zwingend erforderlich sein muss. Mit dem letzten Marker der Proliferationsgruppe Cyclin B1 korreliert in unserer Untersuchung lediglich beta 2 negativ. Alle anderen zeigen keine Assoziation. Es konnte gezeigt werden, dass Cyclin B1 Level im Verlauf der Tumorgenese stetig ansteigen.¹³³ Darüber hinaus ist eine hohe Cyclin B1 Expression korreliert mit größeren Tumoren, positivem LK-Status, höherem Grading, ER und PR Negativität, sowie weiteren Markern die Hinweise für eine schlechtere Prognose sind. Auffällig war in dieser Studie auch, dass unter triple negativen Tumoren ein hohe Cyclin B1 Ausprägung häufiger vorkam.¹³⁴ Zusammenfassend ist zu sagen, dass beta 1, 2 und 5, sowie $\Delta 4$ negativ mit der Proliferationsgruppe korrelieren und sie damit ihre Tumorsuppressorbedeutung unterstreichen.

In der Gruppe der Invasionsgene sind Stromyelsin3 (=MMP11) und Cathepsin L2 (=V) zu finden. Die von uns untersuchten Splicevarianten bzw. der Wildtyp zeigen nur mit Stromyelsin3 eine negative Korrelation. Die große Gruppe der MMPs (Matrixmetalloproteasen) gehört zu den zinkabhängigen Endopeptidasen, welche u.a. extrazelluläre Matrixproteine abbauen. Sie spielen eine vielfältige Rolle im Zellzyklus und können sich gegenseitig aktivieren. In Mammakarzinomen sind sie überexprimiert zu finden und stimulieren die Tumorgenese, Zellinvasion und Metastasierung. Die Funktionsweise der einzelnen Unterformen ist verschieden. Ist MMP11 (=Stromyelsin3) in sogenannten „null mice“ ausgeschaltet, zeigen diese weniger spontane Brustkrebserkrankungen. Daraus lässt sich eine Promoterfunktion von MMP11 für die Karzinogenese ableiten, welche Auswirkungen auf die gesamte Tumorent-

¹³² Fuqua u. a., „Estrogen Receptor B Protein in Human Breast Cancer Correlation with Clinical Tumor Parameters“.

¹³³ Kawamoto, Koizumi, und Uchikoshi, „Expression of the G2-M Checkpoint Regulators Cyclin B1 and cdc2 in Nonmalignant and Malignant Human Breast Lesions“.

¹³⁴ Aaltonen u. a., „High Cyclin B1 Expression Is Associated with Poor Survival in Breast Cancer“.

stehung hat.¹³⁵ Wie in der Gruppe der Proliferationsmarker ist eine negative Korrelation ein Hinweis auf die Tumorsuppressorfunktion. Das $\Delta 4$ nicht mit diesem Gen assoziiert ist, bedeutet allerdings nicht, dass es eine umgekehrte Funktion hat. Möglicherweise würden in einer größeren Untersuchung Verbindungen bzw. weitere Einflussfaktoren sichtbar werden.

Her2, Teil der Wachstumsfaktorfamilie mit stimulierender Funktion auf die Zellproliferation, wird routinemäßig bei jedem Patienten mit Mammakarzinom mit Hilfe von Immunhistochemie bestimmt. Er galt ursprünglich als Marker für eine schlechte Prognose. Durch den Einsatz einer zielgerichteten Antikörpertherapie mit Trastuzumab, sind die Aussichten dieser Patienten jedoch beinahe ins Gegenteil gekehrt worden, da das Therapieansprechen äußerst hoch ist.¹³⁶ Bei der Korrelation mit diesem Marker zeigt lediglich $\Delta 4$ ein signifikantes Ergebnis in Form einer positiven Korrelation. GRB7 (Growth factor receptor bound protein 7) gehört zur Gruppe der SH-2 Domänen Bindungsproteine und wird zusammen mit Her2 ausgeprägt, bzw. eine Überexpression von Her2 führt auch zu einer GRB7 Überexpression.¹³⁷ Dementsprechend zeigt $\Delta 4$ auch eine positive Korrelation für GRB7, darüber hinaus ist auch beta 2 positiv mit diesem Gen assoziiert. Da die Patienten unserer Studie Her2 negativ sind, ist die positive Korrelation als Tumorsuppressorfunktion zu verstehen.

BAG1 ist sowohl in gesundem, als auch verändertem Brustgewebe zu finden, dort allerdings ist es überexprimiert. Daraus lässt sich schließen, dass BAG1 eine Rolle in den ersten Schritten der Tumorgenese spielen könnte. Ähnlich wie bei Her2, hat dieser eigentlich negative Marker auch eine gute Funktion, denn bei Patienten mit einem erhöhten BAG1 Level, konnte ein verbessertes overall survival bei der Therapie mit Hormontherapie gezeigt werden.¹³⁸ In unserer Untersuchung ist lediglich $\Delta 4$ positiv mit diesem Marker korreliert, die Hauptvarianten zeigen keinen Zusammenhang. Wie weiter oben erwähnt korrelieren Bcl2 und BAG1 miteinander, auch die hier genannten ER β Varianten korrelieren mit Bcl2, aber nur $\Delta 4$ korreliert zusätzlich mit BAG1. Da außerdem ein Zusammenhang zwischen ER α und BAG1 in der Studie von Tang et al. nachgewiesen werden¹³⁹ konnte, sollte in größeren Studien erneut

¹³⁵ Radisky und Radisky, „Matrix Metalloproteinase-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer“.

¹³⁶ Schmidt u. a., „Biomarkers in Breast Cancer – An Update“.

¹³⁷ Bai und Luoh, „GRB-7 Facilitates HER-2/Neu-Mediated Signal Transduction and Tumor Formation“.

¹³⁸ Townsend u. a., „BAG-1“.

¹³⁹ Tang u. a., „BAG-1 expression correlates with Bcl-2, p53, differentiation, estrogen and progesterone receptors in invasive breast carcinoma“.

untersucht werden, ob die Hauptsplicevarianten, sowie der ER β Wildtyp tatsächlich nicht mit BAG1 korrelieren.

Die letzten beiden Marker sind GSTM1 und CD68. CD68 ist ein auf Monozyten und Makrophagen pausgeprägtes Glykoprotein und zeigt Assoziationen mit einem kürzerem krankheitsfreien Überleben, sowie verminderten Gesamtüberleben.¹⁴⁰ Unsere Daten zeigen keine Korrelation zu CD68. Mit GSTM1 korrelieren der ER β Wildtyp und beta 5 positiv.

Zusammenfassend unterstreichen die Korrelationen von beta 1, sowie den Variante beta 2, beta 5 und $\Delta 4$ mit den Markergenen die Aussage verschiedener Studien, die ER β die Funktion des Tumorsuppressors im Brustgewebe zugeordnet haben (vgl. Review von Leung et al.¹⁴¹).

Auffällig ist, dass nur $\Delta 4$ mit den Suppressoren SCUBE2 und WAF positiv korreliert. Weitere Korrelationen sprechen für eine Funktion als Tumorsuppressor, beispielsweise der negative Zusammenhang mit den Onkogenen STK15, MYBL, Cathepsin, Ki-67 und MMP1, insbesondere da dieser bei einer Untersuchung mit den pathologischen Proben nachgewiesen wurde. Des Weiteren wird die Tumorsuppressortheorie von ER $\beta\Delta 4$ unterstützt von der positiven Korrelation mit SCUBE2, E-Cadherin, PTEN und WAF sowohl im Stadium G1 α +, als auch bei den no-Proben. Bei Untersuchung getrennt nach pathologischen und physiologischen Proben der Hauptvarianten, sowie $\Delta 4$, fällt auf, dass die Hauptvarianten dabei ihre signifikante Korrelation verlieren, im Gegensatz zu $\Delta 4$. Dies lässt auf einen stärkeren Zusammenhang zwischen $\Delta 4$ und den Markern schließen, sodass die Ergebnisse belastbarer erscheinen.

5.2. Hauptvarianten: beta 1, beta 2, beta 5

Die Hauptsplicevarianten zeigen in den durchgeführten Tests Ergebnisse im Sinne einer Tumorsuppressorfunktion, dies wird bereits im Probenprofil deutlich, wo alle drei Formen extrem signifikant mehr positive Proben im gesunden Brustgewebe haben, im Vergleich zum veränderten Gewebe. Diese Beobachtung entspricht den Ergebnissen verschiedener Auto-

¹⁴⁰ Mahmoud u. a., „Tumour-Infiltrating Macrophages and Clinical Outcome in Breast Cancer“.

¹⁴¹ Leung u. a., „Estrogen Receptor-Beta and Breast Cancer“.

ren.^{142,143,144} Die Tumorsuppressortheorie wird gestärkt durch die extrem signifikante Expressionsabnahme des Rezeptors von den no-Proben zu den Gradings 1-3 und zwar sowohl in der gemeinsamen Untersuchung, als auch getrennt nach G-Stadien. Auch beim Vergleich der Gradingstufen untereinander zeigen zumindest beta 2 und beta 5 signifikante Unterschiede im Vergleich von G1 α + mit G3 α +, durch eine Abnahme der Expressionsrate innerhalb der Karzinogenese (vgl. abnehmende Mediane). Diese Ergebnisse, d.h. signifikante Unterschiede von no zu G1-G3 zusammen und getrennt nach G-Stadien, wiederholen sich bei den untersuchten matched pairs, sodass man diesen Verlauf auch für einzelne Patienten annehmen kann. Die stark positiven Korrelationen der Hauptvarianten untereinander lassen auf gleichartige Funktionen oder identische Steuerungsmechanismen schließen, da sie zusammen exprimiert werden. Diese Vermutung wurde auch in der Arbeit von Skliris et al. geäußert, die eine Korrelation zwischen dem Wildtyp und beta2, sowie pan in ER α negativen Tumoren nachweisen konnten.¹⁴⁵

Eine Korrelation mit dem ER α Wildtyp kann nicht nachgewiesen werden, dies entspricht den Untersuchungen von Shaw et al., die ebenfalls keine Zusammenhänge in der Expression von ER α und ER β nachweisen konnten¹⁴⁶. Allerdings stehen sie gleichzeitig im Widerspruch mit der Nurses' Health Study, die einen eindeutigen Zusammenhang zwischen ER α und dem ER β Wildtyp nachweisen konnte.¹⁴⁷

Im Gegensatz zu Jensen et al.¹⁴⁸ und Rosa et al.¹⁴⁹ können in dieser Arbeit keine Korrelationen zu dem Proliferationsmarker Ki-67, oder dem Zellzyklusmarker Cyclin nachgewiesen werden. Mögliche Ursachen hierfür sind, dass die Untersuchung mit PCR durchgeführt wurde, welche die Varianten genauer erfasst, als die von Jensen angewendete Methode der Immunhistochemie.

¹⁴² Roger u. a., „Decreased Expression of Estrogen Receptor B Protein in Proliferative Preinvasive Mammary Tumors“.

¹⁴³ Skliris u. a., „Reduced Expression of Oestrogen Receptor Beta in Invasive Breast Cancer and Its Re-Expression Using DNA Methyl Transferase Inhibitors in a Cell Line Model“.

¹⁴⁴ Shaw u. a., „Oestrogen Receptors Alpha and Beta Differ in Normal Human Breast and Breast Carcinomas“, Dezember 2002.

¹⁴⁵ Skliris u. a., „Expression of oestrogen receptor- β in oestrogen receptor- α negative human breast tumours“.

¹⁴⁶ Shaw u. a., „Oestrogen Receptors Alpha and Beta Differ in Normal Human Breast and Breast Carcinomas“, Dezember 2002.

¹⁴⁷ Marotti u. a., „Estrogen Receptor- β “.

¹⁴⁸ Jensen u. a., „Estrogen Receptors and Proliferation Markers in Primary and Recurrent Breast Cancer“, 18. Dezember 2001.

¹⁴⁹ Rosa u. a., „Evaluation of estrogen receptor α and β and progesterone receptor expression and correlation with clinicopathologic factors and proliferative marker Ki-67 in breast cancers“.

Bei der Betrachtung des Probenprofils wird deutlich, dass die Hauptvarianten in allen drei pathologischen Gruppen vorhanden sind. Dies steht im Gegensatz zu den Daten von Al-Bader et al., bei denen beta 1 nur in G2 nicht jedoch in G3 vorkommt.¹⁵⁰ Unsere Daten legen nahe, dass beta 2 nicht, wie von Bozkurt et al.¹⁵¹ dargestellt, mit einem schlechteren Grading assoziiert ist. So sind in unserer Untersuchung 68% der Proben in G1 α + für beta 2 positiv und nur 45% der Proben im Stadium G3 α +. Weitet man die Gruppe der Proben mit niedrigem Grading auf die no-Proben aus, so sind sogar 81% beta 2 positiv, im Vergleich zu 52% in der Gruppe G3 α + und α -, dieses Ergebnis ist sehr signifikant ($p=0,006$). Wertet man nur eine starke Expression (rot) von beta 2 im Vergleich zu einer sehr schwachen bzw. keiner (gelb) Expression so gelten die Ergebnisse weiterhin. Sowohl, wenn man nur G1 α + mit G3 α + vergleicht, als auch wenn man beide Gruppen erweitert auf no/G1 α + und G3 α +/ G3 α -, zeigen sich signifikante Unterschiede. Eine verminderte Anzahl positiver Proben im Verlauf der Tumorgenese ist, zumindest in unserer Patientenauswahl, nachzuweisen und somit ist bei diesen Patienten beta 2 nicht mit einem schlechteren Grading assoziiert. Schlechteres Grading wird vor allem in Zusammenhang mit der zytoplasmatischen Form von ER β 2 gebracht. Da in dieser Untersuchung nicht zwischen den zwei Ausprägungsorten unterschieden wird, könnte dies die Begründung für die im Vergleich zu Bozkurt gegenteiligen Resultate sein. Außerdem steht die Aussage von Omoto et al., die besagt, dass beta 2 vermehrt in pathologischem Gewebe im Vergleich zu gesundem Gewebe auftritt, mit unseren Daten im Widerspruch: So zeigen die Medianen eine deutliche Expressionsabnahme von no (0,848) zu G3 α + (0,0103).

Der Wildtyp scheint nicht mit der Expression von ER α assoziiert zu sein, da weder signifikante Unterschiede ($p=0,1292$) in der Expressionsstärke zwischen G3 α + im Vergleich zu G3 α - nachgewiesen werden können, noch in der direkten Korrelation mit ER α ($p=0,2186$).

Bei der Variante beta 5 zeigen unsere Daten, im Gegensatz zu Girault et al., dass sich die Expressionsstärke von beta 5 in gesundem Gewebe signifikant ($p<0,0001$) von der in karzinomatösem Gewebe unterscheidet. Betrachtet man dazu die absoluten Zahlen wird deutlich, dass dies an einer Abnahme der Expression im Verlauf der Tumorgenese liegt, so sind es in den gesunden Proben 16 von 21 Proben, die eine starke Expression aufweisen (76%) mit

¹⁵⁰ AL-BADER u. a., „Real-Time PCR“.

¹⁵¹ Bozkurt und Kapucuoğlu, „Investigation of immunohistochemical ER α , ER β and ER β c α expressions in normal and neoplastic breast tissues“.

einem Expressionsmedian von 0,61 im Vergleich zu 13 von 66 Proben mit starker Expression in den Stadien G1-G3 (19,6%), mit einem Expressionsmedian von 0,13.

Allerdings unterscheiden sich die Expressionsraten einzelner Autoren und Studien regelmäßig, sodass in diesem Punkt noch weitere Untersuchungen folgen müssen. Dabei sollte einerseits sichergestellt sein, dass die Methode die unterschiedlichen Isoformen auch zuverlässig detektiert, sowie, dass keine Verunreinigungen des Gewebes vorliegen. Ob die unterschiedliche Expressionsstärke auch von den Promotern ON, OK oder eventuellen weiteren Formen abhängt, sollte untersucht werden.

5.3. $\Delta 10K/\Delta 10N$

OK und ON sind zwei Promotervarianten von ER β welche nicht translatiert werden. Zhao et al. konnten zeigen, dass Methylierung von ON die Expressionsrate von ER β mRNA in karzinomatösem Gewebe vermindert. Daher wird vermutet, dass dies eine Möglichkeit zur Ruhigstellung der ER β -Funktion sein könnte. In normalem Gewebe liegen beide Promoter unmethyliert vor, wobei OK auch in pathologischem Gewebe nicht methyliert ist. In der Untersuchung von Zhao konnte auch gezeigt werden, dass ON häufiger ausgeprägt ist als OK und beta 1 und 2 negativ mit dem Methylierungsgrad von ON korrelieren.¹⁵² Eine signifikant häufigere Ausprägung von ON im Gegensatz zu OK konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Beide Varianten treten sehr ähnlich oft auf (29,8% ON, 33% OK). Allerdings wird eine positive Korrelation von $\Delta 10K$ mit beta 2 ($r=0,5104$) und beta 5 ($r=0,3884$) gezeigt. Außerdem vermindert sich die Expressionsstärke von $\Delta 10N$ im Vergleich von no zu den unterschiedlichen Gradingstufen signifikant, aber nicht innerhalb der einzelnen Gradingstufen. Auch für die matched pairs kann eine signifikante Abnahme der Mediane von gesundem zu erkranktem Gewebe dargestellt werden.

$\Delta 10K$ zeigt eine Abnahme in der Anzahl positiver Proben im Vergleich von no zu den einzelnen Gradingstufen (vgl. Probenprofil). Vergleicht man jedoch die Mediane, so gibt es keine signifikanten Unterschiede mehr von no im Vergleich zu G1-G3, dies gilt sowohl für alle Proben, als auch für die matched pairs. Nur wenn die Gradings aufgeschlüsselt werden, haben die gesunden Proben einen höheren Median, als die Proben der Gruppe G3 α +. Auch die Gruppe

¹⁵² Zhao u. a., „Expression of Estrogen Receptor B Isoforms in Normal Breast Epithelial Cells and Breast Cancer“.

G1 α + vs. G3 α + zeigt signifikante Unterschiede. Auffälliger Weise ist nicht der Median der gesunden Gruppe der mit dem höchsten Wert, sondern die das Grading G1. Darauf folgt no, dann G3 α - und die niedrigste Expression weist G3 α + auf.

5.4. Δ 4

Diese Arbeit zeigt sieben Tests zur Untersuchung von Δ 4. Daraus ergibt sich ein vielschichtiges Bild dieser Variante.

Die Analyse des Probenprofils zeigt die Sonderstellung dieser Splicevariante durch eine sehr starke Expression im Stadium G1 α + und eine sehr schwache Expression im Stadium G3 α -, beide unterscheiden sich signifikant von den Expressionsraten der anderen Splicevarianten. Die starke Expression im G1 α + Stadium, sowie die größere Anzahl von Proben mit starker Ausprägung dort als in den physiologischen Proben deuten eher auf eine Funktion als Onkogen hin. Betrachtet man allerdings die kaum vorhandene Ausprägung in G3 α - scheint Δ 4 ein Tumorsuppressor zu sein, bzw. ein Zusammenhang mit ER α zu bestehen. Die signifikanten Unterschiede der Gradingstufen untereinander und in Bezug auf die no-Proben bestätigen auf jeden Fall, dass es sich bei der Entwicklung von Δ 4 im Verlauf der Tumorgenese um ein dynamisches Geschehen handelt. Des Weiteren liegt ein Zusammenhang mit ER α nahe, da Δ 4 in alpha positiven Karzinomen vermehrt ausgeprägt ist. Dies wird gezeigt im Vergleich von G3 α + und G3 α - ($p=0,0005$), sowie in der vermehrten Anzahl Δ 4 positiver Proben in G1 α + im Vergleich zu den gesunden Proben ($p=0,0211$), in denen die ER β -Anzahl die ER α -Anzahl regelhaft übersteigt¹⁵³. Eine Bestätigung dieser Vermutung ist die positive Korrelation von Δ 4 und ER α (vgl. 4.2.). Die positive Korrelation einer ER β Variante mit ER α ist überraschend, da die Hauptisoformen in dieser Studie nicht mit ER α korrelieren. Normalerweise verhalten sich beide Rezeptorformen zu Beginn der Erkrankung gegensätzlich: Während ER β im Verlauf des Erkrankungsprozesses abnimmt, so nimmt die Anzahl ER α positiver Proben zunächst in Stadien wie dem DCIS zu. Danach sinkt sie ab, im Vergleich zu ER β jedoch weniger^{154,155}. Aus diesen Punkten würde sich zunächst eine negative Korrelation ergeben. Die positive Korrela-

¹⁵³ Fox, Davis, und Shupnik, „ER β in Breast Cancer – Onlooker, Passive Player, or Active Protector?“.

¹⁵⁴ Roger u. a., „Decreased Expression of Estrogen Receptor Beta Protein in Proliferative Preinvasive Mammary Tumors“.

¹⁵⁵ Leygue u. a., „Altered Estrogen Receptor A and B Messenger RNA Expression during Human Breast Tumor genesis“.

tion in dieser Arbeit ist vermutlich vor allem auf die sehr starke Expression von $\Delta 4$ im Stadium G1 zurück zu führen. Auch andere Arbeiten¹⁵⁶ konnten positive Korrelationen zwischen ER α und β nachweisen, nicht jedoch spezifisch für ER $\beta\Delta 4$. Aus der Korrelation kann man den Rückschluss ziehen, dass die Expressionsrate dieser ER β -Variante durch die An- bzw. Abwesenheit von ER α beeinflusst wird. Ob die Abwesenheit von ER α nun für Verminderung von ER $\beta\Delta 4$ sorgt und es deshalb signifikant weniger Proben ER $\beta\Delta 4$ positiv sind, oder ob die Anwesenheit von ER α zu einer stabileren ER $\beta\Delta 4$ Ausprägung führt, muss weiter untersucht werden. Offensichtlich ist jedoch, dass $\Delta 4$ zusammen mit ER α häufiger auftritt. Auch die Expressionsstärke von $\Delta 4$ scheint mit ER α zusammenzuhängen, denn in unseren Werten nimmt die Stärke mit der Abwesenheit von α ab. Zu beachten ist, dass in dieser Arbeit keine Rücksicht auf verschiedene Varianten von ER α genommen wurde, d.h. ein positiver ER α Status bedeutet, dass die Probe den ER α Wildtyp exprimiert. Inwieweit ER α Splicevarianten in den ER α negativen Proben ausgeprägt sind, ist leider nicht bekannt, daher konnten auch eventuelle Wechselwirkungen nicht beachtet werden.

In der Korrelationsuntersuchung mit anderen Splicevarianten gibt es nur signifikante Beziehungen zwischen $\Delta 4$ und beta 2, $\Delta 3$ und $\Delta 3/4/5$. Mit den beiden anderen Hauptvarianten zeigt sich keine Korrelation. Wenn nur noch die pathologischen Proben untersucht werden, zeigt sich wieder eine Korrelation mit $\Delta 3$ und $\Delta 3/4/5$. Bei Auftrennung nach Gradings, weisen allen Varianten im Stadium G3 α -, außer beta 5 und $\Delta 10K$, eine positive Korrelation mit $\Delta 4$ auf. Dies ist erstaunlich, da diese Gruppe von $\Delta 4$ eine Art Sonderrolle durch seine sehr schwache Expression im Probenprofil eingenommen hat und beim Vergleich der Mediane in G3 α - sich von mehr als der Hälfte signifikant unterscheidet. Nun kann aus der gemeinsamen Bewertung des Probenprofils, der Mediane und der Korrelationsuntersuchung geschlossen werden, dass die Anzahl und Expressionsstärke positiver Proben von $\Delta 4$ in G3 α - zwar niedriger ist, dies aber der normalen Entwicklung aller ER β Proben entspricht, da es sonst keine positive Korrelation gäbe. Die anderen Stadien von $\Delta 4$ hingegen unterscheiden sich stärker, bzw. von der Norm abweichend, da bei ihnen keine Korrelation nachzuweisen war: so ist auffällig, dass die Gruppen G1 α + und G3 α + jeweils nur eine Korrelation mit einer anderen Variante zeigen. Das Stadium G1 α + ist also nicht nur durch die hohe Anzahl positiver Proben auffällig, sondern auch durch die hohe Expressionsstärke pro Probe (vgl. Diagramm 12). Für

¹⁵⁶ Marotti u. a., „Estrogen Receptor- β “.

das Stadium G3 α + scheint das Gegenteil der Fall zu sein, die Anzahl positiver ER β Δ 4 Proben ist vergleichbar mit der Positivität anderer ER β Varianten in G3 α +, allerdings sind die Mediane nicht übereinzustimmen. Möglicherweise liegt dies an einem Wechselspiel mit ER α .

Überraschender Weise zeigt die Mann-Whitney Untersuchung der unterschiedlichen Gradingstufen zunächst keine signifikanten Medianunterschiede zwischen den no-Proben und den zusammengefassten Proben G1-G3 für Δ 4. Dies ist auffällig, da die meisten Splicevarianten, bis auf Δ 10K, Δ 4/5 und Δ 1/2/30N, in diesem Test signifikante Unterschiede aufweisen. Eine gleichbleibende Expressionsstärke im Vergleich von gesundem zu krankem Gewebe lässt eher auf eine onkogene Wirkung schließen, da Onkogene im Verlauf der Karzinogenese eher zunehmen bzw. bestehen bleiben, im Vergleich zu Tumorsuppressoren, die an Stärke abnehmen. Vermutlich liegt die Ursache der nicht signifikanten Werte in der starken Ausprägung von Δ 4 in G1, sodass über eine Abnahme von no zu den weiteren G-Stadien hinweg getäuscht wird, denn bei der genaueren Untersuchung der no-Proben gegenüber den einzelnen G-Stadien zeigen sich dann doch Unterschiede: So unterscheiden sich die no-Werte von Δ 4 signifikant von den Stadien G1 α + und G3 α -, lediglich im Vergleich zu G3 α + gibt es keine signifikanten Unterschiede. Dieses Verhalten entspricht weitestgehend dem der anderen Splicevarianten, allerdings weisen alle Splicevarianten im G3+-Stadium signifikante Unterschiede auf. Die signifikanten Unterschiede zu G1 α + und G3 α - erscheinen vergleichbar mit den extremen Werten des Probenprofils. Warum G3 α + sich jedoch nicht signifikant von den no-Proben unterscheidet ist schwer zu sagen, und am ehesten auf die kleine Probenzahl zurück zu führen, denn eine Abnahme der Expression ist trotz allem nachzuweisen. Stellt man nun einen Zusammenhang aus dem Mann-Whitney Test und den Unterschieden in der Expression aus dem Probenprofil her, kann der Schluss gezogen werden, dass die Patientenzahl, die Δ 4 exprimiert, im Verlauf der Erkrankung immer kleiner wird und in der Regel sich auch die Expressionsstärke vermindert. Bei dem Vergleich der G-Stadien untereinander gibt es bei Δ 4 signifikante Ergebnisse, lediglich die Varianten beta 2, beta 5, Δ 10K und Δ 3 zeigten hier vergleichbare Resultate. Allerdings hat nur Δ 4 signifikante Unterschiede in beiden Vergleichen, d.h. sowohl im Vergleich G1 α + vs. G3 α +, als auch bei G1 α + vs. G3 α -. Dies ist eine interessante Beobachtung, da sie ein dynamisches Verhalten von Δ 4 im Verlauf der Erkrankung vermuten lässt. Vergleicht man die Mediane, fällt auf, dass Δ 4 stärker im Stadium G3 α + ausgeprägt wird, als in G3 α -, dies passt zu der oben beschriebenen Korrelation mit ER α . Ins-

gesamt ist der Verlauf der Expressionsstärke wie folgt: am stärksten ist die Gruppe G1 α + und es folgen in absteigender Reihenfolge: no, G3 α + und G3 α -.

Die Beobachtungen aus dem Mann-Whitney Test, dass sich $\Delta 4$ nicht signifikant von normalem Gewebe unterscheidet, wenn alle G-Stadien zusammen genommen werden, sind auch im matched-pairs Test nachzuweisen. Bei diesem Test wurde gesundes Gewebe mit krankem Gewebe von der gleichen Person miteinander verglichen. Wie beim oben beschriebenen Test ist auch hier $\Delta 4$, zusammen mit $\Delta 10K$ und $\Delta 1/2/30N$, die einzige Variante welche sich darin nicht unterscheidet. Im Test, bei dem die gesunden Proben mit den einzelnen G-Stadien verglichen werden, unterscheidet sich $\Delta 4$ diesmal nur im Vergleich von no zu G3 α - signifikant.

Die Ergebnisse aus dem Mann-Whitney Test und dem matched-pairs Test zusammen lassen die Rückschlüsse zu, dass sich die Expression von $\Delta 4$ im Verlauf der Tumorgenese zwar verändert, denn es gibt eine Expressionsabnahme innerhalb der verschiedenen Stadien, bezieht man die allerdings auf einzelne Patienten sind sie etwas weniger ausgeprägt. Dies kann jedoch auch in der kleineren Fallzahl liegen.

Ein interessanter Aspekt, der in dieser Arbeit aufgefallen ist, ist die vermehrte Anzahl positiver in Stadium G1 α + im Vergleich zum Normalgewebe. $\Delta 4$ vermindert sich im Verlauf der Erkrankung, wenn man die Proben miteinander vergleicht, betrachtet man aber die Proben einzelner Patienten (vgl. matched pairs) so scheint dies weniger stark zu gelten. Daher ist fraglich, wie stark $\Delta 4$ den Krankheitsprozess beeinflussen kann.

Andere Multideletionsvarianten, die auch $\Delta 4$ enthalten, zeigen keine auffälligen Ergebnisse. Dies könnte ein Hinweis sein, dass die Exons in unmittelbarer Nachbarschaft von Exon 4 mit diesem interagieren. Fällt nur Exon 4 weg, kann das Resultat beispielsweise eine Instabilität sein, fallen alle Komponenten der Kooperation weg, ist die Instabilität möglicherweise wieder aufgehoben oder das Genprodukt vollkommen inaktiv.

5.5. Allgemeine Aspekte

Wie viele Studien^{157,158,159} zeigen konnten, kann auch in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass ER β am stärksten in normalem Gewebe auftritt und im Verlauf der Karzinogenese die Anzahl ER β positiver Patienten, sowie deren Expressionsstärke abnimmt.

Die PCR Untersuchung bezieht sich auf cDNA, post-translationale Modifikationen bleiben für diese Studie verborgen. Veränderungen wie Methylierung etc., welche die Proteinfunktion weiter beeinflussen kann, werden so außer Acht gelassen. Außerdem gibt es bei dieser Untersuchung keine Unterscheidung zwischen zytoplasmatischem und nukleärem ER, welche insbesondere für beta 2, wie Studien von Shaaban¹⁶⁰ und Yan¹⁶¹ belegen konnten, einen wichtigen Unterschied für dessen Bedeutung macht.

Die recht neue Einteilung des ER β Wildtyps in eine lange und eine kurze Form^{162,163,164} lag zu Beginn der Untersuchungen noch nicht vor, sodass alle hier durchgeführten Untersuchungen sich auf die Langform beziehen. Zukünftig wird es aber interessant sein, die einzelnen Unterschiede genauer hervor zu heben.

Leygue et al.¹⁶⁵ vermuten eine mehrfacettige Rolle von ER β im Zusammenhang mit dem Mammakarzinom, diese Überlegungen können durch diese Arbeit unterstützt werden. Weiterhin untersucht werden sollte die Beobachtung, dass die Probenzahl von $\Delta 4$ mit starker Expression in G1 α + deutlich höher ist, als im Normalgewebe und in G3 α - keine einzige Probe mit starker Expression vorgekommen ist.

¹⁵⁷ Roger u. a., „Decreased Expression of Estrogen Receptor Beta Protein in Proliferative Preinvasive Mammary Tumors“.

¹⁵⁸ Shaw u. a., „Oestrogen Receptors Alpha and Beta Differ in Normal Human Breast and Breast Carcinomas“, Dezember 2002.

¹⁵⁹ Skliris u. a., „Reduced Expression of Oestrogen Receptor Beta in Invasive Breast Cancer and Its Re-Expression Using DNA Methyl Transferase Inhibitors in a Cell Line Model“.

¹⁶⁰ Shaaban u. a., „Nuclear and Cytoplasmic Expression of ER β 1, ER β 2, and ER β 5 Identifies Distinct Prognostic Outcome for Breast Cancer Patients“.

¹⁶¹ Yan u. a., „Nuclear and Cytoplasmic Expressions of ER β 1 and ER β 2 Are Predictive of Response to Therapy and Alters Prognosis in Familial Breast Cancers“.

¹⁶² Leygue und Murphy, „A Bi-Faceted Role of Estrogen Receptor Beta in Breast Cancer“, 16–17.

¹⁶³ Savinov u. a., „Matrix Metalloproteinase 26 Proteolysis of the NH2-Terminal Domain of the Estrogen Receptor Beta Correlates with the Survival of Breast Cancer Patients“.

¹⁶⁴ Tateishi u. a., „Turning Off Estrogen Receptor β “.

¹⁶⁵ Leygue und Murphy, „A Bi-Faceted Role of Estrogen Receptor Beta in Breast Cancer“.

6. Zusammenfassung

ER β ist Teil der Steroidhormonrezeptorfamilie und gilt als Tumorsuppressor. Er besteht aus 8 Exons, sowie mindestens zwei Promotern. Daraus entstehen die Hauptvarianten beta 1, 2 und 5, sowie durch alternatives Splicen verschiedene Exondeletionsvarianten. Zur Unterscheidung der einzelnen Varianten arbeiteten wir mit PCR, mit jeweils auf die Variante abgestimmten Primern. In die Studie eingeschlossen waren 85 Patienten, die nach Gradingstufen, sowie Normalgewebe aufgeteilt wurden.

Die Variante $\Delta 4$ ist überexprimiert im Stadium G1 α + und kaum exprimiert im Stadium G3 α - und zeigt dadurch signifikante Expressionsunterschiede zu den Hauptsplicevarianten. Des Weiteren ist sie als einzige der untersuchten Varianten mit ER α assoziiert. Bei den matched pairs konnten nur in einer Untergruppe statistisch signifikante Unterschiede zu den Proben der Gruppe no festgestellt werden, dies ist ein Hinweis auf eine mögliche stabile Expression von $\Delta 4$ innerhalb eines Patienten. Gleichzeitig konnte jedoch auch gezeigt werden, dass $\Delta 4$ im gesamten Patientenkollektiv im Verlauf der Karzinogenese an Expressionsstärke abnimmt.

Der ER β Wildtyp und die Isoformen 2 und 5 zeigen sich im Sinne einer Tumorsuppressorfunktion. Sowohl bei den matched pairs, als auch bei der allgemeinen Expressionsstärke zeigen sich signifikante Unterschiede in der Ausprägung der no-Proben versus den pathologischen Proben, durch eine Abnahme der Expressionsstärke. In der Korrelationsuntersuchung mit verschiedenen Markergenen zeigen sich die stärksten Korrelationen mit MYBL2 (negative Korrelation), sowie PTEN (positive Korrelation). Insgesamt sind die drei Varianten in allen Gradingstufen exprimiert und beta 2 scheint nicht mit einem schlechteren Grading assoziiert zu sein.

ER β ist ein Östrogenrezeptor mit vielen Facetten. Eine pauschale Einordnung als Tumorsuppressor sollte vorsichtig gestellt werden, da einzelne Varianten sich vielschichtig verhalten.

II) Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Homologien zwischen ER α und ER β	13
Abbildung 2: Signalweg von ER	14
Abbildung 3: ER beta Isoformen	20
Abbildung 4: cDNA Synthese	25
Abbildung 5: Schematischer Ablauf einer Polymerase-Kettenreaktion	28
Abbildung 6: Probenprofil	33

Diagrammverzeichnis

Diagramm 1: Verhältnis der Proben mit starker, mittlerer und schwacher Expression	34
Diagramm 2: Anzahl der Proben mit starker und schwacher Expression jeweils im Vergleich von gesunden und pathologischen (G1-G3) Proben	35
Diagramm 3: Anzahl der Proben mit starker und schwacher Expression je G-Stadium	36
Diagramm 4: Vergleich Probenzahl von $\Delta 4$, sowie der anderen Varianten mit starker, mittlerer und schwacher Expression in Normalgewebe im Vergleich zum Stadium G1 α +	37
Diagramm 5: Expressionslevel in G3 α - von $\Delta 4$, sowie den restlichen	38
Diagramm 6: Korrelation zwischen $\Delta 4$ und ER α	42
Diagramm 7: Korrelationen mit beta 1	43
Diagramm 8: Korrelationen mit pan	44
Diagramm 9: Korrelationen mit $\Delta 10K$	44
Diagramm 10: Korrelationen mit $\Delta 4$	45
Diagramm 11: Zeigt die Mediane und die Standardabweichungen (SD) ausgehend von den $\Delta\Delta Ct$ -Werte. Gezeigt werden die signifikanten Ergebnisse des Mann-Whitney Tests zwischen den normalen und pathologischen Proben G1-G3	51
Diagramm 12: Zeigt die Mediane der einzelnen Gradingstufen und des gesunden Gewebes	55
Diagramm 13: Mediane und Standardabweichungen aller matched pairs	60

Tabellensverzeichnis

Tabelle 1: Kriterien für das Grading des invasiven Mammakarzinoms	9
Tabelle 2: Verwendet Primer	29
Tabelle 3: Signifikanzen der Vergleiche von gesunden und pathologischen Proben mit starker und schwacher Expressionsstärke	35
Tabelle 4: Exakter Fisher und Chi ² Test zum Probenprofil	39
Tabelle 5: Zeigt die signifikanten Ergebnisse des Fisher-Tests, indem die Ausprägung der jeweiligen Splicevariante und $\Delta 4$ für die unterschiedlichen Stadien	

verglichen wurde	42
Tabelle 6: Spearmankorrelation von $\Delta 4$ mit Splicevarianten, Ergebnisse in der Gruppe G3 α -	46
Tabelle 7: Korrelationskoeffizienten und p-Wert der Hauptsplicevarianten und Markergene	48
Tabelle 8: Korrelation zwischen $\Delta 4$ und den Markergenen	49
Tabelle 9: Korrelation zwischen Markergenen und Varianten in pathologischen Proben (G1-G3)	50
Tabelle 10: Korrelation zwischen Markergenen und Varianten in gesunden Proben (no)	51
Tabelle 11: Zeigt die signifikanten Ergebnisse des Mann-Whitney Testes zwischen den gesunden Proben und den G-Stadien	53
Tabelle 12: Zeigt die signifikanten Ergebnisse der Gegenüberstellung der einzelnen G-Stadien	54
Tabelle 13: Vergleich von $\Delta 4$ und der angegebenen Variante, je angegebener Gradingstufe	58
Tabelle 14: Wilcoxon matched pairs Test in gesundem und krankem (alle G-Stadien) Gewebe	59
Tabelle 15: Wilcoxon-matched-pairs Test, aufgeteilt nach G-Stadien, jeweils im Vergleich mit no	62

Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure
CG	Cytosin, Guanin
DBD	DNA binding domain
DCIS	ductal carcinoma in situ
E ₂	Östradiol
ER	Östrogenrezeptor
ERE	Estrogen responsive element
FSH	follikelstimulierendes Hormon
GnRH	Gonadotropin releasing hormone
Her2	human epidermal growth factor receptor 2/erb-B2
LBD	ligand binding domain
LH	luteinisierendes Hormon
LK	Lymphknoten
MMP	Matrixmetalloproteinase
No	normales/physiologisches Gewebe
PR	Progesteronrezeptor
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
SD	Standartabweichung

Bibliographie

- „002019.pdf“. Zugegriffen 1. März 2013. <http://www.fachinfo.de/data/fi/pdf/00/20/002019.pdf>.
- Aaltonen, K., R.-M. Amini, P. Heikkilä, K. Aittomäki, A. Tamminen, H. Nevanlinna, und C. Blomqvist. „High Cyclin B1 Expression Is Associated with Poor Survival in Breast Cancer“. *British Journal of Cancer* 100, Nr. 7 (17. März 2009): 1055–1060. doi:10.1038/sj.bjc.6604874.
- AL-BADER, MAIE, SHOROOQ AL-SAJI, CHRISTOPHER HJ FORD, ISSAM FRANCIS, und BUSHRA AL-AYADHY. „Real-Time PCR: Detection of Oestrogen Receptor-Alpha and-Beta Isoforms and Variants in Breast Cancer“. *Anticancer research* 30, Nr. 10 (2010): 4147–4156.
- Al-Bader, Maie, Christopher Ford, Bushra Al-Ayadhy, und Issam Francis. „Analysis of Estrogen Receptor Isoforms and Variants in Breast Cancer Cell Lines“. *Experimental and Therapeutic Medicine* 2, Nr. 3 (2011): 537–544. doi:10.3892/etm.2011.226.
- Alimonti, A. „PTEN breast cancer susceptibility: a matter of dose“. *ecancermedicalscience* 4 (7. Oktober 2010). doi:10.3332/ecancer.2010.192.
- Ascenzi, Paolo, Alessio Bocedi, und Maria Marino. „Structure-Function Relationship of Estrogen Receptor Alpha and Beta: Impact on Human Health“. *Molecular Aspects of Medicine* 27, Nr. 4 (August 2006): 299–402. doi:10.1016/j.mam.2006.07.001.
- Bai, Tao, und Shih-Wen Luoh. „GRB-7 Facilitates HER-2/Neu-Mediated Signal Transduction and Tumor Formation“. *Carcinogenesis* 29, Nr. 3 (März 2008): 473–479. doi:10.1093/carcin/bgm221.
- Bozkurt, Kemal Kürşat, und Nilgün Kapucuoğlu. „Investigation of immunohistochemical ER α , ER β and ER β cx expressions in normal and neoplastic breast tissues“. *Pathology - Research and Practice* 208, Nr. 3 (15. März 2012): 133–139. doi:10.1016/j.prp.2011.12.015.
- Chau, B. Nelson, und Jean Y.J. Wang. „Coordinated regulation of life and death by RB“. *Nature Reviews Cancer* 3, Nr. 2 (Februar 2003): 130–138. doi:10.1038/nrc993.
- Cheng, C.-J., Y.-C. Lin, M.-T. Tsai, C.-S. Chen, M.-C. Hsieh, C.-L. Chen, und R.-B. Yang. „SCUBE2 Suppresses Breast Tumor Cell Proliferation and Confers a Favorable Prognosis in Invasive Breast Cancer“. *Cancer Research* 69, Nr. 8 (7. April 2009): 3634–3641. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3615.
- Chi, Andrew, Xueyun Chen, Minni Chirala, und Mamoun Younes. „Differential expression of estrogen receptor beta isoforms in human breast cancer tissue“. *Anticancer research* 23, Nr. 1A (Februar 2003): 211–216.
- Chintamani, B. Rekhi, A. Bansal, D. Bhatnagar, und S. Saxena. „Expression of E-Cadherin in breast carcinomas and its association with other biological markers -- a prospective study“. *Indian Journal of Surgical Oncology* 1, Nr. 1 (Januar 2010): 40–46. doi:10.1007/s13193-010-0010-1.
- Davies, M P A, P A O'Neill, H Innes, D R Sibson, W Prime, C Holcombe, und C S Foster. „Correlation of mRNA for Oestrogen Receptor Beta Splice Variants ERbeta1, ERbeta2/ERbetacx and ERbeta5 with Outcome in Endocrine-Treated Breast Cancer“. *Journal of Molecular Endocrinology* 33, Nr. 3 (Dezember 2004): 773–782. doi:10.1677/jme.1.01574.
- Dawson, S.-J., N. Makretsov, F. M. Blows, K. E. Driver, E. Provenzano, J. Le Quesne, L. Baglietto, u. a. „BCL2 in Breast Cancer: A Favourable Prognostic Marker across Molecular Subtypes and Independent of Adjuvant Therapy Received“. *British Journal of Cancer* 103, Nr. 5 (24. August 2010): 668–675. doi:10.1038/sj.bjc.6605736.
- Duller, Christine. *Einführung in Die Nichtparametrische Statistik Mit SAS und R: Ein Anwendungsorientiertes Lehr- und Arbeitsbuch*. Springer DE, 2008.
- Elston, C W, und I O Ellis. „Pathological Prognostic Factors in Breast Cancer. I. The Value of Histological Grade in Breast Cancer: Experience from a Large Study with Long-Term Follow-Up. C. W. Elston & I. O. Ellis. *Histopathology* 1991; 19; 403–410“. *Histopathology* 41, Nr. 3a (2002): 151–151. doi:10.1046/j.1365-2559.2002.14691.x.
- Esslimani-Sahla, Majida, Andrew Kramar, Joelle Simony-Lafontaine, Margaret Warner, Jan-Åke Gustafsson, und Henri Rochefort. „Increased Estrogen Receptor Bcx Expression during Mammary

- Carcinogenesis". *Clinical Cancer Research* 11, Nr. 9 (5. Januar 2005): 3170–3174.
doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-2298.
- Fox, Emily M., Rebecca J. Davis, und Margaret A. Shupnik. „ER β in Breast Cancer – Onlooker, Passive Player, or Active Protector?" *Steroids* 73, Nr. 11 (Oktober 2008): 1039–1051.
doi:10.1016/j.steroids.2008.04.006.
- Fuqua, Suzanne A. W., Rachel Schiff, Irma Parra, John T. Moore, Syed K. Mohsin, C. Kent Osborne, Gary M. Clark, und D. Craig Allred. „Estrogen Receptor B Protein in Human Breast Cancer Correlation with Clinical Tumor Parameters". *Cancer Research* 63, Nr. 10 (15. Mai 2003): 2434–2439.
- Ganten, Detlev, Michael Bader, und Klaus Ruckpaul. *Grundlagen Der Molekularen Medizin*. Springer DE, 2003.
- Gartel, Andrei L., und Senthil K. Radhakrishnan. „Lost in Transcription: p21 Repression, Mechanisms, and Consequences". *Cancer Research* 65, Nr. 10 (15. Mai 2005): 3980–3985.
doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3995.
- Girault, Igor, Catherine Andrieu, Sengül Tozlu, Frédérique Spyratos, Ivan Bièche, und Rosette Lidereau. „Altered expression pattern of alternatively spliced estrogen receptor β transcripts in breast carcinoma". *Cancer Letters* 215, Nr. 1 (8. November 2004): 101–112.
doi:10.1016/j.canlet.2004.05.006.
- Graw, Jochen. *Genetik*. Springer DE, 2010.
- Grody, Wayne W., Robert M. Nakamura, Frederick L. Kiechle, und Charles Strom. *Molecular Diagnostics: Techniques and Applications for the Clinical Laboratory*. Academic Press, 2009.
- Gruvberger-Saal, Sofia K, Pär-Ola Bendahl, Lao H Saal, Mervi Laakso, Cecilia Hegardt, Patrik Edén, Carsten Peterson, u. a. „Estrogen receptor beta expression is associated with tamoxifen response in ER α -negative breast carcinoma". *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 13, Nr. 7 (1. April 2007): 1987–1994.
doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-1823.
- Häring, Julia, Susanne Schüler, Claus Latratch, Olaf Ortmann, und Oliver Treeck. „Role of estrogen receptor β in gynecological cancer". *Gynecologic oncology* 127, Nr. 3 (Dezember 2012): 673–676. doi:10.1016/j.ygyno.2012.09.006.
- Hartman, Johan, Karin Edvardsson, Karolina Lindberg, Chunyan Zhao, Cecilia Williams, Anders Ström, und Jan-Ake Gustafsson. „Tumor Repressive Functions of Estrogen Receptor Beta in SW480 Colon Cancer Cells". *Cancer Research* 69, Nr. 15 (1. August 2009): 6100–6106.
doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-0506.
- Herynk, M. H. „Estrogen Receptor Mutations in Human Disease". *Endocrine Reviews* 25, Nr. 6 (1. Dezember 2004): 869–898. doi:10.1210/er.2003-0010.
- Honma, Naoko, Rie Horii, Takuji Iwase, Shigehira Saji, Mamoun Younes, Kaiyo Takubo, Masaaki Matsuura, Yoshinori Ito, Futoshi Akiyama, und Goi Sakamoto. „Clinical importance of estrogen receptor-beta evaluation in breast cancer patients treated with adjuvant tamoxifen therapy". *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 26, Nr. 22 (1. August 2008): 3727–3734. doi:10.1200/JCO.2007.14.2968.
- Hori, M, T Nogami, M Itabashi, F Yoshimi, H Ono, und S Koizumi. „Expression of Bcl-2 in Human Breast Cancer: Correlation between Hormone Receptor Status, p53 Protein Accumulation and DNA Strand Breaks Associated with Apoptosis". *Pathology International* 47, Nr. 11 (November 1997): 757–762.
- Inoue, Satoshi, Sumito Ogawa, Kuniko Horie, Shinjiro Hoshino, Wakako Goto, Takayuki Hosoi, Osamu Tsutsumi, Masami Muramatsu, und Yasuyoshi Ouchi. „An Estrogen Receptor β Isoform That Lacks Exon 5 Has Dominant Negative Activity on both ER α and ER β ". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 279, Nr. 3 (29. Dezember 2000): 814–819.
doi:10.1006/bbrc.2000.4010.
- Jansohn, Monika. *Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*. Spektrum-Akademischer Vlg, 2006.

- Jansohn, Monika, Sophie Rothhämel, und Sophie Rothhamel. *Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*. Springer DE, 2011.
- Jensen, Elwood V., Guojun Cheng, Carlo Palmieri, Shigehira Saji, Sari Mäkelä, Susan Van Noorden, Torsten Wahlström, Margaret Warner, R. Charles Coombes, und Jan-Åke Gustafsson. „Estrogen Receptors and Proliferation Markers in Primary and Recurrent Breast Cancer“. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, Nr. 26 (18. Dezember 2001): 15197–15202. doi:10.1073/pnas.211556298.
- Kawamoto, H, H Koizumi, und T Uchikoshi. „Expression of the G2-M Checkpoint Regulators Cyclin B1 and cdc2 in Nonmalignant and Malignant Human Breast Lesions: Immunocytochemical and Quantitative Image Analyses“. *The American Journal of Pathology* 150, Nr. 1 (Januar 1997): 15–23.
- „kid_2012_c50.pdf;jsessionid=50B3FCFE40A3488E542208DFADD2E186.pdf“. Zugegriffen 1. März 2013.
http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2012/kid_2012_c50.pdf;jsessionid=50B3FCFE40A3488E542208DFADD2E186.2_cid284?__blob=publicationFile.
- Klinge, Carolyn M. „Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors☆“. *Steroids* 65, Nr. 5 (Mai 2000): 227–251. doi:10.1016/S0039-128X(99)00107-5.
- Knust, Elisabeth, und Wilfried Janning. *Genetik: Allgemeine Genetik - Molekulare Genetik - Entwicklungsgenetik*. Georg Thieme Verlag, 2008.
- Latrich, C, O Ortman, und O Treeck. „Östrogenrezeptor β wirkt antiproliferativ auf humane Mammaepithelzellen“. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* 69, Nr. 05 (17. Juni 2009). doi:10.1055/s-0029-1225213.
- Le Romancer, Muriel, Coralie Poulard, Pascale Cohen, Stéphanie Sentis, Jack-Michel Renoir, und Laura Corbo. „Cracking the Estrogen Receptor’s Posttranslational Code in Breast Tumors“. *Endocrine Reviews* 32, Nr. 5 (Oktober 2011): 597–622. doi:10.1210/er.2010-0016.
- Leung, Yuet-Kin, Ming-Tsung Lee, Hung-Ming Lam, Pheruza Tarapore, und Shuk-Mei Ho. „Estrogen Receptor-Beta and Breast Cancer: Translating Biology into Clinical Practice“. *Steroids* 77, Nr. 7 (Juni 2012): 727–737. doi:10.1016/j.steroids.2012.03.008.
- Leung, Yuet-Kin, Paul Mak, Sazzad Hassan, und Shuk-Mei Ho. „Estrogen Receptor (ER)-Beta Isoforms: A Key to Understanding ER-Beta Signaling“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, Nr. 35 (29. August 2006): 13162–13167. doi:10.1073/pnas.0605676103.
- Leygue, Etienne, Helmut Dotzlaw, Peter H. Watson, und Leigh C. Murphy. „Altered Estrogen Receptor A and B Messenger RNA Expression during Human Breast Tumorigenesis“. *Cancer Research* 58, Nr. 15 (8. Januar 1998): 3197–3201.
- Leygue, Etienne, und Leigh C Murphy. „A Bi-Faceted Role of Estrogen Receptor Beta in Breast Cancer“. *Endocrine-Related Cancer* (26. März 2013). doi:10.1530/ERC-12-0389.
- Lin, Chin-Yo, Anders Strom, Say Li Kong, Silke Kietz, Jane S Thomsen, Jason BS Tee, Vinsensius B Vega, u. a. „Inhibitory effects of estrogen receptor beta on specific hormone-responsive gene expression and association with disease outcome in primary breast cancer“. *Breast Cancer Research* 9, Nr. 2 (2007): R25. doi:10.1186/bcr1667.
- Lin, Yuh-Charn, Chun-Chuan Chen, Chien-Jui Cheng, und Ruey-Bing Yang. „Domain and Functional Analysis of a Novel Breast Tumor Suppressor Protein, SCUBE2“. *The Journal of Biological Chemistry* 286, Nr. 30 (29. Juli 2011): 27039–27047. doi:10.1074/jbc.M111.244418.
- Mahmoud, S. M. A., A. H. S. Lee, E. C. Paish, R. D. Macmillan, I. O. Ellis, und A. R. Green. „Tumour-Infiltrating Macrophages and Clinical Outcome in Breast Cancer“. *Journal of Clinical Pathology* 65, Nr. 2 (2. Januar 2012): 159–163. doi:10.1136/jclinpath-2011-200355.
- Marotti, Jonathan, Laura C. Collins, Rong Hu, und Rulla M. Tamimi. „Estrogen Receptor-? Expression in Invasive Breast Cancer in Relation to Molecular Phenotype: Results from the Nurses’ Health Study“. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian*

- Academy of Pathology, Inc* 23, Nr. 2 (Februar 2010): 197–204.
doi:10.1038/modpathol.2009.158.
- Mitter, D, O Ortmann, und O Treeck. „[Estrogen receptor Beta isoforms -- functions and clinical relevance in breast cancer]“. *Zentralblatt für Gynäkologie* 127, Nr. 4 (August 2005): 228–234.
doi:10.1055/s-2005-836563.
- Murphy, L. C., E. Leygue, Y. Niu, L. Snell, S.-M. Ho, und P. H. Watson. „Relationship of Coregulator and Oestrogen Receptor Isoform Expression to de Novo Tamoxifen Resistance in Human Breast Cancer“. *British Journal of Cancer* 87, Nr. 12 (print): 1411–1416. doi:10.1038/sj.bjc.6600654.
- Murphy, Leigh, Tracy Cherlet, Anthony Lewis, Yasmin Banu, und Peter Watson. „New insights into estrogen receptor function in human breast cancer“. *Annals of Medicine* 35, Nr. 8 (Januar 2003): 614–631. doi:10.1080/07853890310014579.
- Murphy, Leigh, und Etienne Leygue. „The Role of Estrogen Receptor- β in Breast Cancer“. *Seminars in Reproductive Medicine* 30, Nr. 01 (23. Januar 2012): 05–13. doi:10.1055/s-0031-1299592.
- Mutter, George L. „PTEN, a Protean Tumor Suppressor“. *The American Journal of Pathology* 158, Nr. 6 (Juni 2001): 1895–1898.
- Nilsson, Stefan, Sari Mäkelä, Eckardt Treuter, Michel Tujague, Jane Thomsen, Göran Andersson, Eva Enmark, Katarina Pettersson, Margaret Warner, und Jan-Åke Gustafsson. „Mechanisms of estrogen action“. *Physiological reviews* 81, Nr. 4 (2001): 1535–1565.
- O’Neill, P A, M P A Davies, A M Shaaban, H Innes, A Torevell, D R Sibson, und C S Foster. „Wild-Type Oestrogen Receptor Beta (ERbeta1) mRNA and Protein Expression in Tamoxifen-Treated Post-Menopausal Breast Cancers“. *British Journal of Cancer* 91, Nr. 9 (1. November 2004): 1694–1702. doi:10.1038/sj.bjc.6602183.
- Olaf Ortmann. „Benigne Brusterkrankungen“. In *Klinische Endokrinologie für Frauenärzte*, herausgegeben von Prof Dr med Freimut Leidenberger, Prof Dr med Thomas Strowitzki, und Prof Dr med Olaf Ortmann, 579–598. Springer Berlin Heidelberg, 2009.
http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-89760-6_22.
- Omoto, Y, S Kobayashi, S Inoue, S Ogawa, T Toyama, H Yamashita, M Muramatsu, J.-Å Gustafsson, und H Iwase. „Evaluation of oestrogen receptor β wild-type and variant protein expression, and relationship with clinicopathological factors in breast cancers“. *European Journal of Cancer* 38, Nr. 3 (2002): 380–386. doi:10.1016/S0959-8049(01)00383-5.
- Pfaffl, Michael Walter. „Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung“. *BIOspektrum* 1, Nr. 04 (2004): 92–95.
- Pfeffer, Ulrich, Emanuela Fecarotta, Luigi Castagnetta, und Giorgio Vidali. „Estrogen receptor variant messenger RNA lacking exon 4 in estrogen-responsive human breast cancer cell lines“. *Cancer research* 53, Nr. 4 (1993): 741–743.
- Pietenpol, J A, N Papadopoulos, S Markowitz, J K Willson, K W Kinzler, und B Vogelstein. „Paradoxical Inhibition of Solid Tumor Cell Growth by bcl2“. *Cancer Research* 54, Nr. 14 (15. Juli 1994): 3714–3717.
- Poola, Indira, Suzanne A. W. Fuqua, Robert L. De Witty, Jessy Abraham, Josephine J. Marshallack, und Aiyi Liu. „Estrogen Receptor α -Negative Breast Cancer Tissues Express Significant Levels of Estrogen-Independent Transcription Factors, ER β 1 and ER β 5: Potential Molecular Targets for Chemoprevention“. *Clinical Cancer Research* 11, Nr. 20 (15. Oktober 2005): 7579–7585.
doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-0728.
- Poola, Indra, Jessy Abraham, und Kate Baldwin. „Identification of ten exon deleted ER β mRNAs in human ovary, breast, uterus and bone tissues: alternate splicing pattern of estrogen receptor β mRNA is distinct from that of estrogen receptor α “. *FEBS Letters* 516, Nr. 1–3 (10. April 2002): 133–138. doi:10.1016/S0014-5793(02)02521-8.
- Price, R H, Jr, C A Butler, P Webb, R Uht, P Kushner, und R J Handa. „A Splice Variant of Estrogen Receptor Beta Missing Exon 3 Displays Altered Subnuclear Localization and Capacity for Transcriptional Activation“. *Endocrinology* 142, Nr. 5 (Mai 2001): 2039–2049.

- Radisky, Evette S., und Derek C. Radisky. „Matrix Metalloproteinase-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer“. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 15, Nr. 2 (5. Mai 2010): 201–212. doi:10.1007/s10911-010-9177-x.
- Rody, A, U Holtrich, C Solbach, K Kourtis, G von Minckwitz, K Engels, S Kissler, R Gätje, T Karn, und M Kaufmann. „Methylation of Estrogen Receptor Beta Promoter Correlates with Loss of ER-Beta Expression in Mammary Carcinoma and Is an Early Indication Marker in Premalignant Lesions“. *Endocrine-Related Cancer* 12, Nr. 4 (Dezember 2005): 903–916. doi:10.1677/erc.1.01088.
- Roger, P, M E Sahla, S Mäkelä, J A Gustafsson, P Baldet, und H Rochefort. „Decreased Expression of Estrogen Receptor Beta Protein in Proliferative Preinvasive Mammary Tumors“. *Cancer Research* 61, Nr. 6 (15. März 2001): 2537–2541.
- Roger, Pascal, Majida Esslimani Sahla, Sari Mäkelä, Jan Åke Gustafsson, Pierre Baldet, und Henri Rochefort. „Decreased Expression of Estrogen Receptor B Protein in Proliferative Preinvasive Mammary Tumors“. *Cancer Research* 61, Nr. 6 (3. März 2001): 2537–2541.
- Rosa, Fabíola E., José R.F. Caldeira, Joice Felipes, Fernanda B. Bertonha, Francisco C. Quevedo, Maria A.C. Domingues, Francisco A. Moraes Neto, und Silvia R. Rogatto. „Evaluation of estrogen receptor α and β and progesterone receptor expression and correlation with clinicopathologic factors and proliferative marker Ki-67 in breast cancers“. *Human Pathology* 39, Nr. 5 (Mai 2008): 720–730. doi:10.1016/j.humpath.2007.09.019.
- Rowe, Philip. *Statistik für Mediziner und Pharmazeuten*. John Wiley & Sons, 2012.
 „S3_Brustkrebs_Update_2012_OL_Langversion.pdf“. Zugegriffen 1. März 2013.
http://www.krebsgesellschaft.de/download/S3_Brustkrebs_Update_2012_OL_Langversion.pdf.
- Savinov, Alexei Y, Albert G Remacle, Vladislav S Golubkov, Maryla Krajewska, Susan Kennedy, Michael J Duffy, Dmitri V Rozanov, Stan Krajewski, und Alex Y Strongin. „Matrix Metalloproteinase 26 Proteolysis of the NH2-Terminal Domain of the Estrogen Receptor Beta Correlates with the Survival of Breast Cancer Patients“. *Cancer Research* 66, Nr. 5 (1. März 2006): 2716–2724. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3592.
- Schmidt, M., P. Fasching, M. Beckmann, und H. Kölbl. „Biomarkers in Breast Cancer – An Update“. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* 72, Nr. 09 (27. September 2012): 819–832. doi:10.1055/s-0032-1315340.
- Shaaban, Abeer M., Andrew R. Green, Suchita Karthik, Yalda Alizadeh, Thomas A. Hughes, Lynn Harkins, Ian O. Ellis, u. a. „Nuclear and Cytoplasmic Expression of ER β 1, ER β 2, and ER β 5 Identifies Distinct Prognostic Outcome for Breast Cancer Patients“. *Clinical Cancer Research* 14, Nr. 16 (15. August 2008): 5228–5235. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-4528.
- Shaw, Jacqueline A, Kufre Udokang, Juan-Miguel Mosquera, Hina Chauhan, J Louise Jones, und Rosemary A Walker. „Oestrogen Receptors Alpha and Beta Differ in Normal Human Breast and Breast Carcinomas“. *The Journal of Pathology* 198, Nr. 4 (Dezember 2002): 450–457. doi:10.1002/path.1230.
- Singhai, Rajeev, Vinayak Patil, Sanjog Jaiswal, Shital Patil, und Mukund Patil. „E-Cadherin as a diagnostic biomarker in breast cancer“. *North American Journal of Medical Sciences* (2011): 227–233. doi:10.4297/najms.2011.3227.
- Skliris, G P, E Leygue, L Curtis-Snell, P H Watson, und L C Murphy. „Expression of oestrogen receptor- β in oestrogen receptor- α negative human breast tumours“. *British Journal of Cancer* 95, Nr. 5 (4. September 2006): 616–626. doi:10.1038/sj.bjc.6603295.
- Skliris, George P, Kailas Munot, Sandra M Bell, Pauline J Carder, Sally Lane, Kieran Horgan, Mark R J Lansdown, u. a. „Reduced Expression of Oestrogen Receptor Beta in Invasive Breast Cancer and Its Re-Expression Using DNA Methyl Transferase Inhibitors in a Cell Line Model“. *The Journal of Pathology* 201, Nr. 2 (Oktober 2003): 213–220. doi:10.1002/path.1436.
- Smith, Laura, Louise J. Coleman, Michele Cummings, Sampoorna Satheesha, Spencer O. Shaw, Valerie Speirs, und Thomas A. Hughes. „Expression of oestrogen receptor β isoforms is regulated by

- transcriptional and post-transcriptional mechanisms". *Biochemical Journal* 429, Nr. 2 (15. Juli 2010): 283–290. doi:10.1042/BJ20100373.
- Sotoca, Ana M, Maarten D Sollewijn Gelpke, Sjef Boeren, Anders Ström, Jan-Åke Gustafsson, Albertinka J Murk, Ivonne M C M Rietjens, und Jacques Vervoort. „Quantitative Proteomics and Transcriptomics Addressing the Estrogen Receptor Subtype-Mediated Effects in T47D Breast Cancer Cells Exposed to the Phytoestrogen Genistein". *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 10, Nr. 1 (Januar 2011): M110.002170. doi:10.1074/mcp.M110.002170.
- Sotoca, Ana M., Jacques Vervoort, Ivonne MCM Rietjens, und Jan-Åke Gustafsson. „Human ER α and ER β splice variants: understanding their domain structure in relation to their biological roles in breast cancer cell proliferation". *Biochemistry* (2012): 141–160.
- Soule, H. D., J. Vazquez, A. Long, S. Albert, und M. Brennan. „A Human Cell Line From a Pleural Effusion Derived From a Breast Carcinoma". *Journal of the National Cancer Institute* 51, Nr. 5 (11. Januar 1973): 1409–1416. doi:10.1093/jnci/51.5.1409.
- Speirs, Valerie. „Estrogen Receptor β Protein in Human Breast Cancer: Correlation with Clinical Tumor Parameters." *Cancer research* 63, Nr. 24 (2003): 9055–9055.
- Speirs, Valerie, Pauline J Carder, Sally Lane, David Dodwell, Mark RJ Lansdown, und Andrew M Hanby. „Oestrogen receptor β : what it means for patients with breast cancer". *The Lancet Oncology* 5, Nr. 3 (März 2004): 174–181. doi:10.1016/S1470-2045(04)01413-5.
- „Staat & Gesellschaft - Todesursachen - Todesursachen - Statistisches Bundesamt (Destatis)". Zugegriffen 19. Februar 2013.
<https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellellen/SterbefaelleWeiblich.html;jsessionid=4890458BDF2F49831BEF60A05C8F3D35.cae2>.
- Stauber, Manfred, und Thomas Weyerstahl. *Gynäkologie und Geburtshilfe*. Stuttgart [u.a]: Thieme, 2007.
- Tanaka, T, M Kimura, K Matsunaga, D Fukada, H Mori, und Y Okano. „Centrosomal Kinase AIK1 Is Overexpressed in Invasive Ductal Carcinoma of the Breast". *Cancer Research* 59, Nr. 9 (1. Mai 1999): 2041–2044.
- Tang, Shou-Ching, Jessalyn Beck, Sean Murphy, Garry Chernenko, Desmond Robb, Peter Watson, und Mahmoud Khalifa. „BAG-1 expression correlates with Bcl-2, p53, differentiation, estrogen and progesterone receptors in invasive breast carcinoma". *Breast cancer research and treatment* 84, Nr. 3 (2004): 203–213.
- Tateishi, Yukiyo, Raku Sonoo, Yu-ichi Sekiya, Nanae Sunahara, Miwako Kawano, Mitsutoshi Wayama, Ryuichi Hirota, u. a. „Turning Off Estrogen Receptor β -Mediated Transcription Requires Estrogen-Dependent Receptor Proteolysis". *Molecular and Cellular Biology* 26, Nr. 21 (November 2006): 7966–7976. doi:10.1128/MCB.00713-06.
- Taylor, Siân E., Pierre L. Martin-Hirsch, und Francis L. Martin. „Oestrogen receptor splice variants in the pathogenesis of disease". *Cancer Letters* 288, Nr. 2 (Februar 2010): 133–148. doi:10.1016/j.canlet.2009.06.017.
- Thomas, Christoforos, und Jan-Ake Gustafsson. „Targeting PES1 for restoring the ER α /ER β ratio in breast cancer". *The Journal of Clinical Investigation* 122, Nr. 8 (1. August 2012): 2771–2773. doi:10.1172/JCI65133.
- Thomas, Christoforos, und Jan-Åke Gustafsson. „The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy". *Nature Reviews Cancer* 11, Nr. 8 (22. Juli 2011): 597–608. doi:10.1038/nrc3093.
- Thorner, AR, KA Hoadley, JS Parker, S Winkel, RC Millikan, und CM Perou. „In Vitro and In Vivo Analysis of B-Myb in Basal-Like Breast Cancer". *Oncogene* 28, Nr. 5 (5. Februar 2009): 742–751. doi:10.1038/onc.2008.430.
- Townsend, P A, E Dublin, I R Hart, R H Kao, A M Hanby, R I Cutress, R Poulosom, K Ryder, D M Barnes, und G Packham. „BAG-1 Expression in Human Breast Cancer: Interrelationship between BAG-1 RNA, Protein, HSC70 Expression and Clinico-Pathological Data". *The Journal of Pathology* 197, Nr. 1 (Mai 2002): 51–59. doi:10.1002/path.1081.

- Townsend, Paul A., Anastasis Stephanou, Graham Packham, und David S. Latchman. „BAG-1: a multi-functional pro-survival molecule“. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37, Nr. 2 (Februar 2005): 251–259. doi:10.1016/j.biocel.2004.03.016.
- Treeck, Oliver, Georg Pfeiler, Felicitas Horn, Bettina Federhofer, Helena Houlihan, Angelika Vollmer, und Olaf Ortmann. „Novel Estrogen Receptor Beta Transcript Variants Identified in Human Breast Cancer Cells Affect Cell Growth and Apoptosis of COS-1 Cells“. *Molecular and Cellular Endocrinology* 264, Nr. 1–2 (29. Januar 2007): 50–60. doi:10.1016/j.mce.2006.10.003.
- Vinayagam, Raman, D Ross Sibson, Christopher Holcombe, Vijay Aachi, und Michael Pa Davies. „Association of Oestrogen Receptor Beta 2 (ER Beta 2/ER Beta Cx) with Outcome of Adjuvant Endocrine Treatment for Primary Breast Cancer--a Retrospective Study“. *BMC Cancer* 7 (2007): 131. doi:10.1186/1471-2407-7-131.
- „What is the Oncotype DX® assay?“ Zugegriffen 2. Mai 2013. <http://www.oncotypedx.com/de-DE/Breast/HealthcareProfessional/Underlying>.
- Wu, Xianglin, Malayannan Subramaniam, Sarah B Grygo, Zhifu Sun, Vivian Negron, Wilma L Lingle, Matthew P Goetz, James N Ingle, Thomas C Spelsberg, und John R Hawse. „Estrogen Receptor-Beta Sensitizes Breast Cancer Cells to the Anti-Estrogenic Actions of Endoxifen“. *Breast Cancer Research: BCR* 13, Nr. 2 (2011): R27. doi:10.1186/bcr2844.
- Yamamoto, Satoko, Mutsuko Yamamoto-Ibusuki, Yutaka Yamamoto, Saori Fujiwara, und Hirota Iwase. „A comprehensive analysis of Aurora A; transcript levels are the most reliable in association with proliferation and prognosis in breast cancer“. *BMC Cancer* 13, Nr. 1 (2013): 217. doi:10.1186/1471-2407-13-217.
- Yan, Max, Mukta Rayoo, Elena A Takano, und Stephen B Fox. „Nuclear and Cytoplasmic Expressions of ERβ1 and ERβ2 Are Predictive of Response to Therapy and Alters Prognosis in Familial Breast Cancers“. *Breast Cancer Research and Treatment* 126, Nr. 2 (April 2011): 395–405. doi:10.1007/s10549-010-0941-9.
- Younes, Mamoun, und Naoko Honma. „Estrogen receptor β“. *Archives of pathology & laboratory medicine* 135, Nr. 1 (2011): 63–66.
- Zhao. „Estrogen receptor β: an overview and update“. *Nuclear Receptor Signaling* 4 (2007). doi:10.1621/nrs.06003.
- Zhao, Chunyan, Eric W.-F. Lam, Andrew Sunters, Eva Enmark, Manuela Tamburo De Bella, R. Charles Coombes, Jan-Åke Gustafsson, und Karin Dahlman-Wright. „Expression of Estrogen Receptor B Isoforms in Normal Breast Epithelial Cells and Breast Cancer: Regulation by Methylation“. *Oncogene* 22, Nr. 48 (2003): 7600–7606. doi:10.1038/sj.onc.1207100.
- Zhu, Xuegong, Irwin Leav, Yuet-Kin Leung, Mengchu Wu, Qin Liu, Ying Gao, John E McNeal, und Shuk-Mei Ho. „Dynamic Regulation of Estrogen Receptor-Beta Expression by DNA Methylation during Prostate Cancer Development and Metastasis“. *The American Journal of Pathology* 164, Nr. 6 (Juni 2004): 2003–2012.
- Zwart, Wilbert, Renée de Leeuw, Mariska Rondaij, Jacques Neefjes, Michael A Mancini, und Rob Michalides. „The Hinge Region of the Human Estrogen Receptor Determines Functional Synergy between AF-1 and AF-2 in the Quantitative Response to Estradiol and Tamoxifen“. *Journal of Cell Science* 123, Nr. Pt 8 (15. April 2010): 1253–1261. doi:10.1242/jcs.061135.

Danksagung

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

Bei Prof. Dr. Olaf Ortmann für die Möglichkeit im Labor seines Institutes arbeiten zu dürfen und PD Dr. Oliver Treeck für die Überlassung des Themas.

Mein besonderer Dank geht an die Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Treeck, die mich bei allen auftretenden Fragen tatkräftig unterstützt haben. Insbesondere Helena Lowack, Julia Häring, Anette Stegerer und Gerhard Piendl.

Der größte Dank gilt meinen Eltern, die mich in der ganzen Phase meines Studiums und meiner Promotion bei jeder Gelegenheit unterstützt und motiviert haben.

Eidesstattliche Erklärung

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

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