

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

UNTERSUCHUNG DER SNPS RS1937845 UND RS3763676 IM GEN AKR1C3  
HINSICHTLICH IHRER BEDEUTUNG BEIM MAMMACARCINOM

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
*der Medizin*

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
*Hendrieke Sophie Mohnsen*

2016



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

*UNTERSUCHUNG DER SNPS RS1937845 UND RS3763676 IM GEN AKR1C3  
HINSICHTLICH IHRER BEDEUTUNG BEIM MAMMACARCINOM*

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
*der Medizin*

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
*Hendrieke Sophie Mohnsen*

2016

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

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

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

Tag der mündlichen Prüfung:    *25.01.2016*

## **Inhaltsverzeichnis**

1	Einleitung .....	2
1.1	Einführung .....	2
1.2	Single nucleotide polymorphism (SNP) .....	3
1.2.1	Allgemein .....	3
1.2.2	Bekannte SNPs und Mammacarcinom .....	8
1.2.3	SNP 845 und SNP 676 .....	10
1.3	Das Gen AKR1C3 .....	10
1.3.1	Lage und Funktion .....	10
1.4	Hormonelle Steuerung im Brustgewebe .....	12
1.4.1	Die endokrine, systemische Wirkung im Brustgewebe .....	12
1.4.2	Die intrakrine, lokale Hormonwirkung in der Brust .....	30
1.4.3	Störungen im Hormonhaushalt der Brust: Vorstellung von unterschiedlichen Brustkrebs-Entstehungstheorien .....	31
1.5	Zielsetzung der Arbeit .....	36
2	Methodik .....	37
2.1	Patientengruppe .....	37
2.2	DNA-Isolierung aus EDTA-Blut .....	38
2.3	PCR .....	38
2.4	Elektrophorese im Agarosegel .....	39
2.5	Benutzte Geräte .....	41
2.6	Statistische Datenauswertung .....	42
3	Ergebnisse .....	45
3.1	Analyse 1 .....	45
3.2	Allelfrequenzanalyse zwischen Mammacarcinomproben und der gesunden Kontrollgruppe .....	45
3.2.1	Allelfrequenzanalyse für SNP 845 .....	45
3.2.2	Allelfrequenzanalyse für SNP 676 .....	47

3.3	Genotypfrequenzanalyse zwischen Mammacarcinomgruppe und gesunder Kontrollgruppe .....	49
3.3.1	Genotypfrequenzanalyse für SNP 845 .....	49
3.3.2	Genotypfrequenzanalyse für SNP 676 .....	50
3.4	Allelpositivitätsanalyse zwischen gesunder Kontrollgruppe und der Mammacarcinomgruppe.....	51
3.4.1	Allelpositivität für SNP 845 .....	51
3.4.2	Allelpositivität für SNP 676 .....	53
3.5	Übersicht über die Ergebnisse der Analyse 1 für SNP 845 und SNP 676.....	55
3.6	Analyse 2 .....	56
3.7	Subgruppenanalyse für SNP 845.....	57
3.7.1	Numerische und prozentuale Übersicht der Subgruppen der Mammacarcinomproben bei SNP 845 .....	57
3.7.2	Multiple Comparison Analyse der klinisch-pathologischen Parameter untereinander bei SNP 845.....	57
3.7.3	Multiple Comparison Analyse zwischen den klinisch-pathologischen Parametern versus Gesunde bei SNP 845 .....	66
3.7.4	Signifikante Ergebnisse der Subgruppenanalyse von SNP 845 .....	70
3.8	Subgruppenanalyse für SNP 676 .....	73
3.8.1	Numerische und prozentuale Übersicht der Subgruppen der Mammacarcinomproben für SNP 676.....	73
3.8.2	Multiple Comparison Analyse der klinisch-pathologischen Parameter untereinander von SNP 676.....	73
3.8.3	Multiple Comparison Analyse zwischen den klinisch-pathologischen Parametern versus Gesunden bei SNP 676 .....	82
4	Diskussion .....	86
5	Zusammenfassung .....	98
6	Literaturverzeichnis.....	100



## 2 Einleitung

### 2.1 Einführung

Das Mammacarcinom ist eine der häufigsten malignen Erkrankungen der Frau. 8-10% aller Frauen erkranken im Laufe ihres Lebens daran [Stauber, Weiherstahl 3.Auflage]. Allen herkömmlichen Krebsarten ist eine familiäre Häufung gemein. Wichtige Gene für die Entstehung eines Mammacarcinoms (und Ovarialcarcinoms) sind BRCA1 und BRCA2, welche eine hohe Penetranz aufweisen. In der Bevölkerung sind diese Mutationen jedoch selten und erklären nur einen Bruchteil der familiären Häufung des Mammacarcinoms. Diese Tatsache und fehlende Detektion über weitere hoch-penetrante Risikogene veranlasst zu der Hypothese, dass familiäre Häufungen des Mammacarcinoms, aber auch anderer Carcinome, polygenetisch sind und dass jede Variante für sich das Risiko beeinflussen kann. In großen genomweiten Assoziationsstudien, im Allgemeinen durch Untersuchung von single nucleotide polymorphisms (SNPs), konnten bereits SNPs in bestimmten Genen als Risikofaktoren für eine familiäre Häufung des Mammacarcinoms detektiert werden [Varghese 2010]. Da SNPs die häufigste Variante genetischer Variationen bei Menschen sind, bieten diese einen guten Ansatzpunkt zu weiteren Untersuchungen der familiären Häufung des Mammacarcinoms [Taillon-Miller 1998]. Andere, korrelativ untersuchte Risikofaktoren sind neben exogenen Faktoren u.a. frühe Menarche, späte Postmenopause, Adipositas, kurze Zyklen und Nulliparität [Stauber, Weiherstahl 3.Auflage].

Das Mammacarcinom hat seinen Ursprung in der sogenannten terminal ductal-lobulären Einheit, wobei das ductale und das lobuläre Mammacarcinom zunächst aus derselben Progenitorzelle stammen [Wellings 1973]. Das ductale Mammacarcinom findet sich als DCIS oder als invasives ductales Mammacarcinom in 85-90%, in 10-15% als lobuläres LCIS oder invasives Mammacarcinom vor [Stauber, Weiherstahl 3.Auflage]. Histopathologisch lassen sich beim Mammacarcinom vier Hauptgruppen unterscheiden, welche sich durch unterschiedliche Mutationen und die Ausprägung eines Rezeptorstatus unterscheiden. Zu den vier Hauptgruppen gehören in grober Beschreibung erstens Luminal A und zweitens Luminal B, welche beide mit einem positiven Rezeptorstatus assoziiert sind, dann drittens Stammzell-ähnlich welcher hauptsächlich rezeptor-negativ ist, und HER2E, welcher durch die Ausprägung des Onkogens Her2neu geprägt ist (vgl. Tabelle 1). Rezeptorstatus negativ und Her2neu negativ nennt man triple-negativer Brustkrebs [The Cancer Genome Atlas Network 2000; Perou 2000; Stauber, Weiherstahl 3.Auflage].



## Einleitung

	Luminal A	Luminal B	Basal-like	HER2E
%ER+/HER2-	87%	82%	10%	20%
%HER2+	7%	15%	2%	68%
%TNBC	2%	1%	80%	9%
p53 Pathway	TP53 mut (12%) Gain of MDM2 (14%)	TP53 mut (32%) Gain of MDM2 (31%)	TP53 mut (84%) Gain of MDM2 (14%)	TP53 mut (75%) Gain of MDM2 (30%)
PIK3CA/PTEN Pathway	PIK3CA mut (49%) PTEN mut/loss (13%) INPP4B loss (9%)	PIK3CA mut (32%) PTEN mut/loss (24%) INPP4B loss (16%)	PIK3CA mut (7%) PTEN mut/loss (35%) INPP4B loss (30%)	PIK3CA mut (42%) PTEN mut/loss (19%) INPP4B loss (30%)
RB1 Pathway	Cyclin D1 amp (29%) CDK4 gain (14%) Low expression of CDKN2C High expression of RB1	Cyclin D1 amp (58%) CDK4 gain (25%)	RB1 mut/loss (20%) Cyclin D1 amp (9%) CDK4 gain (14%) High expression of CDKN2C Low expression of RB1	Cyclin D1 amp (38%) CDK4 gain (24%)
mRNA Expression	High ER cluster low proliferation	Lower ER cluster High proliferation	Basal signature High proliferation	HER2 amplicon Signature High proliferation
DNA-Mutations	PIK3CA (49%) TP53 (12%) GATA3 (14%) MAP3K (14%)	TP53 (32%) PIK3CA (32%) MAP3K1 (5%)	TP53 (84%) PIK3CA (7%)	TP53 (75%) PIK3CA (42%) PIK3R1 (8%)
Copiy Number	Most diploid Many with quiet Genomes 1q, 8q, 8p11 gain 8p, 16q loss 11q13.3 amp (14%)	Most aneuploidy ;amy with focal amps 1q, 8q, 8p11 gain 8p, 16q loss 11q13.3 amp (51%) 8p11.23 amp (28%)	Most aneuploidy High genomic instability 1q, 10p gain 8p, 5q loss MYC focal gain (40%)	Most aneuploidy High genomic instability 1q, 8q gain 8p loss 17q12 focal ERBB2 amp (71%)
DNA Methylation		Hyper-methylated phenotype for subset	Hypo-methylated	
Protein Expression	High Estrogen-signaling High cMYB RPPA reactive subtypes	Less Estrogen-signaling High FOXM1 and cMYC RPPA reactive subtypes	High expression of DNA repair proteins, PTEN and INPP4B loss signature (p-AKT)	High protein and phosphoprotein expression of HER1 and HER2

Tabelle 1: Übersicht über die vier pathologischen Haupttypen des Mammacarcinoms [The Cancer Genome Atlas Network 2000 ].

## 2.2 Single nucleotide polymorphism (SNP)

### 2.2.1 Allgemein

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) bilden den Grundstein für die genetische Variabilität der Menschen untereinander und sind die häufigste Form der humanen

## Einleitung

genetischen Variationen [Taillon-Miller 1998]. SNPs sind Varianten von Basenpaaren in einem DNA-Strang, die sich durch Punktmutation ergeben haben [Lehninger, 4. Auflage]. Im Gegensatz zu spezifischen Mutationen, welche eine ganz bestimmte Krankheit hervorrufen, sind SNPs der Grund für die Variabilität der Menschen bezüglich verschiedener Volkskrankheiten wie z.B. Diabetes, Koronare Herzkrankheit oder Krebs, da diesen Krankheiten eine komplexe genetische Architektur zugrunde liegt [Li 2009].

Spezifische Erkrankungen, welche durch mendelschen Erbgang vererbt werden, haben im Allgemeinen eine hohe Penetranz, d.h. ihre Mutation führt in der Regel zu einer Ausprägung des Merkmals bzw. der Erkrankung, sie sind jedoch eher selten in der Bevölkerung anzutreffen. Untersuchungen zu solchen Erkrankungen starten meist in familienbasierten Studien. In der Regel liegen bei solchen Erkrankungen die Mutationen in protein-codierenden DNA-Abschnitten (vgl. Abbildung 1) [Monteiro 2013].

Dem entgegengesetzt sind single nucleotide polymorphisms nicht im mendelschen Erbgang vererbt. Sie haben eine niedrige Penetranz, d.h. es gibt viele Träger ohne Ausprägung eines Merkmals bzw. einer Erkrankung. Dafür sind sie relativ häufig in der Bevölkerung anzutreffen. Sie liegen meist in nicht-codierenden Abschnitten der DNA. Untersuchungen zu SNPs gehen meist aus genomweiten Assoziationsstudien hervor. In genomweiten Assoziationsstudien können eine große Anzahl individueller SNPs mit einer großen Anzahl von Menschen mit und ohne Merkmal (z.B. Krankheit) genotypisiert werden und eine Assoziation zwischen Ausprägung bzw. Nichtausprägung eines Merkmals und dem Genotyp hergestellt werden (vgl. Abbildung 1) [Monteiro 2013].

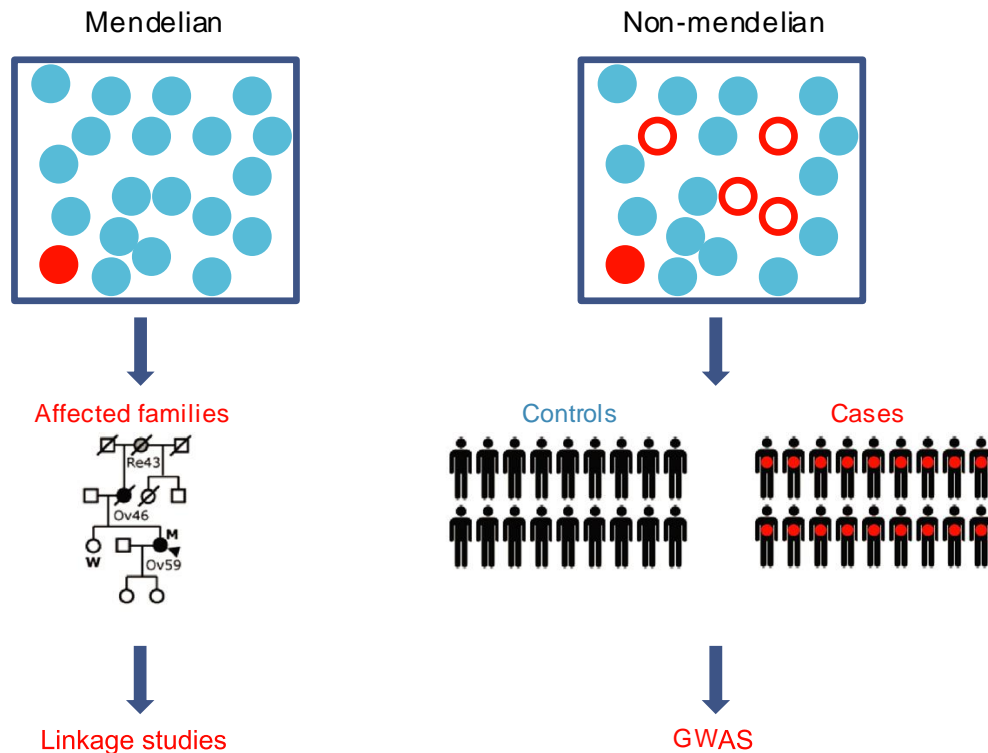


Abbildung 1: Übersicht über den Unterschied zwischen Mendelschen Erbgang und Nicht-Mendelschen Erbgang in Bezug zu Mutationen mit hoher Penetranz und SNPs. Die Abbildung zeigt den Unterschied zwischen Mendelschen Erbgang bei Mutationen mit hoher Penetranz bei spezifischen Mutationen und Nicht-Mendelschen Erbgang bei Mutationen mit niedriger Penetranz wie z.B. SNPs. Während Mutationen mit hoher Penetranz eher in familienbasierten Kopplungsstudien detektiert werden, werden Mutationen mit niedriger Penetranz eher in Genomweiten Assoziationsstudien detektiert. Der rote Punkt zeigt eine Erkrankung an, während der rote Kreis einen Träger eines wenig penetranten Risikoallels anzeigt [Monteiro 2013].

Die Art und die Lokalisation der Punktmutation ist entscheidend, weil es die Art und Weise der möglichen Funktionsänderung beeinflusst (vgl. Abbildung 2). Punktmutationen in SNPs, welche in einem codierenden Bereich auf einem Gen liegen, können je nach Art der Mutation unterschiedlich klassifiziert werden. Eine Nonsense-Mutation schafft ein neues Stopcodon, sodass das Endprotein modifiziert, im Sinne eines verkürzten, inkompletten Proteins ist. Eine Missense-Mutation codiert eine andere Aminosäure und verändert somit auch das Endprotein. Dieses ist a.e. der Fall, wenn die veränderte Base am Anfang eines Tripletts steht. Eine Silent-

## Einleitung

Mutation, eine „stille“ Mutation liegt vor, wenn zwar eine Basenänderung in einem Triplet auftritt, diese jedoch zu keiner Änderung der Aminosäure führt. Dieses ist v.a. bei der dritten Base eines Triplets der Fall und kann zu einer Änderung des Spleißvorganges führen, falls es die Funktion eines exonic splicing enhancers (ESE) stört. Dieses führt letztlich auch zu einem modifizierten Gen. Eine Frameshift-Mutation mit Störung des Leserasters im Sinne einer Insertion (Einfügen einer Base) oder Deletion (Wegfall einer Base) führt auch zu einem modifizierten Gen, weil es zu einer komplett anderen Aminosäuresequenz führt (vgl. Abbildung 2a). Es sind aber nicht nur die SNPs, welche in codierenden Regionen eines Gens liegen von großer Bedeutung, sondern auch diejenigen, welche innerhalb eines Gens oder zwischen Genen liegen und nicht zum codierenden, jedoch zum regulierenden Teil zählen. Innerhalb eines Gens können SNPs am Promotor zu einer Änderung der Genexpression führen (niedrigere oder höhere Anzahl des Gentranskripts), also zu einer Änderung der Promotoraktivität, an Introns können sie zu einem alternativen Spleißvorgang und somit wieder zur Änderung der Proteins führen. Oder in untranslated regions (UTRs) der mRNA, welche z.B. mit Proteinen interagieren können, was zu einer Veränderung der Stabilität eines Gentranskripts führen kann (vgl. Abbildung 2b). Oder die SNPs liegen intergenetisch. Dieses ist die häufigste Lage der SNPs überhaupt. Hier liegen sie auch in genregulatorischen Einheiten, wie z.B. Enhancer-Elemente oder anderen Gentranskripten wie microRNAs (miRNAs) oder long noncoding RNAs (lncRNAs), welche andere Targets beeinflussen können (vgl. Abbildung 2c). [Monteiro 2013, Mooney 2005].

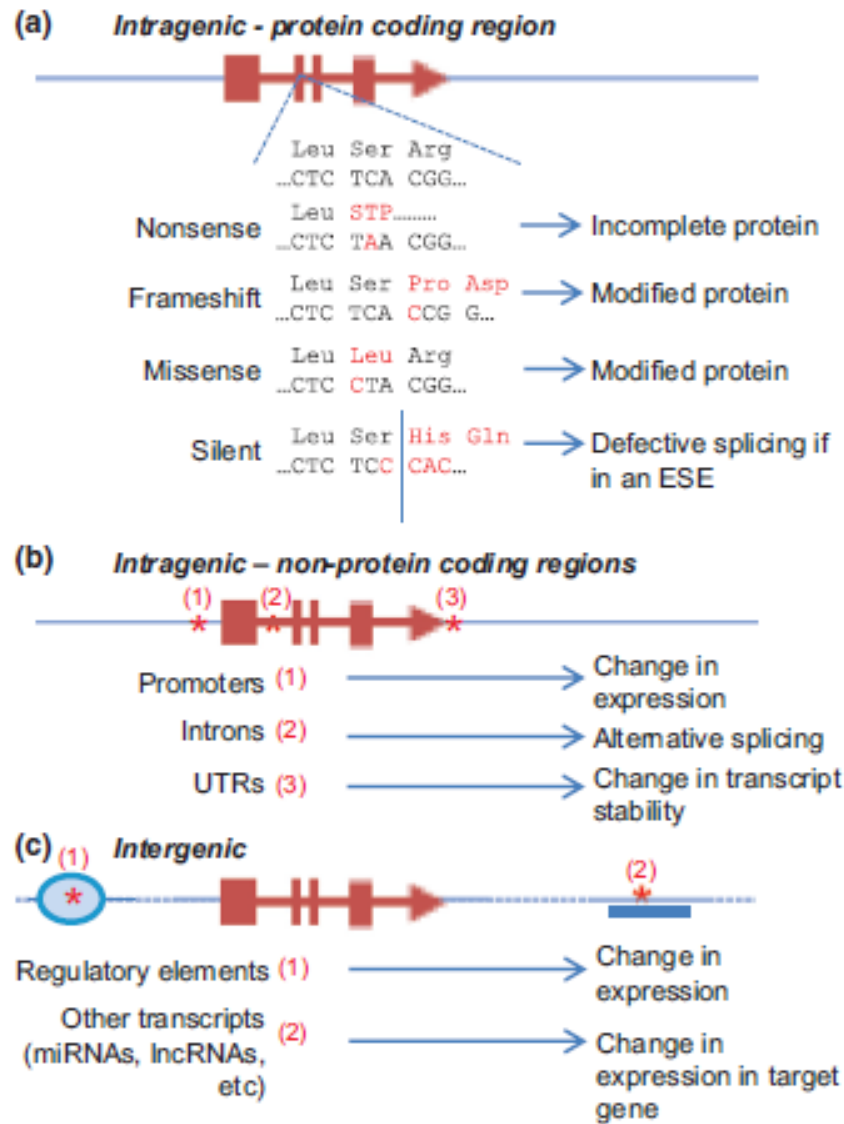


Abbildung 2: Übersicht über die möglichen Lokalisationen von SNPs. Die Abbildung stellt eine Übersicht über die möglichen Lokalisationen von SNPs sowie die Auswirkung der Lokalisation auf die Protein- und Genfunktion. Sie können a) intragen in einer codierenden Region, b) intragen in einer nicht-codierenden Region oder c) intergen liegen [Monteiro 2013].

Terminologisch können SNPs wie folgt klassifiziert werden (siehe Tabelle 2): So ist ein Coding SNP (cSNP), ein SNP, welche in einer codierenden Region liegt und ein Regulatory SNP (rSNP) ist ein SNP, welches in einer regulatorischen Region liegt. Ein Synonymous SNP (sSNP) ist ein SNP, der im Exon liegt und keine Änderung der Aminosäuresequenz hervorruft. Ein non-synonymous SNP (nsSNP) hingegen ist ein SNP, bei dem es zu einem

Austausch einer Aminosäure kommt. Und SNPs, welche in Introns liegen, werden intronic SNPs (iSNP) genannt. Tabelle 2 zeigt eine Übersicht der Terminologie [Mooney 2005]. SNPs, welche in codierenden oder regulatorischen Bereichen liegen und daher Auswirkungen auf eine quantitative oder qualitative Proteinfunktion haben, können auch als funktionelle SNPs zusammengefasst werden [Wang 2005].

Codierender SNP	cSNP	Position innerhalb einer codierenden Region
Regulatorischer SNP	rSNP	Position innerhalb einer genregulatorischen Region
Synonymer SNP	sSNP	Position innerhalb eines Exons, welches jedoch nicht zu einer Änderung einer Aminosäure führt
Nicht-synonymer SNP	nsSNP	Position, innerhalb eines Exons, welches zu einer Änderung einer Aminosäure führt
Intronischer SNP	iSNP	Position innerhalb eines Introns

Tabelle 2: Übersicht über terminologische Begriffe bei SNPs.

### 2.2.2 Bekannte SNPs und Mammacarcinom

In drei großen genomweiten Assoziationsstudien hinsichtlich des Mammacarcinoms in der europäischen Bevölkerung konnten zwölf signifikante Genloci detektiert werden (vgl. Tabelle 3). Diese zwölf Genloci sind zusammen für ca. 5% der familiären Mammacarcinome verantwortlich [Ghoussaini 2009]. Die meisten detektierten Genloci mit ihren jeweiligen Allelvarianten haben nur einen relativ geringen Effekt, also eine eher geringe Odds Ratio, welche bei ca. 1.2-1.5 liegt. Fast alle Genloci haben einen „allel-dosierenden“ Effekt mit einem erhöhten Risiko für homozygote Genotypen, welches ca. doppelt so hoch ist wie das für Heterozygote. Die meisten gefundenen Risikoallele für herkömmliche Krebsarten, wie u.a. Prostatacarcinom, Colonicarcinom, Bronchialcarcinom und eben auch Mammacarcinom sind für diese Erkrankungen spezifisch [Easton 2008]. Es gibt jedoch auch wenige Ausnahmen, welche überlappend Risikofaktoren für mehrere Krebsarten sind [Rafnar 2009]. Von großer Bedeutung ist auch der Umstand, dass die Risiko-SNPs auch verbunden sind mit dem Subtyp des Tumors dessen Risiko sie erhöhen [Varghese 2010]. Zum Beispiel ist ein wichtiger Genlocus auf Chromosom 10 im FGFR2-Gen (vgl. Tabelle 3). Diese Variation ist stark mit dem Auftreten eines östrogenrezeptor-positiven Brustkrebses assoziiert [Garcia-Closas 2008].

## Einleitung

Das gleiche gilt auch für 8q24, welches mit einem Östrogenrezeptor tragenden Brustkrebs assoziiert ist. TOX3 und 2q35 sind jedoch mit Östrogenrezeptor positiven und negativen Brustkrebszellen assoziiert( vgl. Tabelle 3) [Milne 2009]. Es besteht also demnach ein Zusammenhang zwischen dem Risikoallel und der Subgruppe des Tumors [Varghese 2010].

Genlocus	Chromosomen	SNP	Odds Ratio
1p11.2	1	rs11249433	1.16
2q35	2	rs13387042	1.20
NEK10/SLC4A7	3	rs4973768	1.11
MAP3K1	5	rs889312	1.13
MRPS30	5	rs10941679	1.19
ESR1	6	rs2046210	1.29
8q24	8	rs13281615	1.08
FGFR2	10	rs2981582	1.26
LSP1	11	rs3817198	1.07
RAD51L1	14	rs999737	1.06
TOX3	16	rs3803662	1.20
COX11	17	rs6504950	1.05

Tabelle 3: Übersicht über detektierte Risiko-SNPs beim Mammacarcinom. Die Tabelle stellt eine tabellarische Übersicht über bereits bekannte Risiko-SNPs sowie ihre Odds Ratio für Brustkrebs mit dem dazugehörigen Genlocus dar [nach Varghese 2010].

Es stellt sich zum aktuellen Zeitpunkt die Frage der klinischen Brauchbarkeit der bisherigen Detektion der Risikoallele. Während einfache Varianten mit einer sehr geringen Erhöhung des individuellen Risikos verbunden sind, sind stärkere Erhöhungen des individuellen Risikos bei Trägern von mehreren Risikovarianten assoziiert. Es erscheint zunächst, als ob sich Risikoallele multiplikativ kombinieren und daher das Risiko erhöhen [Houlston 2008]. Da bisher jedoch nur ca. 5% der familiären Häufung des Mammacarcinoms erklärt sind [Ghoussaini 2009], hat dies auch einen limitierenden Faktor auf die klinische Brauchbarkeit der Risikoallele unter der Vorstellung, dass es noch mehr, bisher nicht erkannte Risikoallele gibt. Eine andere Möglichkeit besteht natürlich auch darin, dass die Anzahl der familiären Häufung zu hoch angesetzt ist und dass beispielsweise exogene Risikofaktoren eine stärkere Rolle spielen, als man bisher annimmt [Varghese 2010].

### 2.2.3 SNP 845 und SNP 676

Die Basis-Informationen über die in dieser Arbeit untersuchten SNPs wurden mithilfe der Datenbanken nach [www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/) und [www.genecards.org](http://www.genecards.org) gefunden. Die SNPs rs1937845 und rs3763676 (kurz: SNP 845 und SNP 676) sind genregulatorische SNPs und liegen in der Promotorregion des Gens AKR1C3. Das Gen hat über 200 Transkriptionsfaktoren, von denen die zwei wichtigsten Vertreter Sp1 und p53 sind. In der Literatur findet u.a. eine Assoziation der beiden SNPs mit Blasenkrebs Erwähnung [Figueroa 2008] und SNP 676 ist darüber hinaus mit dem Auftreten eines Prostatacarcinoms assoziiert [Schulze 2012].

## 2.3 Das Gen AKR1C3

### 2.3.1 Lage und Funktion

Das Gen liegt auf dem Chromosom 10 p15-p14. Der Start liegt bei 5070326 bp im pter-Bereich und endet bei 5149878 bp im pter-Bereich. Das zytoplasmatische Protein hat eine Größe von 323 Aminosäuren und ein molekulares Gewicht von 37kDa (vgl. Abbildung 3).

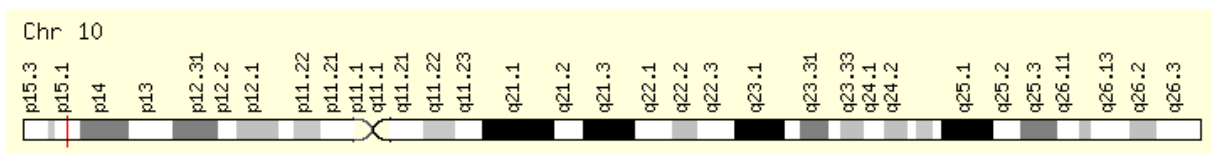


Abbildung 3: Schematisch Darstellung von Chromosom 10. Die dünne Linie zeigt die Lokalisation des Gens AKR1C3 an [genecards 2013].

Das codierte Protein gehört zur Gruppe der Aldoketoreductasen, welche die Konversion von Aldehyden und Ketonen zu ihrem entsprechenden Alkohol mithilfe des Cofaktors NADH oder NADPH katalysieren [genecards 2013]. Das codierte Protein hat mehrere enzymatische Wirkungsweisen. Zum einen greift es in die lokale Regulation der sog. Sexualhormone ein.

Es katalysiert die Reduktion von Östron zu 17beta-Östradiol, das biologisch potenteste Östrogen des Körpers. Desweiteren katalysiert es die Reduktion von Androstendion zu Testosteron, welches die Aromatase als Substrat zur Katalysation zu 17-beta-Östradiol benötigt. Schließlich katalysiert es die Reaktion von Progesteron zum inaktiveren 20alpha-



## Einleitung

Hydroxyprogesteron. Es wirkt über Stimulation der ERalpha proliferativ (vgl. Abbildung 4) [Byrns 2009].

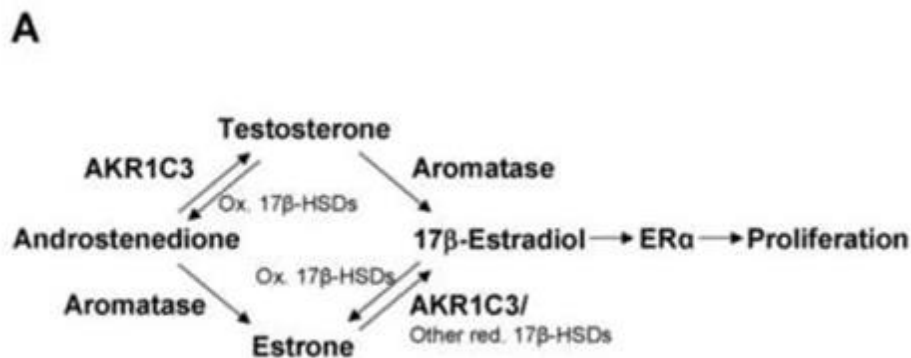


Abbildung 4: Übersicht über die katalysierten Reaktionen von AKR1C3 im Sexualhormonmetabolismus. Die Abbildung zeigt die Reaktionen von AKR1C3 in der lokalen Regulation von Östrogenen und Androgenen [Byrns 2009].

Zum anderen ist es an der Prostaglandinmodulation beteiligt. Das AKR1C3-Protein wirkt als Prostaglandin-F-Synthase, welches die Reaktion von Prostaglandin H<sub>2</sub> zu Prostaglandin F<sub>2</sub>α und von Prostaglandin D<sub>2</sub> zu 9α,11β-Prostaglandin F<sub>2</sub> katalysiert. Durch die Aktivierung des FP-Rezeptors durch PGF<sub>2</sub>α und 9α,11β-PGF wird der MAPK-Signalweg über NFκB induziert und damit die Zellproliferation und die Angiogenese. Auf zwei Wegen hemmt AKR1C3 auch das antiproliferativ wirkende PGD<sub>2</sub>, bzw. PGJ<sub>2</sub>. Zum einen dadurch, dass es die spontane Dehydratation von PGD<sub>2</sub> zu PGJ<sub>2</sub> verhindert, indem es PGD<sub>2</sub> zu 9α,11β-PGF<sub>2</sub> katalysiert und zum anderen wird vermutet, dass es die antiproliferativen Effekte von PGJ<sub>2</sub> selbst reduziert. Da PGD<sub>2</sub> und PGJ<sub>2</sub> eine ähnliche molekulare Struktur haben, könnte AKR1C3 auch an PGJ<sub>2</sub> direkt binden und somit die verfügbare Konzentration von PGJ<sub>2</sub> vermindern und verhindern, dass es sich an seine molekularen targets binden kann. PGJ<sub>2</sub> reagiert kovalent mit einem Cystein-Rest in PPARγ, welches in der Aktivierung dessen mündet. PPARγ wiederum hemmt die Proliferation. Auch reagiert PGJ<sub>2</sub> mit Cystein-Resten in DNA-Bindungsdomänen von NFκB und ERα, welches zu einer Hemmung der Transkriptionsaktivität führt und damit zu einer Unterdrückung der Zellproliferation. Fällt also durch fehlende Hydratation von PGD<sub>2</sub> zu PGJ<sub>2</sub> weniger PGJ<sub>2</sub> an und bindet sich AKR1C3 an PGJ<sub>2</sub> erhöht sich die ERα-

und die NFkappaB-Aktivität und damit die Zellproliferation (vgl. Abbildung 5) [Byrns 2010; Miller 2012].

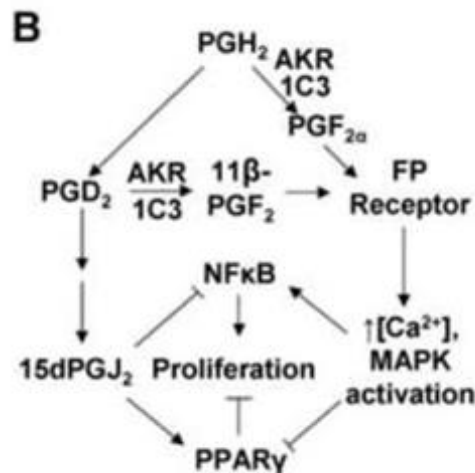


Abbildung 5: Schematische Übersicht über die Prostaglandinmodulation von AKR1C3 [Byrns 2009].

## 2.4 Hormonelle Steuerung im Brustgewebe

### 2.4.1 Die endokrine, systemische Wirkung im Brustgewebe

Die hormonelle Steuerung des Brustdrüsengewebes unterliegt zum einen der hypothalamo-hypophysären Funktionsachse mit den peripheren, endokrin produzierten Hormonen Östrogen, Progesteron, Prolaktin und zum anderen einer lokalen, intrakrinen hormonellen Regulation in den Zellen [Sasano 2006]. Die hypothalamo-hypophysäre Achse ist eine Regulationsachse zwischen dem ZNS und der Peripherie (vgl. Abbildung 6). In dieser Funktionsachse sind der Hypothalamus, die Hypophyse und die Ovarien enthalten. Durch verschiedene Signale wird aus dem Hypothalamus Gonadotropin-Releasinghormon (GnRH) ausgeschüttet, welches dann in der vorderen Hypophyse das Signal zur Ausschüttung des Follikel-stimulierenden Hormons (FSH) oder des Luteinisierenden Hormons (LH) gibt. Diese beiden Hormone wirken auf das Ovar. Im Ovar wird Östrogen und Progesteron gebildet, welche wiederum rückwirkend die oberen Abschnitte der Funktionsachse beeinflussen können. In der Hypophyse wird des Weiteren Prolaktin ausgeschüttet, welches zum einen auf das Ovar, zum anderen ebenso rückwirkend auf den Hypothalamus wirken kann. Das Zusammenspiel dieser Hormone ist die Grundbasis für u.a. die Brustdrüsenentwicklung ab der Pubertät, der Menses, den Menstruationszyklus und der Laktation [Briskin 2010; Stauber und Weiherstahl 3. Auflage]. Im folgenden Abschnitt sollen die Wirkungsweisen der drei Haupthormone (Östrogen, Progesteron und Prolaktin) in der Hormonregulation der Brust

## Einleitung

erörtert werden.

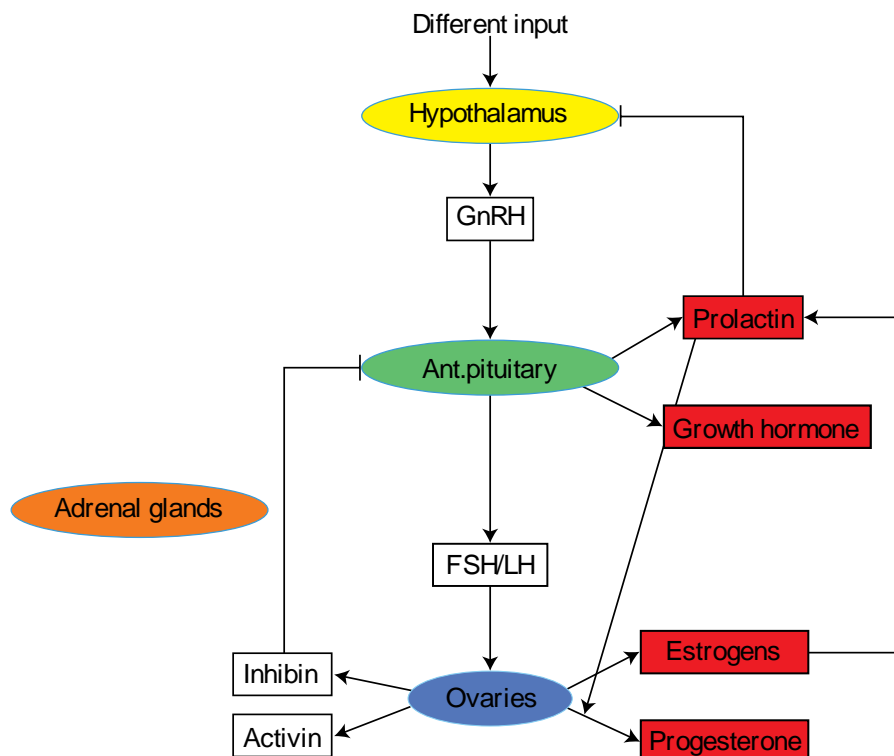


Abbildung 6: Übersicht über die hypothalamo-hypophysäre Funktionsachse mit den peripheren Hormonen Östrogen, Progesteron und Prolaktin [aus Briskin 2010].

Als erstes zu nennen in der Hormonregulation der Brust sind die Östrogene, besonders das Östradiol, welche über zwei Rezeptoren wirken: ERalpha und der später entdeckte Östrogen-Rezeptor beta (ERbeta). Zunächst wurde in den 1970er Jahren der ERalpha entdeckt (er hieß zunächst nur Östrogenrezeptor) [Jensen 1972] und dann einige Jahrzehnte später, Mitte der 1990er Jahre dann der ERbeta [Kuiper 1996]. Erstaunlicherweise zeigte sich, dass ERbeta auch in Geweben exprimiert wird, in denen ERalpha nicht exprimiert wird, was einen ersten Hinweis darauf lieferte, dass beide ERs unterschiedliche Funktionen haben [Kuiper 1997]. Zu diesen Geweben gehören u.a. die Granulosazellen des Ovars [Cheng 2002] und das Lungenparenchym [Patrone 2003]. Die Gene der beiden ERs liegen auf unterschiedlichen Chromosomen, für ERalpha auf Chromosom 6 und für ERbeta auf Chromosom 14 [Dickson 1999]. ERs gehören, wie die Progesteronrezeptoren (PRs) zu den Nukleären Rezeptoren

## Einleitung

[Evans 1988, O'Malley & Conneely 1992, Mangelsdorf 1995]. Diese zeichnen sich durch intrazelluläre Lage und die Bildung eines Dimers nach Aktivierung aus [Gronemeyer 1991; Tsai 1991]. Der Aufbau der Nukleären Rezeptoren ist ähnlich und wird in Abbildung 7 gezeigt. In der N-terminalen A/B-Region befindet sich die liganden-unabhängige Aktivierungsfunktion (AF1). Dieser kann Protein-Protein Interaktionen mit Cofaktoren oder mit Proteinen des Transkriptionsvorganges erfüllen [Giguere 1986; Hollenberg 1988; Kumar 1987]. Die danebenliegende C-Domäne nennt sich DNA-Bindungsdomäne (DBD), welche für die DNA-Bindung und teilweise auch für die Dimerisierungsfunktion ist [Luisi 1991]. Dann folgt die Hinge-Region, dessen Aufgabe vermutlich im richtigen Aufbau der dreidimensionalen Struktur zwischen E- und C-Domäne liegt [Pratt 1988]. Es folgt die E-Domäne, welche ligandenabhängig (hier Östrogen oder Progesteron) ist. Sie besteht aus 12 Alpha-Helices, welche eine Tasche für den Liganden bilden und so die Aktivierungsfunktion 2 (AF2) bilden [Webster 1988]. Die C-terminale F-Domäne wirkt bei der Transaktivationsfähigkeit des Rezeptors mit (vgl. Abbildung 7) [Briskin 2010; Morani 2008; Vegeto 1992].



*AF1=Aktivierungsfunktion 1: ligandenunabhängige Aktivierungsfunktion*

*DBD=DNA-Bindungsdomäne: DNA-Bindung*

*H=Hinge-Region: Erhaltung der richtigen dreidimensionalen Struktur zwischen C und E*

*AF2=Aktivierungsfunktion 2: ligandenabhängige Aktivierungsfunktion*

Abbildung 7: Schematische Übersicht über die funktionellen Einheiten der nukleären Rezeptoren [aus Briskin 2010]

Beim Östrogenrezeptor alpha und beta gibt es Unterschiede hinsichtlich ihres Aufbaus zueinander. Zum Beispiel stimmt die A/B-Region, die ligandenunabhängige Region, nur in knapp 18% ihrer Aminosäuresequenz zwischen ERalpha und ERbeta überein, während die

## Einleitung

DNA-Bindungsdomäne in ca. 97% ihrer Sequenz übereinstimmt. Daraus kann man schlussfolgern, dass zum einen beide ERs mit unterschiedlichen Proteinen, z.B. Cofaktoren oder Liganden, interagieren, dass sie zum anderen aber an die gleichen Zielgene binden und dadurch voneinander abweichende Transkriptionseffekte hervorrufen [Morani 2008]. Über die Art und Weise des ER-Signalweges ist schon vieles bekannt [Nilsson 2001], sodass insgesamt grob vier verschiedene Aktivierungswege der ERs zu zeigen sind (vgl. Abbildung 8). Zum einen eine direkte Aktivierung nach Ligandenaktivierung, welches nach Rezeptordimerisierung (Homo- oder Heterodimer) an einen Östrogen Response Element (ERE) bindet und die Gentranskription aktiviert. Oder als zweites eine indirekte Aktivierung, in welchem die ERs nicht direkt an die DNA binden, sondern indirekt über Bindung an andere Transkriptionsfaktoren, wie Fos/Jun oder SP-1 an non-EREs bindet und dadurch eine Genaktivierung initiiert [Kushner 2000; Saville 2000]. Drittens kann ein nicht-genomischer Effekt erfolgen, indem der ligand-aktivierte ER direkt als Protein-Protein Interaktion an einen second messenger bindet. Dieses könnte den schnellen Effekt, den Östrogen in vielen Geweben hat, erklären [Heldring 2007]. Als vierter und letzter Mechanismus kann ein ligand-unabhängiger Signalweg beschrieben werden. Dieser erfolgt durch Aktivierung des ERs durch Phosphorylierung mittels Kinasen, welche wiederum ihrerseits über einen Wachstumshormon-getriggerten Signalweg aktiviert worden sind [Kato 1995; Morani 2008].

## Einleitung

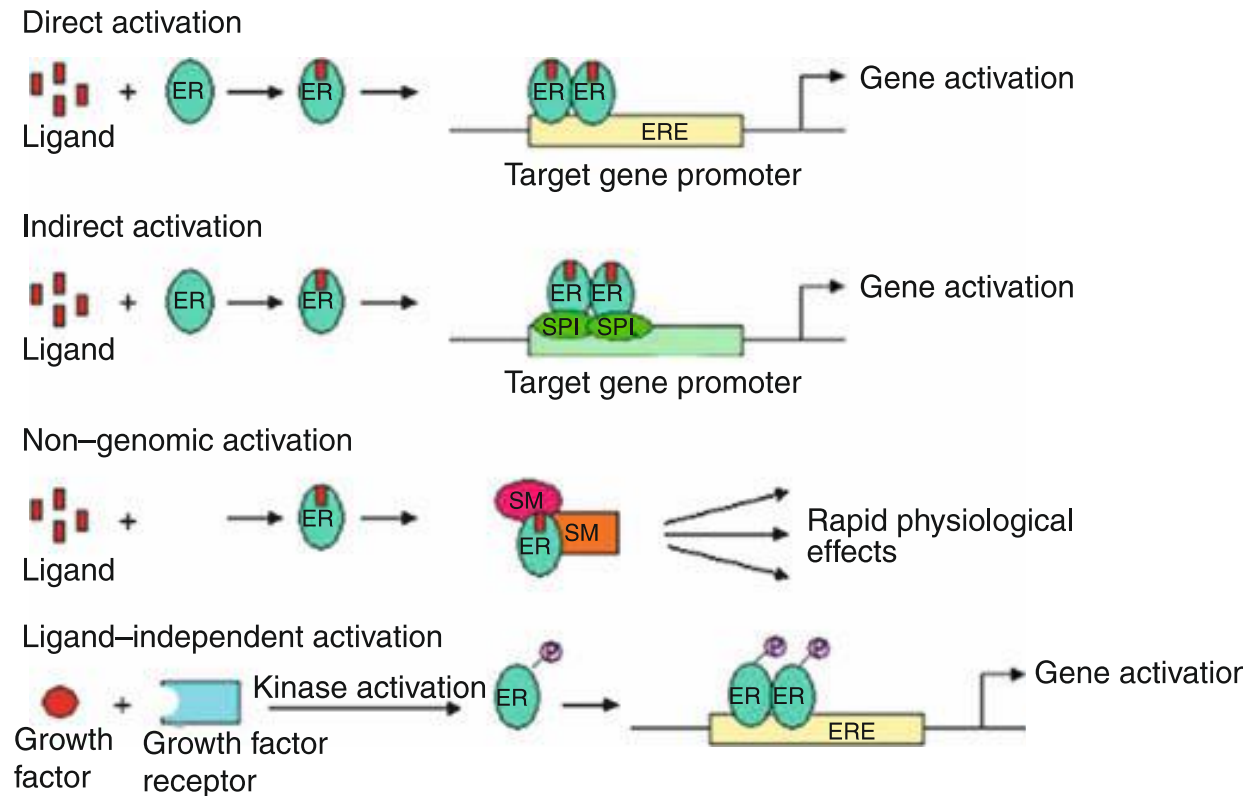


Abbildung 8: Vier Möglichkeiten der östrogenrezeptor-vermittelten Signalwege: Als erstes die direkte Aktivierung des Rezeptors durch einen Liganden mit nachfolgender Rezeptordimerisierung und Bindung an Östrogen Response Element und Zielgenaktivierung. Zweitens eine indirekte Aktivierung von Zielgenen durch Bindung an andere Transkriptionsfaktoren, hier SP1. Drittens eine nicht-genomische Wirkungsweise durch Bindung nach Ligandenaktivierung an einen second messenger mit schnellen physiologischen Effekten. Viertens die liganden-unabhängige Genaktivierung über kinase-vermittelte Phosphorylierung nach Wachstumshormonbindung an einen Wachstumshormonrezeptor [aus Morani 2008].

ERs haben in verschiedenen Organen unterschiedliche Funktionen [Dahlmann-Wright 2006]. Im Knockout-Versuch bei Mäusen wurden die verschiedenen ERs abladiert, um daran die Wirkungsweise der ERs in drei verschiedenen hormonabhängigen Organen - Brustgewebe, Ovar, Uterus- besser zu verstehen. Eine Übersicht der Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigt Tabelle 4.

Untersuchungen bei alphaERKO-Mäusen hinsichtlich des Brustdrüsengewebes, also Mäusen, denen ERalpha abladiert wurde und somit nur die ERbeta-Wirkung vorherrscht, konnte ein Fehlen der ductalen Elongation verzeichnet werden [Couse & Korach 1999]. Das

## Einleitung

Brustdrüsenwachstum ging nicht über den bei der Geburt schon angelegten rudimentären Gang hinaus. Dies ist auch bei alphabetaERKO, also Mäusen, bei denen ERalpha und ERbeta abladiert wurde, der Fall. Bei betaERKO –Mäusen, bei denen ERbeta abladiert wurde und somit nur eine ERalpha-Wirkung herrschte, konnte gezeigt werden, dass eine ganz normale Brustdrüsenentwicklung stattfindet, ein Stillen, mit anderen Worten eine Alveogenese, ist auch möglich (vgl. Tabelle 4) [Couse& Korach 1999].

In den Ovarien konnte bei alphaERKO eine gestörte Follikelreifung und keine sichtbaren Corpora lutea gesehen werden. Die Follikel waren überdies hämorrhagisch-zystisch verändert [Couse and Korach 1999]. Diese hämorrhagisch-zystischen Strukturen sind auch bei Mäusen beschrieben worden, welche transgen LHbeta überexprimierten [Risma 1995], welches darauf schließen lässt, dass diese blutgefüllten zystischen Strukturen das Ergebnis von erhöhter LH-Konzentration ist. Couse et al. gaben daraufhin bei alphaERKO Knockout –Mäusen GnRH-Antagonisten hinzu, welche die Ovarien vor der ungebremsten LH-Wirkung schützen sollte. Tatsächlich zeigten sich in diesen Ovarien keine hämorrhagisch-zystischen Strukturen [Couse 1999a]. Bei betaERKO-Mäusen konnte eine reduzierte Ovulation gesehen werden, bei alphabetaERKO-Mäusen, also Knockout von beiden Rezeptoren war keine Ovulation sichtbar (vgl. Tabelle 4) [Hewitt&Korach 2003].

Im Uterus werden ERalpha und ERbeta in den Epithelzellen sowie in den Stromazellen exprimiert. Über ERalpha erfolgt im Uterus eine starke Proliferation. Auch hier wirkt der ERbeta eher gegensätzlich. Im Knockout-Modell an Mäusen konnte beim Fehlen des ERbetas eine Hyperproliferation, Vergrößerung des Lumens und eine Erhöhung der Expression von Wachstumshormonen gesehen werden [Morani 2008]. Bei alphaERKO-Mäusen zeigte sich ein unreifer Uterus, welcher auf eine Behandlung mit Östrogen nicht ansprach, gemessen am Fehlen von Wachstum und dem Fehlen von Induzieren von Zielgenen, wie Lactoferrin und Progesteronrezeptor. Dies konnte auch bei alphabeta-ERKO Mäusen gesehen werden [Couse 1995; Couse 1999b]. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei bei betaERKO-Mäusen zwar eine erniedrigte Fertilität, jedoch eine normale Schwangerschaft. Der Uterus war vergleichbar mit denen von Wildtyp-Mäusen und reagierte auf Östrogenbehandlung (vgl. Tabelle 4) [Krege 1998].

## Einleitung

Lokalisation	Knockout	Ergebnis
Ovarien	alphaERKO	hämorrhagisch-zystische Strukturen, Anovulation
	betaERKO	reduzierte Ovulation
	alphabetaERKO	Anovulation
Uterus	alphaERKO	kein Wachstum, östrogen-unsensibel
	betaERKO	normales Wachstum, östrogen-sensibel
	alphabeta ERKO	kein Wachstum, östrogen-unsensibel
Brust	alphaERKO	kein pubertäres Wachstum
	betaERKO	normale Brustentwicklung und Wachstum
	alphabetaERKO	kein pubertäres Wachstum

Tabelle 4: Zusammenfassende Ergebnisse der in Knockout-Studien an Mäusen durchgeführten Untersuchungen, wobei entweder beide ERs (alphabetaERKO), ERalpha (alphaERKO) oder ERbeta (betaERKO) ablatiert wurden [nach Hewitt&Korach 2003].



## Einleitung

Als zweites zu nennen in der Hormonregulation der Brust sind die Progesterone. Physiologische Effekte des Progesterons werden über den zugehörigen Rezeptor, den Progesteronrezeptor weitergeleitet. Der Progesteronrezeptor (PR) gehört, ebenso wie der Östrogenrezeptor, auch zu den Nukleären Rezeptoren und hat daher einen ähnlichen Aufbau (vgl. Abbildung 8). Zwei Unterformen der Progesteronrezeptoren, PR-A und PR-B, sind seit den 1970er Jahren bekannt. Beide Rezeptoren werden vom selben Gen transkribiert, welches auf Chromosom 11 q22-23 lokalisiert ist [Daniel 2009; Law 1987; Mattei 1987; Mattei 1988; Modugno 2004; Rousseau-Merck 1987], werden jedoch an zwei unterschiedlichen Promotoren abgelesen [Kastner 1990, Kraus&Katzenellenbogen 1993, Conneely 1989]. Während bei PR-B die volle Länge des Gentranskript ausgebildet ist, fehlen bei PR-A die ersten 165 Aminosäuren [Sartorius 1994; Wen 1994]. Hinsichtlich der Funktionsweise unterschieden sich die beiden Rezeptor-Isoformen: Während PR-A den Östrogenrezeptor sowie die PR-B vermittelten Zielgene unterdrückt, ist PR-B ein starker Aktivator der progesteron-vermittelten Zielgene [Vegato 1993]. Untersuchungen an Knockout-Mäusen haben die Wirkungen der beiden Progesteronrezeptoren in unterschiedlichen Geweben, Brustdrüse, Ovar und Endometrium, untersucht (vgl. Tabelle 5). Bei Fehlen vom beiden Isoformen der Progesteronrezeptoren konnte in Knockout-Mäusen (PRKO) u.a. eine reduzierte hypothalamo-hypophysäre Funktion, reduziertes Sexualverhalten, uterine Dysfunktion, Anovulation [Lydon 1995, Mani 1996, Chappell 1999] und eine höhere Rate an kardiovaskulären Ereignissen nachgewiesen werden [Vazquez 1999].

Untersuchungen hinsichtlich des Brustdrüsengewebes ergaben, dass Progesteronrezeptoren speziell für die schwangerschaftsassozierte ductale Proliferation und lobuloalveoläre Differenzierung notwendig sind. So fehlte bei PRKO-Mäusen die schwangerschaftsassozierte ductale Proliferation und lobuloalveoläre Differenzierung, trotz vorheriger normaler postpubertaler Brustdrüsenmorphologie [Lydon 1995, Seagroves 2000]. Hingegen bei Mäusen, bei denen nur PR-A abladiert wurde, also nur eine PR-B Wirkung herrschte (PRAKO), konnte eine normale Brustdrüsenentwicklung sowie eine normale lobuloalveoläre Entwicklung verzeichnet werden [Mulac-Jericevic 2000]. Bei Mäusen, bei denen PR-B abladiert wurde, also eine PR-A Wirkung herrschte (PRBKO), konnte eine reduzierte schwangerschaftsassozierte Brustdrüsenentwicklung durch reduzierte Zellproliferation und erhöhter Apoptoserate des alveolären Epithels gezeigt werden [Mulac-Jericevic 2003]. Aus diesen Untersuchungen lässt sich der Schluss ziehen, dass PR-B für eine normale schwangerschaftsassozierte Zellproliferation und -differenzierung in Anwesenheit von

## Einleitung

Progesteron nötig ist. Im gesunden Brustdrüsengewebe wird PR-A und PR-B im gleichen Level exprimiert (vgl. Tabelle 5).

Speziell hinsichtlich des Ovars war die Ovulation bei PRKO-Mäusen komplett wegbleibend. Histologisch ließen sich dort zwar viele Follikel mit intakten Oozyten sehen, welche jedoch alle in einem unreifen Stadium verharrten [Lydon 1995]. Bei PRAKO-Mäusen war die Ovulation stark reduziert, jedoch nicht ganz wegbleibend. Histologisch zeigte sich dasselbe Bild wie bei PRKO-Mäusen mit vielen unreifen Oozyten [Mulac-Jericevic 2000]. Bei PRBKO-Mäusen war die Ovulation hingegen komplett ungestört [Mulac-Jericevic 2003]. Aus diesen Untersuchungen lässt sich der Schluss ziehen, dass für eine Ovulation die PR-A Wirkung entscheidend ist (vgl. Tabelle 5).

Die Knockout-Untersuchungen wurden auch hinsichtlich der Veränderungen im Endometrium des Uterus untersucht. Progesteron spielt in der frühen Schwangerschaft eine entscheidende Rolle in der Präparation des Uterusepithels zur Implantation und zur Differenzierung der Stromazellen zur Dezidua. Außerdem ist Progesteron ein Antagonist der östrogen-induzierten Uterusepithelproliferation [Mulac-Jericevic 2004]. In PRKO-Mäusen fehlt eine Implantation nach Embryotransfer und ist auf einen dezidualen Stimulus nicht sensibel [Lydon 1995]. Außerdem wird das Uterusepithel bei PRKO-Mäusen als Folge der ungebremsten Östrogenaktivität hyperplastisch [Tibbetts 1998]. In PRAKO-Mäusen ist eine progesteroninduzierte Differenzierung der Stromazellen zu Deziduazellen inhibiert, außerdem ist auch hier ein hyperplastisches Uterusepithel zu erkennen. Überraschenderweise führt die selektive Aktivierung von PR-B in eine abnormale progesteron-induzierte Uterusepithelproliferation [Mulac-Jericevic 2000]. Bei PRBKO-Mäusen ist eine normale Implantation und Dezidualisation zu erkennen [Mulac-Jericevic 2003]. Daraus lässt sich insgesamt der Schluss ziehen, dass PR-A zum einen für die Dezidualisation und Implantation, zum anderen für die Hemmung einer östrogen- und einer PR-B verursachten Uterusepithelproliferation benötigt wird (vgl. Tabelle 5) [Mulac-Jericevic 2000; Mulac-Jericevic 2004].

Lokalisation	Knockout	Ergebnis
Ovarien	PRKO	keine Ovulation
	PRAKO	reduzierte Ovulation
	PRBKO	normale Ovulation
Uterus	PRKO	reduzierte Implantation/Dezidualisation
	PRAKO	reduzierte Implantation/Dezidualisation
	PRBKO	normale Implantation/Dezidualisation
Brust	PRKO	reduzierte Brustdrüsenentwicklung
	PRAKO	normale Brustdrüsenentwicklung
	PRBKO	reduziertes schwangerschafts-assoziiertes Brustdrüsenwachstum und Alveogenese

Tabelle 5: Zusammenfassende Ergebnisse der in Knockout-Studien an Mäusen durchgeführten Untersuchungen, wobei entweder beide PRs (PRKO), PR-A (PRAKO) oder PR-B (PRBKO) abladiert wurden [nach Mulac-Jericevic 2004].

Als drittes der Haupthormone in der hormonellen Regulation der Brust ist das Prolaktin zu nennen, welches ebenso wie Östrogen und Progesteron der hypothalo-hypophysären Achse unterliegt. Es wird aus dem Hypophysenvorderlappen ausgeschüttet (vgl. Abbildung 6) [Stauber und Weiherstahl 3. Ausgabe]. Untersuchungen mit Prolaktin-Rezeptor (PrIR) negativen Mutanten im Brustdrüsenepithel haben gezeigt, dass eine normale ductale Entwicklung möglich ist. Auch PrIR negative Mutanten in den Stromazellen der Brust zeigten keine Störung in der Brustdrüsenentwicklung [Ormandy 2003]. Jedoch ist das Prolaktin für die Alveogenese und Differenzierung von Brustdrüsenepithelzellen in milchproduzierende Zellen während der späten Schwangerschaft notwendig. Typische histomorphologische Strukturen fehlten bei PrIR negativen Mutanten. Auch spezifische Marker wie die Milchproteine beta-Casein und WAP (whey acidic proteins) fehlten. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Prolaktin v.a. in der Alveogenese und Laktation eine entscheidende Rolle spielt [Briskin 1999; Gallego 2001].

## Einleitung

Zusätzlich zu den drei Haupthormonen spielen die sogenannten Coregulatoren im Östrogen- und Progesteronrezeptor vermittelten Signalweg eine entscheidende Rolle. Die Coregulatoren können in Coaktivatoren und Corepressoren unterteilt werden und können ein Gen „an- oder ausschalten“. Es sind schon einige dieser Coregulatoren bekannt, es besteht jedoch noch ein weites Feld hinsichtlich der Untersuchungen der Coregulatoren, die man vielleicht auch beginnen muss als „eigentliche Machthaber“ zu bezeichnen. Abbildung 9 soll hier nur schemenhaft verdeutlichen wie komplex die Signalübermittlung bei Nukleären Rezeptoren ist [Briskin 2010].

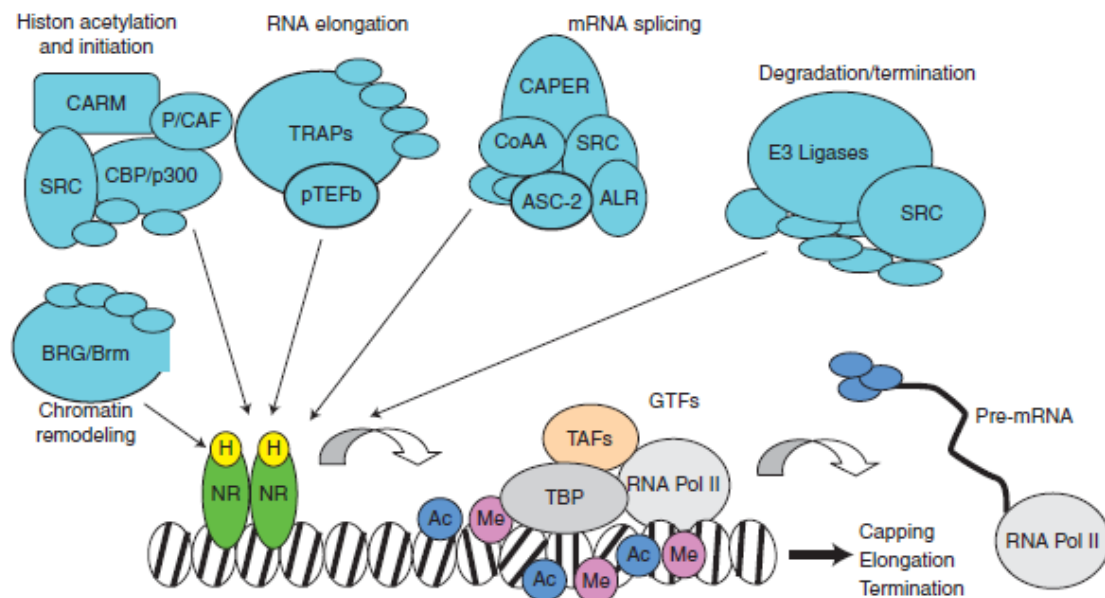


Abbildung 9 zeigt schemenhaft die Rolle der bekannten Coregulatoren bei Nukleären Rezeptoren und soll die Komplexität der Signaltransduktion hier nur andeutend darstellen [aus Briskin 2010].

Zusätzlich zu diesen drei Haupthormonen und den Coregulatoren gibt es noch eine Reihe, bisher schlecht untersuchter zusätzlicher Faktoren, die einen Einfluss auf das Brustdrüsengewebe haben und im Verdacht stehen auf das „fine-tuning“ der Brustdrüse einzuwirken. Darunter fallen Vitamin D und andere Steroidhormone [Zinser 2002, Zinser 2004]. Es konnte auch beobachtet werden, dass eine Haploinsuffizienz im Adiponektin-Gen bei Mäusen Brustkrebs fördert. Adiponektin spielt auch eine Rolle in der Ausbildung eines metabolischen Syndroms [Antuna-Puente 2008]. Der Mechanismus inwiefern Adiponektin die Mirkoumgebung im Brustdrüsengewebe verändert und zu Brustkrebs führt ist nicht klar [Lam 2009]. Abbildung 10 soll hier auch nur schemenhaft eine Zusammenfassung von Briskin et

## Einleitung

al. von verschiedenen Arbeitsgruppen zum Thema der Regulationsfaktoren der Brustdrüse geben und verdeutlichen wie komplex die Signalübertragung ist [Briskin 2010].

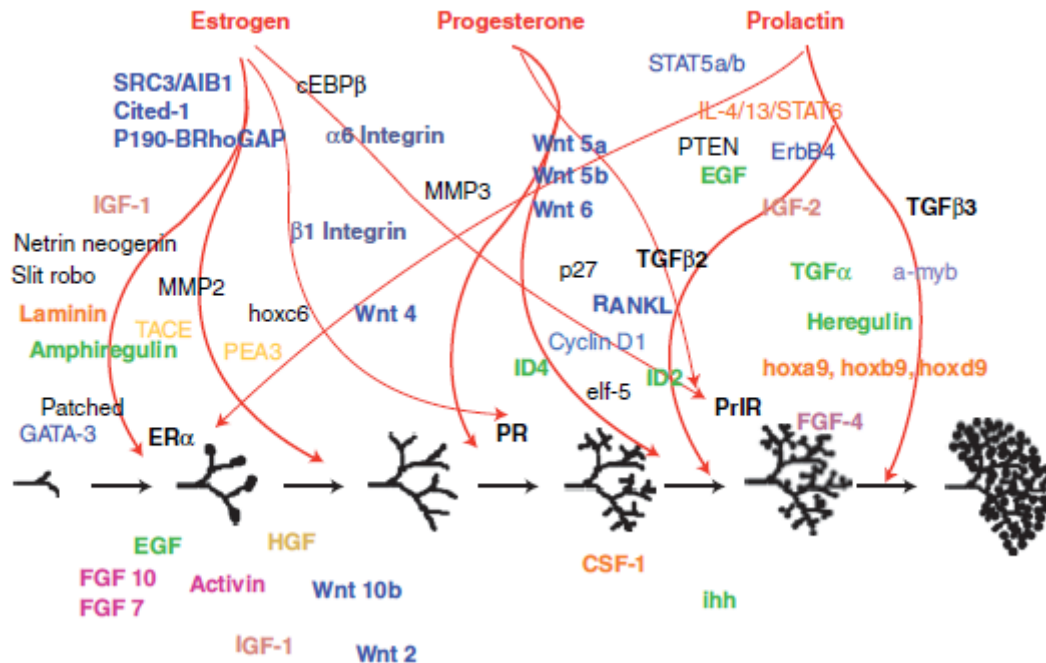


Abbildung 10 zeigt eine Zusammenfassung verschiedener Arbeitsgruppen von Faktoren zusätzlich zu den drei Haupthormonen und den Coregulatoren, die im Verdacht des „fine-tunings“ der Signalregulation im Brustdrüsengewebe stehen. Diese Abbildung soll, wie Abbildung 25, nochmals die Komplexität der Signaltransduktion verdeutlichen [aus Briskin 2010].

Nachdem im oberen Teil der Diskussion die Faktoren, welche im Brustgewebe wirken, vorgestellt wurden, soll im folgenden Abschnitt der Versuch unternommen werden, die Interaktionen verschiedener Faktoren *untereinander*, sowie die daraus entstehenden Wirkungen im Brustgewebe zu beleuchten und der Frage nachzugehen, wo und wie Proliferation im Brustgewebe stattfindet.

Proliferation entsteht an den Spitzen der Ductuli, welche sich dann terminal end buds (TEBs; zu deutsch: endterminale Knospen) nennen und sich in Form von löffelfartigen Strukturen vergrößern. Wenn mitogene Signale die Zellen erreichen, wird die Basallamina diskontinuierlich bis sie eventuell sogar komplett um die äußersten ductalen Epithelzellen, welche stark proliferativ sind, fehlt. Somit besteht eine direkte Verbindung zwischen intralobulären Stromazellen und ductalen Epithelzellen, wodurch parakrine Signalwege

## Einleitung

möglich sind (vgl. Abbildung 27).

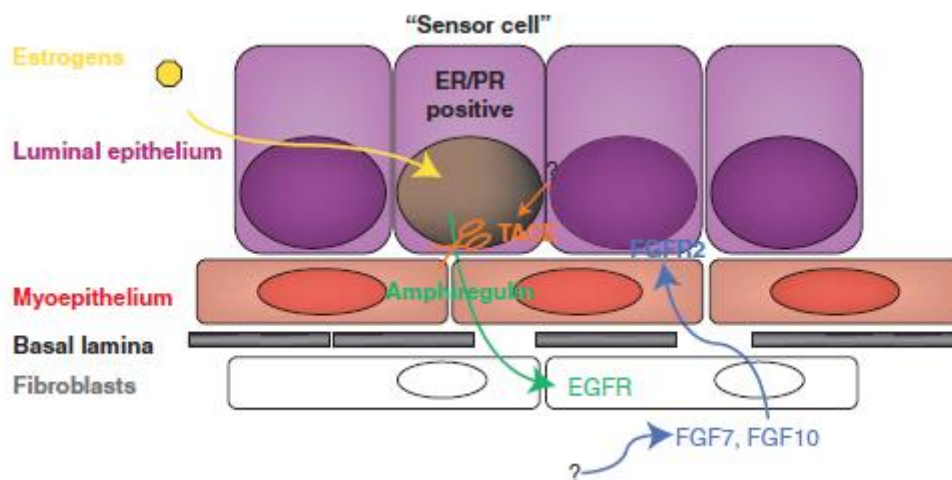


Abbildung 11 zeigt eine parakrine Signaltransduktion nach Östrogeninitiierung: Das Östrogen bindet an eine östrogenrezeptor-tragende Zelle. Es kommt zur östrogen-getriggerten Ausschüttung von Amphiregulin, welches (als Mitglied der EGF-Familie) an den EGF-Rezeptor im Stroma bindet und dadurch die Ausschüttung von FGF7 und 10 auslöst, welche zur ductalen Elongation benötigt werden. Die Proliferation findet dabei nicht in den rezeptor-tragenden Zellen statt. Diese fungieren als sogenannte Sensorzellen. Die Proliferation findet in den rezeptor negativen Zellen statt. Während der Proliferation an den Spitzen der TEBs wird die Basalmembran brüchig, sodass (parakrine) Signaltransduktion leichter möglich ist. Zur näheren Erklärung siehe unten stehenden Text [aus Briskin 2010].

ERalpha und PR werden von ca. 30-50% der luminalen Zellen, welche vornehmlich dem Ductusepithel entspricht, exprimiert. In den allermeisten Fällen werden die beiden Rezeptortypen coexprimiert. Ein sehr geringer Prozentsatz exprimiert nur einen der beiden Rezeptoren, wobei nicht vollkommen klar ist, ob dies quasi „wirklich so ist“ oder ob die Dichte dieses Rezeptors so niedrig ist, dass sie pathomorphologisch als „negativ gemessen“ wird. Die Rezeptoren werden nicht von Myoepithelzellen und Basalzellen exprimiert [Clarke 1997; Grimm 2002; Briskin 2013].

Definitionsgemäß fassen luminalen Zellen alle Zellen ein, welche mit dem Lumen des ductalen Systems in Berührung kommen. Basalzellen sind dahingehend definiert, dass diese grade nicht mit dem Lumen in Berührung kommen. Darum sind Myoepithelzellen auch Basalzellen, können jedoch in eine weitere Subgruppe klassifiziert werden, da diese zusätzlich bestimmte Marker exprimieren wie z.B. alphaSMA und Cytokeratine. Myoepithelzellen formen eine Art

## Einleitung

Maschenwerk um das Lumen. Zu den Basalzellen werden auch die Progenitorzellen gezählt, welche determinierte Stammzellen in der Brustdrüse sind [Briskin 2013].

Um zu schauen an welchen Zellen genau die Proliferation stattfindet, hat man gesundes Brustdrüsengewebe mit radioaktivem Thymidin, welches die Proliferation anzeigt, versehen. Die meiste Proliferation fand in den ERalpha und PR negativen Zellen des Ductusepithels statt [Clarke 1997]. Dieses lässt die Vermutung aufkommen, dass die rezeptorpositiven Epithelzellen als sogenannte „Sensorzellen“ und „Organisierer“ funktionieren, welche das proliferative Signal von Östrogen und Progesteron an die rezeptornegativen Zellen weitergeben. Dieses muss in Form einer parakrinen Signaltransduktion erfolgen [Briskin 2013]. Diese These wird durch Untersuchungen an Mausmutanten, denen Esr1 (codiert für ERalpha) oder Pgr (codiert für PR) fehlten, untermauert. Zunächst wurden Ductusepithelzellen von rezeptordefizitären Mäusen zusammen mit solchen von Wildtypmäusen in gereinigtes Brustfettgewebe als chimärische Epithelien injiziert. Es konnte eine normale Brustdrüsenentwicklung gesehen werden. Im Gegensatz dazu war in alleinigen rezeptordefizitären Ductusepithelien keine Brustdrüsenentwicklung zu verzeichnen [Briskin 1998; Mallepell 2006]. Vorher wurde die Tatsache, dass die durch östrogen angeregte Proliferation in den rezeptornegativen Zellen stattfindet damit erklärt, dass der ERalpha eine relative schnelle Degradation durch Proteasomen erfährt, sodass die Zellen während der Proliferation schon wieder rezeptornegativ sind [Cheng 2004]. Dieses scheint nach diesen Ergebnissen nicht mehr so wahrscheinlich zu sein [Briskin 2013].

Die Signalwege von Progesteron und Östrogen auf das Brustdrüsengewebe unterscheiden sich voneinander. Beide können über unterschiedliche Signalwege proliferativ auf die weibliche Brust wirken. Den unterschiedlichen Lebensphasen kommen unterschiedliche Aktivierungen und Ansprechbarkeiten des Gewebes bezüglich der beiden Hormone zu. Die Brustdrüse unterliegt im Laufe ihres Lebens mannigfaltigen Veränderungen. Als eines der wenigen Organe, welche erst einige Zeit nach der Geburt ihre volle weitere Reifung erfährt, macht dieser Umstand es deutlich leichter die Entwicklung des Organs zu untersuchen. Bis zur Pubertät besteht die Brustdrüse aus ca. 10-25 primären, rudimentären Brustdrüsengängen, welche in die Mamille münden. Die Brustdrüsengänge sind von intralobulären Stromagewebe umgeben. Bis zur Pubertät besteht ein isometrisches Wachstum der rudimentären Brust. Dieses Wachstum ist hormon-unabhängig, da trotz Ausbildung von Hormonrezeptoren vor der Pubertät und Exposition von Hormonen während der Schwangerschaft kein Wachstum

stattfindet. Auch bei rezeptordefizitären Mäusen konnte bis zur Pubertät keine Störung dieses isometrischen Wachstums gesehen werden [Briskin 2010; Briskin 2013]. In der peripubertalen Phase kommt es dann jedoch zu einer Veränderung hin zu einem hormonabhängigen Wachstum. Hier ist vorrangig der östrogengetriggerte Signalweg von Bedeutung, durch dessen Aktivierung eine ductale Elongation erreicht wird [Briskin 2002; Briskin 2010]. Bezüglich der oben gezeigten parakrinen Signaltransduktion ist hinsichtlich des Östrogensignalweges bei Brustdrüsenzellen ein membranständiges, zur Familie des endothelial growth factor (EGF) gehörendes Protein aufgefallen, welches sich Amphiregulin nennt und durch ADAM17/TACE gespalten und freigesetzt wird [Sunnarborg 2002]. Des Weiteren ist es das einzige EGF, dessen Transkription stark durch 17beta-Östradiol (dem potentesten Östrogen des Körpers) stimuliert wird [Ciarlioni 2007]. Amphiregulin bindet und aktiviert den EGF-Rezeptor, welcher in den Stromazellen während der ductalen Elongation exprimiert wird [Schroeder 1998]. Durch Bindung an den EGF-Rezeptor wird vermutlich die Ausschüttung von FGF7 (fibroblast growth factor) und FGF10 verursacht. Man konnte deren mRNA im Fettgewebe der Brustdrüse nach Östrogenstimulation vermehrt nachweisen. Die Bindung dieser beiden Faktoren an den FGF-Rezeptor 2 wird für die ductale Elongation benötigt (vgl. Abbildung 11) [Lu 2008]. Untersuchungen mit Mausmutanten haben gezeigt, dass der ERalpha Signalweg für die ductale Elongation und - direkt oder indirekt - für die Alveogenese und für die Verzweigung der Drüsengänge verantwortlich ist. In ERalpha negativen weiblichen Mäusen ist bis zur Pubertät die gleiche Brustdrüsenentwicklung zu verzeichnen wie jene bei Wildtypmäusen. Danach ist die Entwicklung bei ERalpha negativen Mäusen gestört. Einer 3 Wochen alten Wildtypmaus wurde auf der einen Seite der Brust endogenes Brustepithel entfernt und ERalpha negatives Brustdrüsenepithel hineingesetzt. Auf der kontralateralen Seite wird das endogene Material auch entfernt, aber Wildtyp-Brustepithel hineingesetzt. Es zeigte kein Brustdrüsenwachstum, auch während der Schwangerschaft bleibt eine Alveogenese aus. Es zeigte sich in der Brust mit dem eingesetzten Wildtypepithel eine normale Brustdrüsenentwicklung, auch während der Schwangerschaft. Unterstützend zeigte sich, dass bei hormonabladierten, also ovariectomierten Mäusen in der Pubertät, durch die Gabe von 17beta-Östradiol eine angemessene Brustdrüsenproliferation induziert werden konnte. Im Gegensatz dazu führt jedoch die Gabe von 17beta-Östradiol bei erwachsenen ovariectomierten Mäusen zu keiner signifikanten Brustdrüsenproliferation. Die Gabe von Östrogen und Progesteron bei erwachsenen ovariectomierten Mäusen führt jedoch im Gegensatz dazu zu einer angemessenen Brustdrüsenproliferation. Die alleinige Gabe von nur



## Einleitung

Progesteron führte auch zu keinem Wachstum [Briskin 2013; Mallepell 2006]. Dieses gibt einen Hinweis darauf, dass Progesteron nur zusammen mit Östrogen in der Hormonregulation der adulten Brustdrüse von Bedeutung ist. Östrogen kommt in der adulten Brust v.a. eine helfende Funktion zu, da Östrogen verantwortlich für die PR-Expression im Brustgewebe ist [Briskin 2010].

In der adulten, ausgewachsenen Brust hat Progesteron im Rahmen des Zykluses sowie in der Schwangerschaft eine tragende Bedeutung (vgl. Abbildung 12).

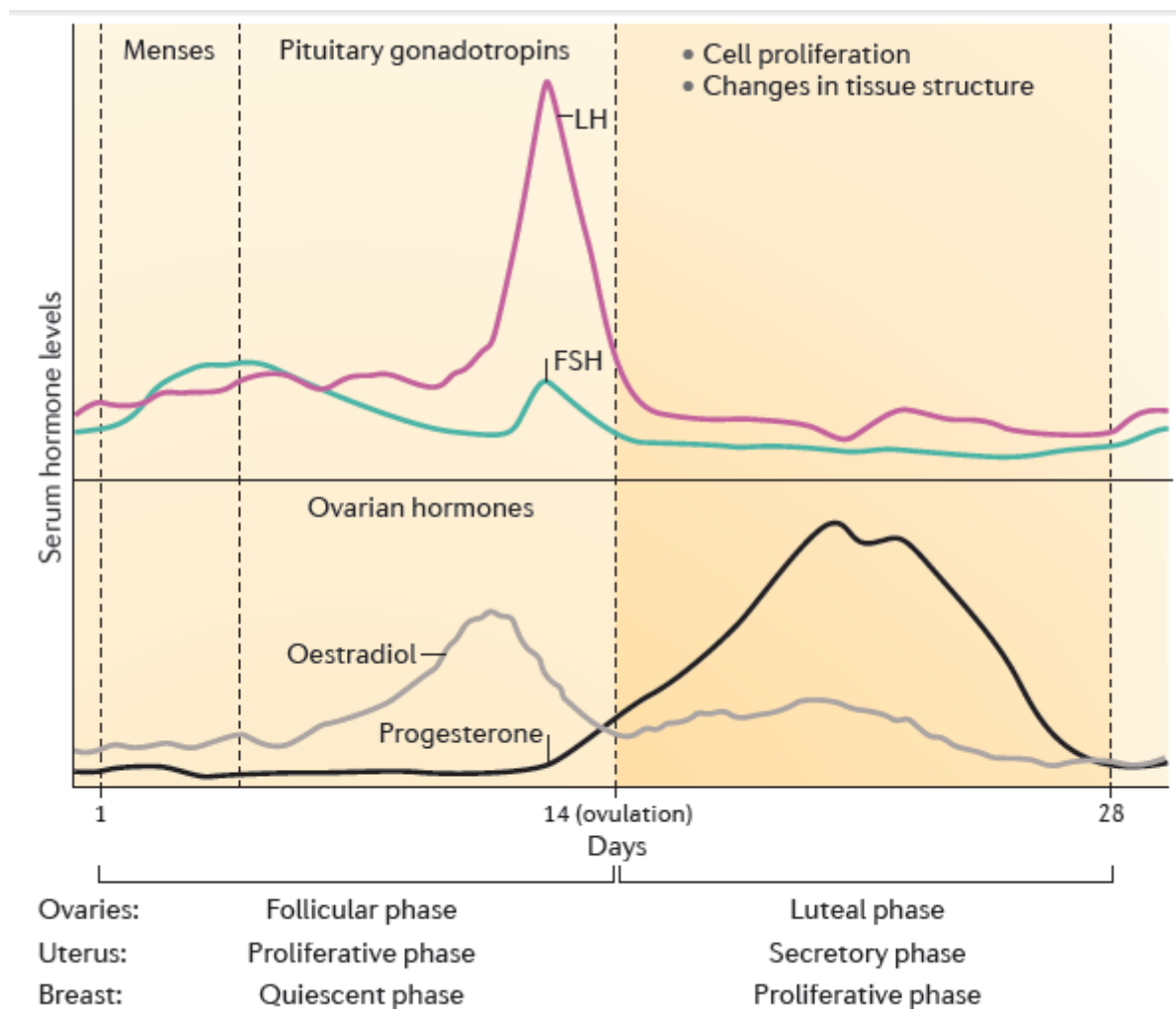


Abbildung 12 zeigt eine schematische Übersicht der Konzentrationen von Östrogen und Progesteron während des Zykluses unter Regulation der hypothalamo-hypophysären Achse sowie deren Auswirkungen auf die peripheren Organe (Endometrium, Ovar und Brustdrüse). Im zweiten Teil des Zykluses ist zu sehen, dass unter dem Einfluss des Progesteron das Brustgewebe proliferiert [aus

## Einleitung

Briskin 2013].

In jedem Zyklus kommt es in der zweiten Hälfte zu einer progesteronbedingten Brustdrüsenproliferation (vgl. Abbildung 12) [Masters 1977; Longacre 1986], welches dann an jedem Ende des Zykluses in einer erhöhten Apoptoserate mündet. Gesteigert wird dieses beim Abstillen, bei dem es zu einer massiven Apoptose kommt [Briskin 2013]. Bei dem progesterongetriggerten Signalweg kann man die CyclinD1-getriggerte Proliferation der Östrogen- und Progesteronrezeptor positiven Zellen des Brustdrüsenepithels von der RANKL-getriggerten Proliferation in den Rezeptor negativen Zellen unterscheiden. RANKL gehört zu der Tumornekrosefaktoralpha-Familie (TNFalpha) und wird durch den PR-Signalweg stark exprimiert (vgl. Abbildung 13) [Briskin 2013].

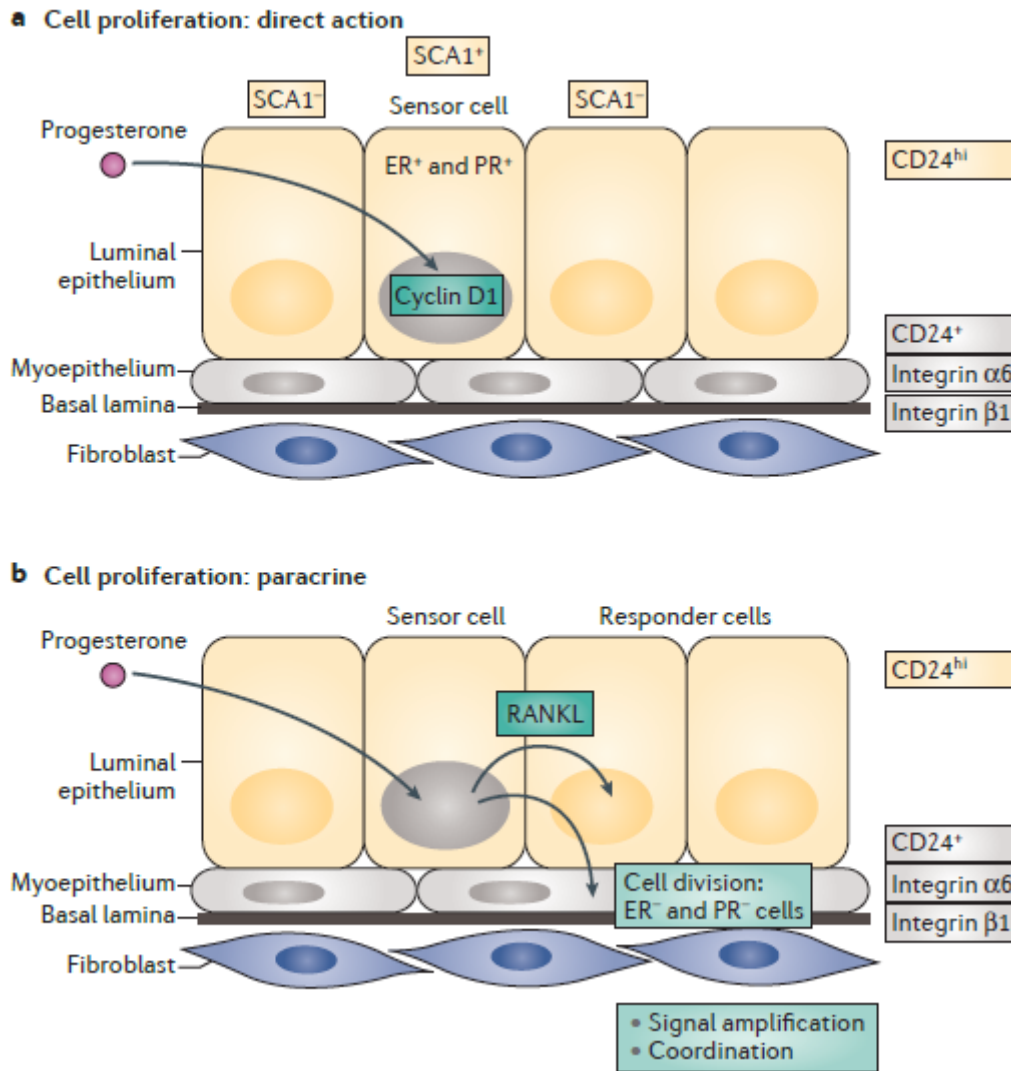


Abbildung 13 zeigt ein Modell mit intrinsischer und parakriner Zellsignaltransduktion induziert durch Progesteron. Im oberen Teil **a** bindet Progesteron an einen Progesteron-Rezeptor. Nach intrinsischer, Cyclin D1-vermittelter Signaltransduktion kommt es zur Proliferation von rezeptor-tragenden luminalen Zellen. Im unteren Teil **b** wird eine parakrine, progesteron-induzierte Signaltransduktion via RANKL, zur Familie der Tumornekrosefaktoren gehörend, gezeigt. Progesteron bindet an den Progesteronrezeptor. Über RANKL erfolgt eine Signaltransduktion, welches in einer Proliferation der umliegenden rezeptor-negativen Zellen mündet. Luminale und basale Zellen wurden auf der Grundlage einer Fluoreszenz -aktivierten Zellsortierung mittels Oberflächen-Expression von CD24 + (luminale Zellen) und CD24 – (myoepitheliale Zellen) aufgeteilt. Die luminalen Zellen konnten mittels Detektion von SCA1 (=Stammzellantigen1) in rezeptortragende (ER+/PR+) Zellen (SCA1+) und rezeptorlosen (ER-/PR-) Zellen (SCA1-) getrennt werden. [aus Briskin 2013]

Weiter oben wurde schon darauf hingewiesen, dass die Proliferation hauptsächlich in den rezeptornegativen Brustepithelzellen stattfindet und nur ein kleiner Teil in den rezeptortragenden Zellen und dass die Signaltransduktion parakrin sein muss [Briskin 2013]. Stimulation von ovariectomierten Mäusen mit Progesteron, nach einem Östrogen-Priming, zeigte anhand von Einbau eines Thymidinanalogs, dass zunächst ein geringer Einbau in rezeptor-positiven Epithelzellen, welches vereinbar ist mit einem zellintrinsischen Mechanismus der Proliferation, stattfindet. Danach folgt ein großer Einbau in die rezeptorlosen Zellen [Beleut 2010]. Zur Abgrenzung der zellintrinsischen in den rezeptortragenden Zellen versus der parakrinen in den rezeptortragenden Zellen induzierten Proliferation wurden im Tierversuch einer Maus, nach Entnahme des eigenen Brustdrüsenepithels, Cyclin D1 negatives Epithel hineingesetzt und auf der kontralateralen Brust Wildtyp-Epithel injiziert. In der Cyclin D1 defekten Brust fehlte eine Proliferation der rezeptor-positiven Zellen, eine parakrine Proliferation in den rezeptor-negativen Zellen über RANKL konnte jedoch gemessen werden. In den Wildtypepithelien waren beide Proliferationsmechanismen nachzuweisen. Somit ist Cyclin D1 eine wichtige Komponente in der progesteron-induzierten Proliferation in den hormonrezeptor-positiven Brustdrüsenepithelzellen [Beuleut 2010; Briskin 2013].

### **2.4.2 Die intrakrine, lokale Hormonwirkung in der Brust**

Im klassischen Konzept der Endokrinologie werden Hormone in Drüsen synthetisiert und dann über den Blutweg, entweder an Transporterproteine gekoppelt oder nicht, zu den Zielorganen transportiert. Diese klassische Vorstellung in der Endokrinologie wurde unter anderem von der Wirkungsweise mancher Enzyme, bzw. der Produktionsorte der Hormone im Brustgewebe, aber auch in andere Organen, aufgebrochen. Von der endokrinen Hormonregulation der hypothalamo-hypophysären Achse mit den drei peripheren Haupthormonen Östrogen, Progesteron und Prolaktin, kann man einen lokalen, nicht glandulären Hormonmetabolismus abgrenzen. Hier wird im Gewebe selber aus zirkulierenden Hormonvorstufen der Hormonmetabolismus selbst gesteuert [Sasano 2006]. Als Abgrenzung zur klassischen Endokrinologie wurde dieses als intrakrine Hormonaktion beschrieben. Im Brustgewebe wird aus zirkulierenden Androgenen, welche der Nebenniere entstammen, durch enzymatische Umwandlung das lokale Hormonmilieu beeinflusst [Labrie 1995, Labrie

2003]. Im Brustgewebe sind drei sogenannte Schlüsselenzyme, v.a. für den Östrogenmetabolismus, von großer Bedeutung. Erstens spielt hier die Aromatase eine wichtige Rolle. Die Aromatase ist ein Enzym, welches im Brustdrüsengewebe, aber auch unter anderem im Fettgewebe exprimiert wird. Mit Beginn der Menopause findet sich in den Apidozyten hauptsächlich eine der Östrogensyntheseorte. Weitere Expressionsorte sind u.a. Hoden, Ovar, Gehirn, Knochen. Es katalysiert zum einen die Reaktion von Androstendion zu Östron und wichtiger noch zum anderen die Reaktion von Testosteron zu 17beta-Östradiol (siehe Abbildung 4 in Kapitel 1.3.1). Mit 17beta-Östradiol als potentestem Östrogen des Körpers ist dieser Einfluss auf den lokalen Hormonmetabolismus maßgeblich [Santen 2009]. Dann sind die Isozyme der 17-beta-Hydroxysteroid-Dehydrogenase (17betaHSD) als zweite große Gruppe zu nennen, die zum einen durch die Oxidation von Östradiol zu Östron wirken können und damit ein inaktiveres Östrogen produzieren, zum anderen durch die Reduktion von Östron zu Östradiol ein Östrogen mit einer hohen biologischen Aktivität synthetisieren. Sie wirken also gegensätzlich. AKR1C3 katalysiert u.a. zum einen die Reaktion von Androstendion zu Testosteron und zum anderen die Reaktion von Östron zu 17beta-Östradiol (siehe Abbildung 4 in Kapitel 1.3.1) [Byrns 2009]. Als drittes im Östrogenmetabolismus des Brustdrüsengewebes zu erwähnenden Enzyme sind die Östrogensulfotransferase (SULT1E1; Synonyme: EST, STE) und die Östrogensulfatase (STS). Die SULT1E1 sulfoniert Östrogen zum inaktiven Östrogensulfat, die STS hydrolysiert das Östrogensulfat zum Östron zurück. Dabei kommt dem Östrogensulfat die Funktion einer Östrogenspeicherung im Gewebe zu, welche durch Hydrolysierung durch die STS wieder aktiviert werden kann [Sasano 2006]. Labrie et al. sprechen von einer in situ Östrogenproduktion (also innerhalb des Gewebes produziert) von 75% in prämenopausalen Frauen und von knapp 100% in postmenopausalen Frauen [Labrie 2003]. Diese Zahlen verdeutlichen die Bedeutung der Intrakrinologie im Hormonmetabolismus der Brust.

### **2.4.3 Störungen im Hormonhaushalt der Brust: Vorstellung von unterschiedlichen Brustkrebs-Entstehungstheorien**

#### **2.4.3.1 Östrogen-vermittelte Brustkrebsentstehung**

Nachdem im oberen Abschnitt die Hormonaktion im normalen Brustdrüsengewebe erläutert wurde, sollen hier nun mehrere Möglichkeiten der Brustkrebsentstehung erörtert werden,

## Einleitung

welche darauf basieren, dass es zu einer Dysbalance in der Hormonregulation der Brust kommt. Brustkrebs ist aufgrund der Häufigkeit der Erkrankung schon seit langem Gegenstand der Forschung. Vor über einem Jahrhundert, 1896, findet der Einfluss des Östrogens und des Progesterons bei dem englischen Chirurgen George Beatson, welcher eine Regression von Brustkrebs nach Ovariectomie beschreibt, eine frühe indirekte Erwähnung [Beatson 1896]. Studien aus neuerer Zeit untersuchten Risikofaktoren für die Entstehung eines Brustkrebses. Darunter fallen u.a. frühe Menarche, späte Menopause und kurze Zyklen. Diese Faktoren wurden mit einer erhöhten Östrogenexposition in Beziehung gesetzt, was dann in einem erhöhten Risiko für Brustkrebs mündet [Santen 2007]. Untersuchungen an transgenen Mäusen, welche Aromatase überexprimierten und damit einen erhöhten, lokalen Östrogenspiegel ausgesetzt waren, zeigten deutlich häufigeren Brustkrebs als Wildtypmäuse [Santen 2009]. Es werden grob zwei Mechanismen beschrieben über den Östrogen seine procarcinogene Wirkung verursachen kann (vgl. Abbildung 14). Zum einen über den ERalpha, der durch Aktivierung von Zielgenen eine Proliferation hervorruft. Zum anderen einen genotoxischen östrogen-induzierten Signalweg, der über Östrogenmetabolite zu einer Depurination der DNA, also einer DNA-Beschädigung, führt, welche bei Störungen der DNA-Reparatur zu Mutationen führen kann und dadurch Brustkrebszellen verursachen kann [Cavalieri 2006; Santen 2009].

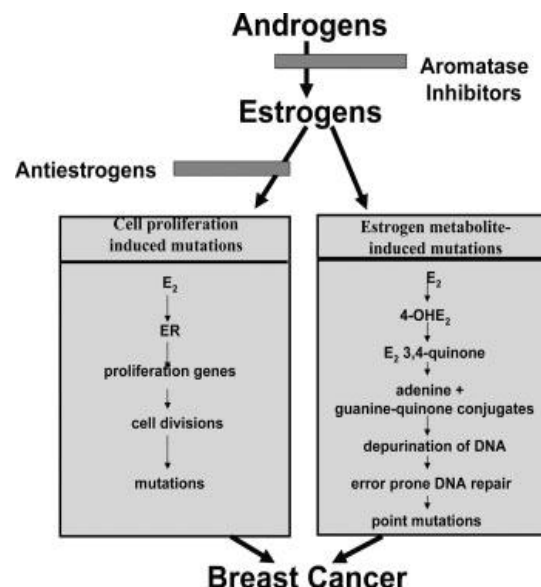


Abbildung 14: Modell zweier unterschiedlicher Wege über den Östrogen die Entstehung eines Brustkrebs fördern kann. Zum einen über die ERalpha-induzierte Zellproliferation, zum anderen über

den sogenannten genotoxischen Signalweg, der über Östrogenmetabolite zu einer DNA-Mutation führt [aus Santen 2009].

### **2.4.3.2 Progesteron-vermittelte Brustkrebsentstehung**

Diesen Theorien entgegengesetzt oder zumindest erweitert und die erst nach Untersuchungen des Östrogens in Gang gekommen ist, ist die Bedeutung von Progesteron hinsichtlich der Entstehung eines Brustkrebses. Eine sehr schöne Übersichtsarbeit von C. Brisken 2013 aus der Schweiz befasst sich mit dem Einfluss des Progesterons auf die Möglichkeit einer Brustkrebsinduktion [Brisken 2013]. Ausgehend von zwei unabhängigen Studien 2003 und 2010, in welchen der Einfluss einer Hormonersatztherapie auf das Brustkrebsrisiko untersucht wurde, konnte erstaunlicherweise gezeigt werden, dass eine Therapie mit Östrogen und einem Progesteron eine Erhöhung des Risikos an einem Brustkrebs zu erkranken mit sich führte. Im Gegensatz dazu jedoch war bei einer alleinigen Einnahme von Östrogen als Hormonersatztherapie das Risiko nicht signifikant erhöht. [Beral 2003; Chlebowsky 2010]. Ausgehend von diesen beiden Studien musste eine neue Beurteilung der Rolle des Progesterons für die Entstehung eines Brustkrebses evaluiert werden. In der oben bereits einmal gezeigten Abbildung 12 wird u.a. die Rolle von Östrogen und Progesteron während des Zyklus gezeigt, in der deutlich wird, dass Progesteron gerade in der zweiten Hälfte des Zyklus an Bedeutung gewinnt und im Brustdrüsengewebe eine Proliferation hervorruft. Diese Proliferation findet an den terminalen duktal-lobulären Einheiten (engl.: terminal ductal lobular units, abgekürzt: TDLUs) statt, anatomische Strukturen an den distalen Enden der Milchgänge. Sie können auch als terminal end buds (TEBs; zu deutsch: endterminale Knospen) bezeichnet werden (siehe Text oben). An diesen TDLUs ist der Beginn der Brustkrebszellen, egal, ob sie duktal oder lobulär sind [Wellings 1973], welches darauf schließen lässt, dass die Änderungen in der zweiten Hälfte des Zyklus in Zusammenhang mit erstmaligem Auftreten eines Brustkrebses steht und somit im Zusammenhang mit der progesteron-induzierten Proliferation steht. Man kann einige der korrelativ untersuchten Risikofaktoren für Brustkrebs -frühe Menarche, späte Menopause, kurze Zyklen- auch so verstehen, dass sie die lebenslange Brustdrüsenexposition für Progesteron erhöhen. Durch frühe Menarche und späte Menopause sind insgesamt mehr Zyklen während der Lebenszeit zu verzeichnen. Dasselbe gilt auch für kurze Zyklusperioden. Da die Lutealphase immer 14 Tage andauert und die erste Zyklushälfte zwischen 10 bis 21 Tage variiert, verbringen Frauen mit kurzen Zyklen mehr Zeit in der Lutealphase, in der der Progesteronspiegel höher ist als

## Einleitung

der Östrogenspiegel. Abbildung 15 ist ein Modell anhand von Mausuntersuchungen und zeigt das Risiko zur Brustkrebsentstehung in Assoziation zum Zyklusgeschehen und dem Alter [Briskin 2013].

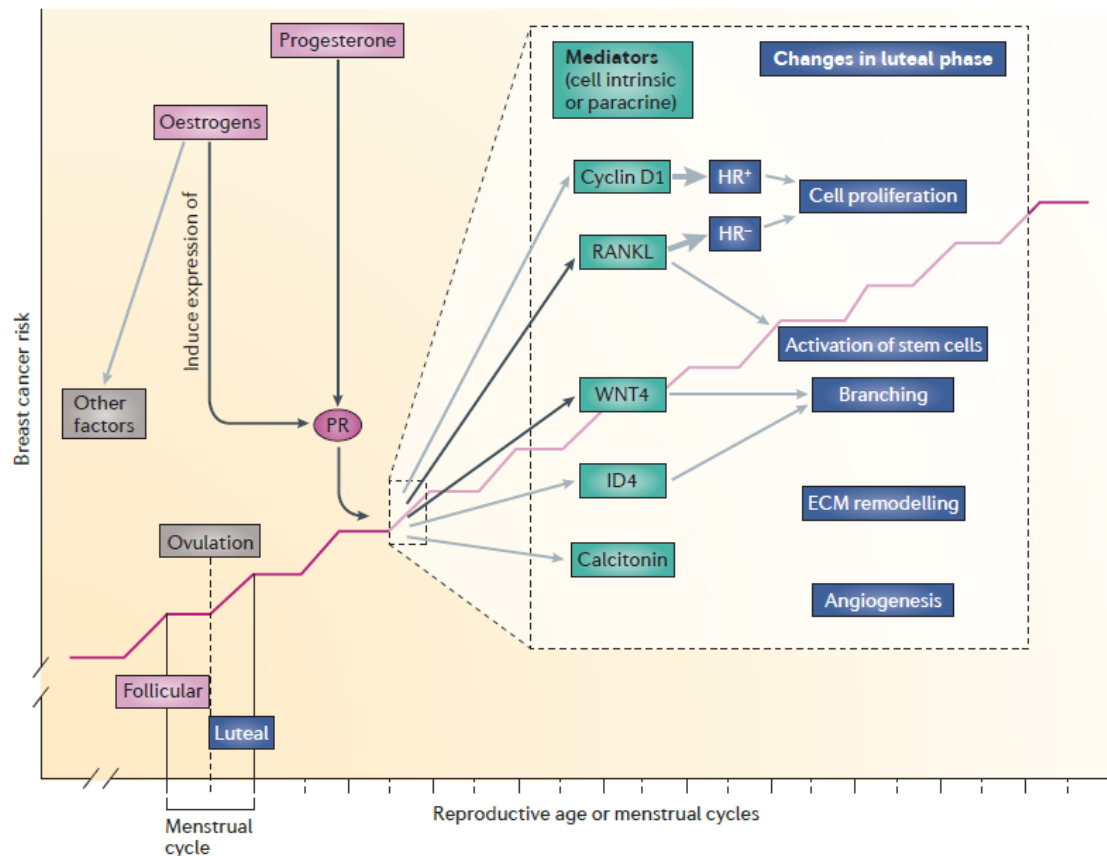


Abbildung 15: Das Modell anhand von Mausuntersuchungen zeigt das Risiko zur Brustkrebsentstehung in Assoziation zum Zyklusgeschehen und dem Alter, hier ein Zyklusjahr. Nähere Erläuterungen: siehe nachfolgenden Text [aus Briskin 2013].

In der Abbildung 15 wird deutlich, dass das Brustkrebsrisiko mit dem Alter steigt und dass das Risiko während der Lutealphase aufgrund der erhöhten Progesteronkonzentration an Brustkrebs zu erkranken am größten ist. Die Aktivierung des Östrogenrezeptors induziert die Ausbildung der Progesteronrezeptoren (der PR ist ein Zielgen der ERs), welche, nach Stimulierung von Progesteron, in der Lutealphase eine Signalkaskade in Bewegung setzen. In der Abbildung 15 werden mehrere Mediatoren des PR-Signalweges aufgeführt: Cyclin D1 wird für die Proliferation der Östrogen- und Progesteronrezeptor tragenden Epithelzellen benötigt und RANKL wird zur Proliferation der rezeptorlosen Zellen benötigt (ausführliche



Besprechung siehe obigen Text). In Knockout-Mäusen konnte gezeigt werden, dass WNT4 und ID4 Mediatoren des Progesteron-Signalweges sind. Bei WNT4-negativen Mäusen war keine Brustdrüsenverzweigung zu verzeichnen [Briskin 2000]. Das gleiche gilt für ID4-negative Mäuse. Die Transkription von ID4 wird durch Progesteron induziert und am meisten in den Myoepithelzellen exprimiert. Calcitonin wird ebenfalls von Progesteron induziert, die Rolle von Calcitonin ist jedoch noch nicht klar [Dong 2011]. Anhand der beschriebenen Mediatoren des Progesteronsignalweges und den bekannten Mutationen in der Brustkrebszelle (vgl. Tabelle 1 in Kapitel 1.1), zeigt Abbildung 16 modellhaft, wie ein möglicher Mutationsvorgang beim Übergang von einem Carcinoma in situ zu einem invasiven Karzinom aussehen könnte.

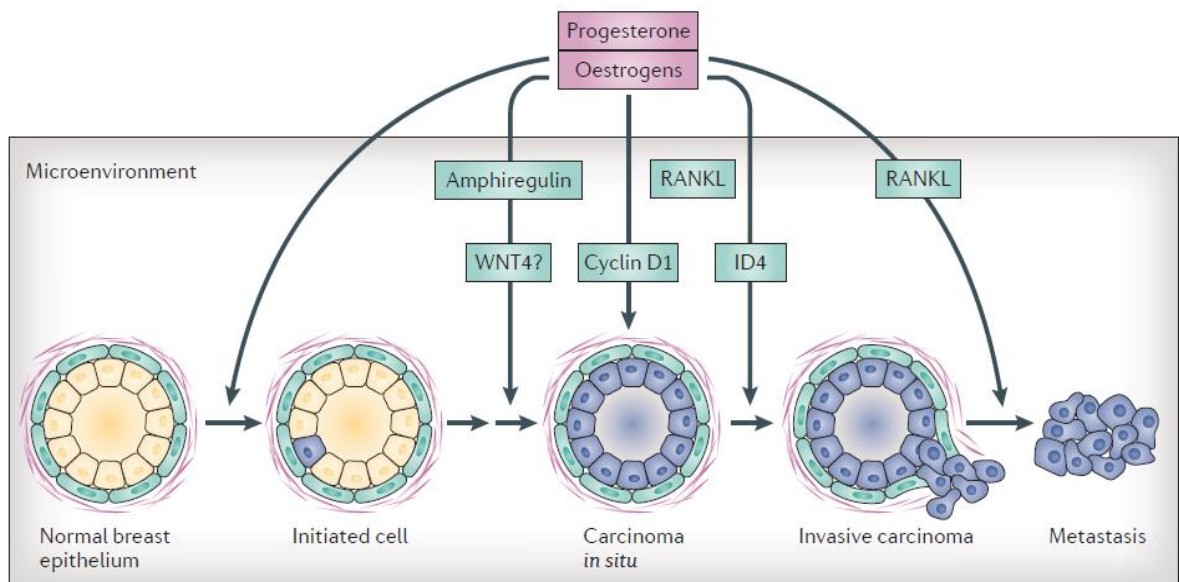


Abbildung 16: Modell einer Carcinoma in situ - invasives Carcinom Sequenz. Nähere Erläuterung siehe nachfolgenden Text [aus Briskens 2013].

In Abbildung 16 lässt sich erkennen, dass sich in einem anfänglich normalen Milchduktus eine erstmalige Mutation ereignet, dessen Ursache man nicht kennt, welches jedoch unter der Wirkung von Progesteron geschieht. Im Modell erfolgt danach eine Mutation des Amphiregulin und ggf. WNT4, nun auch unter Einfluss von Östrogen, was den Tumorprozess weiter unterstützt [Briskin 2013]. Im oberen Abschnitt des Textes wurde schon einmal auf die Rolle des Amphiregulins eingegangen, welches ein Zielgen des Östrogenrezeptors ist und bei

Knockout-Mäusen während der Pubertät zu einem Fehlen der ductalen Elongation führt [Ciarloni 2007], wobei andere, spätere Wirkungsweisen des Amphiregulins maskiert werden können [Briskin 2013]. Cyclin D1 ist häufig in Brustkrebszellen amplifiziert [The Cancer Genome Atlas Network 2000]. Letztlich führen Mutationen in diesen Mediatorgenen (Amphiregulin, WNT4, Cyclin D1, RANKL, ID4) zu einem Progress des Tumors von einem in situ- Carcinom zu einem invasiven bis metastatischen Prozess [Briskin 2013]. Was aus dieser Abbildung 32 auch deutlich wird, ist, dass Störungen von Östrogen und Progesteron zusammen für eine Brustkrebsentstehung vonnöten ist und dass grade die Anfangsstadien im Brustkrebsprozess progesteron-vermittelt sind. Dieses wird durch eine andere Erkenntnis unterstützt. 1987 veröffentlichte die dänische Pathologin M. Nielsen eine Studie, in der sie Frauen sectionierte, die an einer anderen Ursache als an Krebs gestorben waren. 30% der Frauen in den 40er Lebensjahren hatten ein ductales Carcinoma in situ, wobei jedoch „nur“ generell ca. 10% aller Frauen an einem klinisch manifesten Brustkrebs erkrankten [Nielsen 1987]. Diese Diskrepanz ist überraschend und lässt den Schluss zu, dass es Faktoren geben muss, welche ein Carcinoma in situ in ein invasives Carcinom übergehen lässt und dass ein Carcinoma in situ nicht zwangsläufig in ein invasives Carcinom übergehen muss. Durch die bereits oben erwähnten Studien zur Hormonersatztherapie, bei der eine Ersatztherapie mit Östrogen und Progesteron zu einem signifikanten Anstieg des Brustkrebsrisikos führt als Östrogen alleine [Beral 2003; Chlebowsky 2010], könnte dieser Faktor es sein, dass durch die Behandlung mit Progesteron sich Frühformen des Mammacarcinoms (Carcinoma in situ) zu invasiven Formen entwickeln. Oder eben durch erhöhten Progesteroneinfluss durch lange Progesteronexposition in Form von früher Menarche, später Menopause und kurzen Zyklen [Briskin 2013, Stauber und Weiherstahl 3. Auflage].

### **2.5 Zielsetzung der Arbeit**

Zum Gen AKR1C3 lassen sich einige Veröffentlichungen finden, welche eine Assoziation zwischen veränderter AKR1C3-Expression und Brustkrebs beschreiben [u.a. Byrns 2009; Penning 2009; Jansson 2006; Lin 2004; Suzuki 2007; Wiebe 2003, Wiebe 2006]. Die Funktionen im Steroidmetabolismus von AKR1C3 und die veränderte Expression in Mammacarcinomzellen deuten auf die mögliche Bedeutung dieses Gens im Tumorgeschehen der Brust. Ätiologisch spielt bei der Entstehung des Brustkrebses neben exogenen Faktoren auch eine familiäre Häufung eine Rolle, welche nur zu einem Bruchteil auf die bekannten

## Methodik

Gene BRCA1 und BRCA2 zurückzuführen sind. Da weitere hoch-penetrante Risikogene bisher nicht detektiert wurden, liegt die Vermutung nahe, dass es niedrig-penetrante Gene bzw. Risikoallel-Kombinationen gibt, die die familiäre Häufung erklären können. Für das Mammacarcinom konnten schon einige Risikoallele (SNPs) detektiert werden (vgl. Kapitel 1.2.2) [Varghese 2010].

Bei der vorliegenden Arbeit wird die Bedeutung zweier Polymorphismen in der Promotorregion von AKR1C3 untersucht. Hierfür werden zwei single nucleotide polymorphisms (SNP), der SNP rs1937845 und der SNP 3763676 (kurz SNP 845 und SNP 676), hinsichtlich ihrer Allelfrequenz, Genotypfrequenz und Allelpositivität mit dem Auftreten von Mammacarcinomen in Beziehung gesetzt. Grundlage dieser erhobenen Daten sind Mammacarcinom-Patientinnen und eine gesunde Kontrollgruppe. Zusätzlich werden die Ergebnisse mit dem Lymphknotenstatus, dem Auftreten des Protoonkogens Her2-neu und dem Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus der Mammacarcinom-Patientinnen verglichen.

Ziel dieser Arbeit ist es, im Sinne einer statistischen Analyse, einen rein korrelativ bestimmten Zusammenhang zu erkennen oder auszuschließen, zwischen der Ausprägung eines SNP-Allels und 1. der Erkrankung oder eben Nichterkrankung an einem Mammacarcinom und 2. zwischen der Ausprägung eines SNP-Allels und dem Auftreten oder eben Nichtauftreten eines bestimmten histologischen Merkmals oder eines Lymphknotenstatus bei an Brustkrebs erkrankten Patientinnen.

In einer Korrelationsstudie können statistische Auffälligkeiten erkannt werden, die Gründe für diese Auffälligkeiten können höchstens anhand von Literatur vermutet, nicht geklärt werden. Daher ist das Ziel dieser Arbeit statistische Korrelationen zu bestätigen oder auszuschließen und bei signifikanten Ergebnissen mittels bereits bekannter Literatur eine mögliche Ursache anzudeuten.

## 3 Methodik

### 3.1 Patientengruppe

Blutproben oder DNA-Proben von Mammacarcinom-Patientinnen wurden im Institut für Pathologie der Universität Regensburg und im Institut für Gynäkologie im St. Josef-

Krankenhaus Regensburg zwischen 2005 und 2007 gesammelt. Eingeschlossen waren kaukasische Frauen mit sporadischem Brustkrebs und verfügbaren Informationen über Lymphknotenstatus und Rezeptorstatus von ER (Östrogenrezeptor), PR (Progesteronrezeptor) und dem Protoonkogen Her2-neu. Die gesunde Kontrollgruppe besteht aus kaukasischen Frauen aus der Region um Regensburg. Kriterien für die Aufnahme in die Kontrollgruppe war die Abwesenheit einer malignen Erkrankung.

### 3.2 DNA-Isolierung aus EDTA-Blut

Zur Untersuchung der SNPs wurde aus EDTA-Blut isolierte DNA verwendet. Einem Lysepuffer, bestehend aus 1% v/v TritonX, 0.32 M Sucrose, 0.01 M Tris (pH 7,5) und 5mM MgCl<sub>2</sub>, wurde EDTA-Blut im Verhältnis von 3:1 (300 µl Lysepuffer und 100 µl EDTA-Blut) hinzugefügt. Anschließend wurde es für 30 Sekunden bei 1300 U/min zentrifugiert bis sich der Überstand klar absetzte. Dieser wurde in der Zwischenzeit immer wieder verworfen. Die Proben wurden in 50µl PCR-Puffer (GoTaq-Puffer, Promega, Madison, USA) gelöst, der 0,5% Tween 20 und 10mAnson Einheiten Proteinkinase K (Merck, Darmstadt, Deutschland) enthält. Dieses wurde bei 50 °C inkubiert und in einem weiteren Schritt das Enzym bei 95 °C für 10 min inaktiviert wurde. Anschließend wurden die DNA-Proben bei -24 °C eingefroren.

### 3.3 PCR

Vor Beginn der PCR wurden die DNA-Proben aufgetaut und mit einem GoTaq-Puffer, vier allelspezifischen Primern und dem hitzestabilen GoTaq-Enzym vermengt. Bei diesem Arbeitsschritt wurde auf Eis gearbeitet. Die DNA-Proben und das Enzym wurden so kurz wie möglich außerhalb des Gefrierfachs gelassen. Das Mischverhältnis wurde für jeden der beiden SNPs individuell ausgetestet.

rs1937845 : 4 µl der genomischen DNA wurden mit 2 µl 5xGoTaq-Puffer, 0,2 µl dN TP-Mix (10mM)(Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland) 0,6µl bzw. 0,4µl des inner primer 1 und 2 und 0,2 µl des outer primer 1 und 2 (alle Primer je 10mM), sowie 0,1µl GoTaq-Polymerase (Promega, Madison, USA) und 2,3µl H<sub>2</sub>O vermengt.

rs3763676: 4µl der genomischen DNA wurden mit 2 µl 5xGoTaq-Puffer, 0,2 µl dNTP-Mix (10nM)(Fermentas, St.Leon-Roth, Deutschland) 0,2µl des inner primer 1 und 2 und 0,2 µl des

## Methodik

outer primer 1 und 2 (alle Primer je 10mM), sowie 0,1µl GoTaq-Polymerase (Promega, Madison, USA) und 2,9 µl H<sub>2</sub>O vermengt.

Die beiden *outer primer* und die beiden *inner primer* der SNPs sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Primer	Sequenz
SNP 676 – C	5´- AAT GGC ATG TAG GAG GAG GTA AAC – 3´
SNP 676 - T	5´- TCT CCA CAG ACC ATA TAA GAC TGC ATA – 3´
SNP 676 – 1	5´- TAA AGG GAA TTA TTC TTA CCT CTG GAG G- 3´
SNP 676 - 2	5´- TAT GGT TGC TAT TTG TTC TAC AAA TCC T- 3´
SNP 845 - T	5´- AGG AAT GAC TAA TGA GAA TTT TTC ACA T- 3´
SNP 845 - C	5´- ACT TTA ATT TTT TAT TGA GGA CCA AAT G- 3´
SNP 845 - 1	5´- TGT TAG ACT ATA AAA ACC TCC AGC TAC A- 3´
SNP 845 - 2	5´- ACC TAC ACC AGA ATT TCT TTT TAT TTG C – 3´

Tabelle 6: Sequenzen der benutzen Primer für die PCR.

### 3.4 Elektrophorese im Agarosegel

Mittels Gelelektrophorese wurden die Proben nach der PCR dargestellt. Die praktische Vorgehensweise besteht darin, dass man die amplifizierten Proben in Geltaschen pipettiert und ein elektrisches Spannungsfeld anschließt. Die Proben, die amplifizierte DNA enthalten, wandern aufgrund der negativen Ladung der DNA vom Minus- zum Pluspol. Zunutze macht man sich, dass unterschiedlich große Moleküle unterschiedliche Laufgeschwindigkeiten im Gel besitzen. Die Größe eines Moleküls wird hierbei durch die Anzahl der Basenpaare bestimmt. Kleine Moleküle wandern im Gel schneller, große Moleküle hingegen langsamer.

## Methodik

Hierdurch kann man die Größe des PCR-Produkts mittels Molekulargewichtsstandards bestimmen. Die PCR bildet allerdings keine quantitative Aussage des Amplifikats.

Für die Herstellung des Agarosegels wurde zunächst ein 1xTBE-Puffer hergestellt. 121,1 g einmolarer TRIS (Tris Ultra Qualität, Roth, Artikelnummer 5429.3) wurde mit 5,6 g 0,9 molarer Borsäure (Borsäure, Roth, Artikelnummer 6943.1) und 3,7 g 10millimolares EDTA Disodiumsalz (EDTA-Disodiumsalz, Dihydrate, Molecular Biologiy Grade, 324503Lot B54250, Calbiochem, [www.dalbiochem.com](http://www.dalbiochem.com), 800-628-8470 U.S. und Canada) vermischt und mit deionisiertem Wasser auf einen Liter aufgefüllt. Schließlich wurde dieser 10xTBE-Puffer im Verhältnis 1:10 mit deionisiertem Wasser verdünnt.

Für die direkte Herstellung des Agarosegels benötigt man 2,7 g Agarose (Biozym LE Agarose, BiozymScientific GmbH, Steinbrinksweg 27, D31840 Hess. Oldendorf, Biozym Biotech Trading GmbH, Wehlstr. 27b, A1200 Wien), welche in 180 ml 1x TBE-Puffer und 10ml deionisiertem Wasser gelöst wurde. Das Gemisch wurde dann für 3 min in der Mikrowelle zum Kochen gebracht. Nach äußerer Abkühlung mit kaltem Wasser wurden 0,9 µl Ethidiumbromid - Stammlösung (Roth, Ethidiumbromidlösung 1%, 1 prozentige Lösung in Wasser (10 mg/ml), Homidiumbromid, 3,8-Diamino-5-Ethyl-6-Phenylphenanthridinium-Bromid (22181,1), Carl Roth GmbH und CoKG, Karlsruhe) hinzugefügt und kurz durchmischt. Nun wurde das Gel gegossen. Nach 20-30 min Abkühlungszeit erstarrte das Gel und wurde in die mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammern gegeben, wo die Kämme entfernt wurden. In die daraus entstehenden Geltaschen wurden nun 32 unbekannte Proben, eine Positivkontrolle (eine heterozygote Probe mit guter Qualität), eine Wasserprobe und insgesamt 4 Molekulargewichtsstandards eingebracht. Zur Herstellung des Molekulargewichtsstandards wurde zuerst der Ladepuffer (1 kb Plus DNA Ladder, invitrogen Catno10787-026, 100 µg (1 µg/µl), Lotno1352720) aus 15 ml mit 50prozentigem Glycerol (Roth, Artikelnummer 3783.1), 0,37 g 100 mM EDTA-Disodiumsalz (EDTA-Disodiumsalz, Dihydrate, Molecular, Biologiy Grade, 324503Lot B54250, Calbiochem, [www.dalbiochem.com](http://www.dalbiochem.com), 800-628-8470 U.S. und Canada), 0,1g mit1prozentigem sodium dodecylsulfat (Calbiochem, cat#428015Lot#B51735), 0,01 g 0,1 prozentigem Bromphenolblau (Roth, Art A512.1, Na-Salz) und 10ml deionisiertem Wasser, hergestellt. Von diesem wurde 1 ml mit 8 ml Wasser und 1 ml der Molekulargewichtsstandard-Stammlösung vermengt. Das mit den Proben versetzte Gel

## Methodik

wurde schließlich einer Stromstärke von 140 mA für ca. 1,5 h ausgesetzt. Danach wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert (vgl. Abbildung 17).

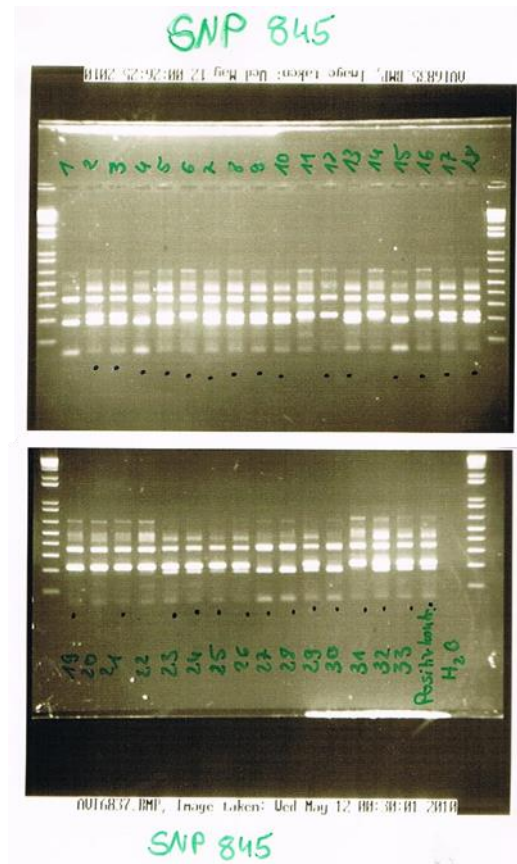


Abbildung 17: Zwei Fotografien unter UV-Licht eines Agarosegels mit Proben 1-33, einer Positivkontrolle und der Wasserprobe des SNPs 845.

### 3.5 Benutzte Geräte

Thermocycler: Biometra (biomedizinische Analytik GmbH, 37079 Göttingen), T1-Thermoblock

Vortexer: IKA(hoch r), MS2 Minishaker

Zentrifuge: Heraeus, Biofuge pico

Mikrowelle: privileg 8020

Spannungsquelle: Gibco BRL, Elektrophoresis Power Supply

UV-Lichtquelle: MWG-Biotech, Gesellschaft für angewandte Biotechnologie mbH

Photocomputer: Fexscan F56, Color Display Monitor

Waage: Sartorius. CP4202S

Pipette: eppendorf Reference

Kühlschrank: Liebherr, Premium

### 3.6 Statistische Datenauswertung

Zu Beginn wird eine Nullhypothese  $H_0$  aufgestellt,  $H_1$  ist dann die Alternative zu dieser Nullhypothese. Angenommen eine fiktive Patientengruppe von 357 Personen wird hinsichtlich der Allelfrequenz von T bzw. C eines SNPs untersucht, wobei 272 Personen ein Mammacarcinom haben und 85 zu einer gesunden Kontrollgruppe gehören. Die Nullhypothese würde hierfür lauten, es gibt keinen Unterschied zwischen dem Auftreten von T- bzw. C-Allelfrequenzen im SNP zwischen gesunden und Mammacarcinomzellen. Diese Behauptung gilt es nun zu überprüfen.

Die Odds Ratio, auch Quotenverhältnis oder Chancenverhältnis genannt, ist ein statistisches Maß über die Stärke eines Zusammenhangs von zwei Merkmalen. Die Berechnung der Odds Ratio sei dem obigen Beispiel erläutert. Hierfür werden die Zahlen in einer Kreuztabelle dargestellt (vgl. Tabelle 7).

SNP	T-Allel	C-Allel	Gesamt
Gesunde	55	30	85
Mammacarcinom	141	131	272
Gesamt	196	161	357

Tabelle 7: Beispiel einer 2x2 Kreuztabelle.

Die Odds Ratio berechnet sich nun anhand der Wahrscheinlichkeiten  $p$  für das Auftreten eines Merkmals. Seien  $p_1$  und  $p_2$  die Wahrscheinlichkeiten, nach denen die Allelfrequenz ein T-Allel bzw. ein C-Allel in einer gesunden Zelle zeigt und  $q_1$  bzw.  $q_2$  die Wahrscheinlichkeiten,



dass sie in Mammacarcinomzellen auftreten, dann berechnet sich die Odds Ratio folgendermaßen:

$$OddsRatio = \frac{p_1 / q_1}{p_2 / q_2}$$

Aus dem oben gegebenen Beispiel folgt eine Odds Ratio von 1,70. Dies bedeutet, dass die Allelfrequenz ca. 1,7-mal häufiger bei gesunden Zellen auftritt als bei Mammacarcinomzellen.

$$OddsRatio = \frac{55 \cdot 131}{30 \cdot 141} \approx 1,70$$

Es bleibt die Frage nach der statistischen Signifikanz des Ergebnisses. Hierfür wird der so genannte p-Wert berechnet. Dieser gibt die Wahrscheinlichkeit für das fälschliche Verwerfen der Nullhypothese  $H_0$  an. Konkret wird die Nullhypothese verworfen, wenn der p-Wert das vorher festgelegte Signifikanzniveau unterschreitet. In der Praxis wird dieses Signifikanzniveau normalerweise auf  $\alpha = 0,05$  gesetzt. Die Berechnung des p-Wertes erfolgte mittels unten genannter Internetseiten (vgl. Kapitel 3.1). In dem genannten Beispiel ergibt sich ein p-Wert von:

$$p = 0,0375$$

Dies bedeutet, dass die Nullhypothese abgelehnt wird und nach dem Ergebnis der Odds Ratio ein statistisch signifikanter Unterschied im Auftreten der Allelfrequenzen zwischen gesunden und Mammacarcinomzellen im untersuchten SNP besteht.

In dem oben genannten Beispiel wurden nur die beiden Merkmale, gesund und Mammacarcinom, untersucht. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit werden jedoch mehr als zwei Merkmale für beispielsweise die Allelfrequenz untersucht. Konkret werden 8 klinisch-pathologische Parameter bei Mammacarcinomen untersucht und hinsichtlich ihrer statistischen Signifikanz untersucht. Zu diesem Zweck kommen multiple comparison Tests zum Einsatz. Wiederum sei das Vorgehen an einem fiktiven Beispiel erläutert. Angenommen 8 klinisch-pathologische Parameter werden aus SNPs von Mammacarcinomproben für die Allelfrequenzen T bzw. C bestimmt. Nun soll eine Aussage über das statistisch relevante Auftreten dieser 8 klinisch-pathologischen Parameter in den Allelen gemacht werden. Aus

diesem Grund müssen zuerst alle relevanten Odds Ratios und p-Werte bestimmt werden. Bei 8 Parametern (z.B.  $A_1, A_2, \dots, A_8$ ) ergäben sich  $8 \times 8 = 64$  mögliche Kombinationen der Parameter. Dies stellt man sich wie folgt vor. Der erste Parameter  $A_1$ , kann mit den anderen Parametern 8-mal kombiniert werden ( $A_1 \leftrightarrow A_1, A_1 \leftrightarrow A_2, \dots, A_1 \leftrightarrow A_8$ ). Der zweite Parameter  $A_2$  kann ebenfalls mit den 8 Parametern kombiniert werden ( $A_2 \leftrightarrow A_1, A_2 \leftrightarrow A_2, \dots, A_2 \leftrightarrow A_8$ ). Analog für die übrigen Parameter, woraus sich die  $8 \times 8 = 64$  Kombinationen ergeben. Von diesen können jedoch einige ausgeschlossen werden. Zum werden keine Parameter mit sich selbst untersucht, d.h.  $A_1 \leftrightarrow A_1, A_2 \leftrightarrow A_2$  usw. können ausgeschlossen werden. Somit bleiben statt  $64 - 8 = 56$  Kombinationen übrig. Weiterhin enthalten diese alle übrigen Kombinationen doppelt, d.h. beispielsweise  $A_1 \leftrightarrow A_2$  und  $A_2 \leftrightarrow A_1$ . Diese doppelten Kombinationen haben gleiche p-Werte und können deshalb ebenfalls vernachlässigt werden, wodurch sich die Anzahl der übrigen Kombinationen auf  $56/2 = 28$  halbiert. Soll eine statistisch signifikante Aussage über diese Kombinationen gemacht werden, ergibt sich ein Problem mit dem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$ . Dieses gibt lediglich die Signifikanz für jede einzelne Untersuchung an. Um zu entscheiden, ob alle 28 Kombinationen statistisch signifikant unterschiedlich voneinander sind, kann das Konfidenzniveau mit einer Anpassung nach Bonferroni geändert werden. Hierfür wird das ursprüngliche Konfidenzintervall durch die Anzahl der Kombinationen geteilt, d.h. auf  $\alpha = 0,05/28 = 0,00178$  gesetzt. Ein p-Wert der kleiner als  $\alpha = 0,00178$  ist, zeigt eine statistische Unabhängigkeit gegenüber den anderen Parametern an.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Analyse 1

In dieser Arbeit wurden zwei single nucleotide polymorphisms (SNPs) untersucht, welche im Promotor des Gen AKR1C3 liegen. Für rs1937845 (SNP 845) lagen 201 Mammacarcinomproben vor, welche mit 201 Proben einer gesunden Kontrollgruppe verglichen wurden. Für rs3763676 (SNP 676) lagen 250 Mammacarcinomproben und 250 Proben gesunder Patientinnen vor. Im ersten Schritt der Analyse wurden die Odds Ratio und der p-Wert im 95%-Confidence-Interval hinsichtlich der Allelfrequenz, Allelpositivität und Genotypfrequenz bei beiden SNPs untersucht. In einem zweiten Schritt wurden dieselben Analysen hinsichtlich klinisch-pathologischer Parameter, wie Östrogenstatus (ER), Progesteronstatus (PR), Her2-neu-Ausprägung und Lymphknotenstatus untersucht. Die Auswertung, d.h. die Berechnung der Odds Ratios und p-Werte erfolgte mithilfe der Internetseiten [www.quantitativeskills.com](http://www.quantitativeskills.com) und [www.medcalc.org](http://www.medcalc.org).

### 4.2 Allelfrequenzanalyse zwischen Mammacarcinomproben und der gesunden Kontrollgruppe

#### 4.2.1 Allelfrequenzanalyse für SNP 845

Es wurde die Allelfrequenz von SNP 845 untersucht, wobei zum einen die Häufigkeit des Vorliegens des T-Allels gegenüber dem C-Allel (T-Allelfrequenz), zum anderen die Häufigkeit des Vorliegens des C-Allels gegenüber dem T-Allel (C-Allelfrequenz) in der Mammacarcinomgruppe und der gesunden Kontrollgruppe verglichen wurde (vgl. Tabelle 8).

Die in Abschnitt 2.6 eingeführten statistischen Konzepte werden nun genutzt um die Daten zu analysieren. Bei der T-Allelfrequenzanalyse zeigte sich eine Odds Ratio  $OR=1.188$  und ein p-Wert  $p=0.3891$ . In der C-Allelfrequenzanalyse zeigte sich eine Odds Ratio  $OR=0.997$  und ein p-Wert  $p=0.988$ .

Es konnte kein Unterschied in der Allelverteilung zwischen Mammacarcinomgruppe versus gesunde Kontrollgruppe festgestellt werden. Eine graphische Darstellung der Verteilung von T- und C-Allelfrequenz bei der Kontrollgruppe und der Mammacarcinomgruppe zeigen Tabellen 8 und 9 und Abbildungen 17 und 18.

SNP 845	2 x TT + TC	CC	Gesamt
Gesunde	218 (75,7%)	70 (24,3%)	288 (100%)
Mammacarcinom	222 (78,7%)	60 (21,3%)	282 (100%)
Gesamt	440 (77,2%)	130 (22,8%)	570 (100%)

Tabelle 8: Prozentuale und absolute Häufigkeit der T-Allelfrequenz von SNP 845 in der Mammacarcinomgruppe und der gesunden Kontrollgruppe. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Allelverteilung nachgewiesen werden.

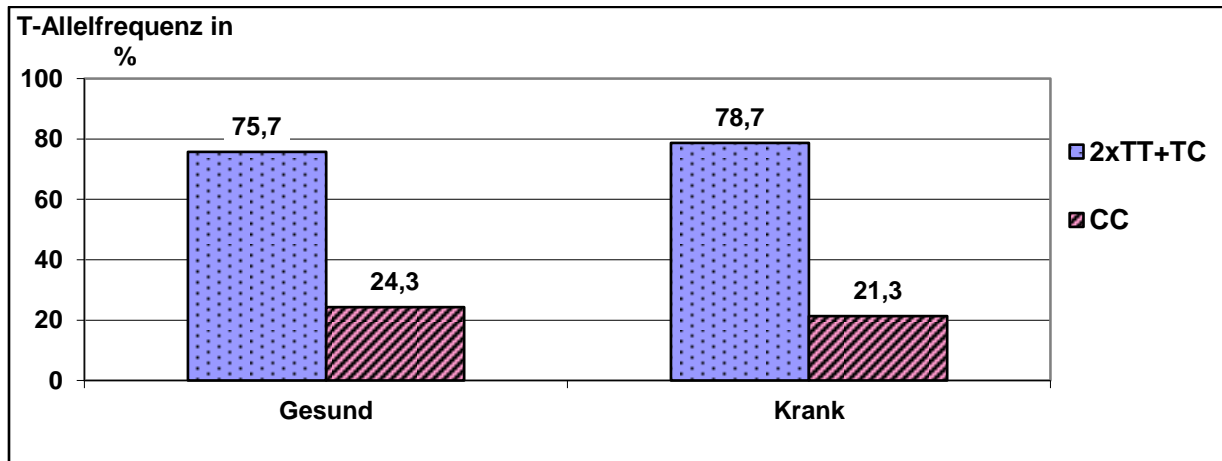


Abbildung 18: Darstellung der prozentualen Verteilung der T-Allelfrequenz bei der gesunden Kontrollgruppe und der Mammacarcinomgruppe bei SNP 845.

SNP 845	2 x CC + TC	TT	Gesamt
Gesunde	184(63,9%)	104 (36,1%)	288 (100%)
Mammacarcinom	180 (63,8%)	102 (36,2%)	282 (100%)
Gesamt	364 (63,8%)	206 (36,2%)	570 (100%)

Tabelle 9: Prozentuale und absolute Häufigkeit der C-Allelfrequenz von SNP 845 in der Mammacarcinomgruppe und der gesunden Kontrollgruppe. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Allelverteilung nachgewiesen werden.

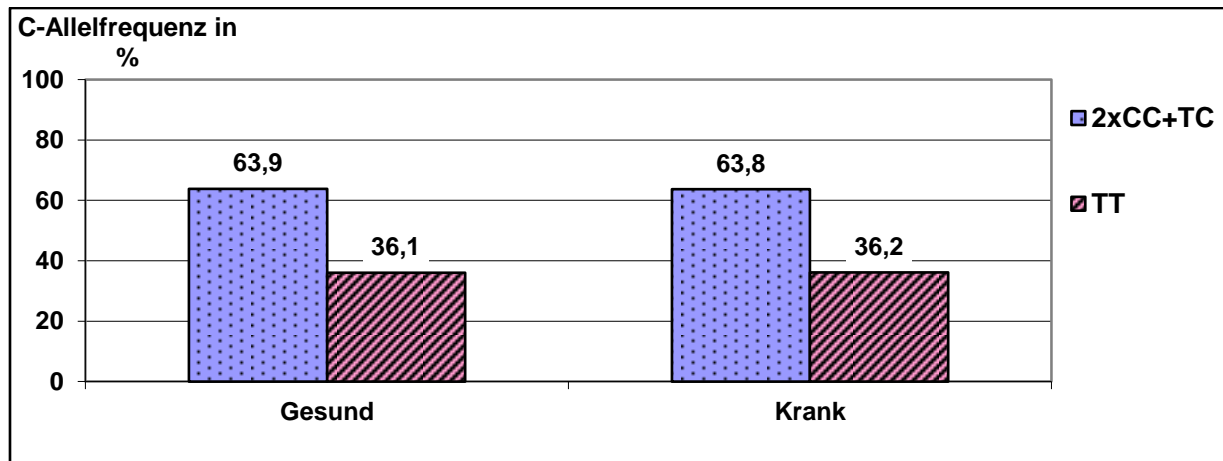


Abbildung 19: Darstellung der prozentualen Verteilung der C-Allelfrequenz bei der gesunden Kontrollgruppe und der Mammacarcinomgruppe bei SNP 845.

#### 4.2.2 Allelfrequenzanalyse für SNP 676

Auch der Polymorphismus SNP 676 wurde hinsichtlich der Allelfrequenz untersucht und die Häufigkeit des Vorliegens des T-Allel gegenüber dem C-Allel (T-Allelfrequenz) und die Häufigkeit des C-Allels gegenüber dem T-Allel (C-Allelfrequenz) hinsichtlich Mammacarcinimgruppe versus gesunder Kontrollgruppe untersucht. Hier ergab sich in der T-Allelfrequenz kein Unterschied bei einer Odds Ratio von  $OR=1.023$  und einem p-Wert von  $p=0.933$  in der Allelverteilung zwischen Mammacarcinomgruppe und gesunder Kontrollgruppe (vgl. Tabelle 11, 12 und Abbildung 19, 20 ). Auch in der C-Allelfrequenz ergab sich kein statistischer Unterschied bei einer Odds Ratio  $OR=0.882$  und einem p-Wert  $p=0.400$  (vgl. Tabelle 11,12 und Abbildung 19,20 ).

SNP 676	2 x TT + TC	CC	Gesamt
Gesunde	341 (92,4%)	28 (7,6%)	369 (100%)
Mammacarcinom	349 (92,5%)	28 (7,5%)	377 (100%)
Gesamt	690 (92,5%)	56 (7,5%)	746 (100%)

Tabelle 10: Prozentuale und absolute Häufigkeit der T-Allelfrequenz von SNP 676 in der Mammacarcinomgruppe und der gesunden Kontrollgruppe. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Allelverteilung nachgewiesen werden.

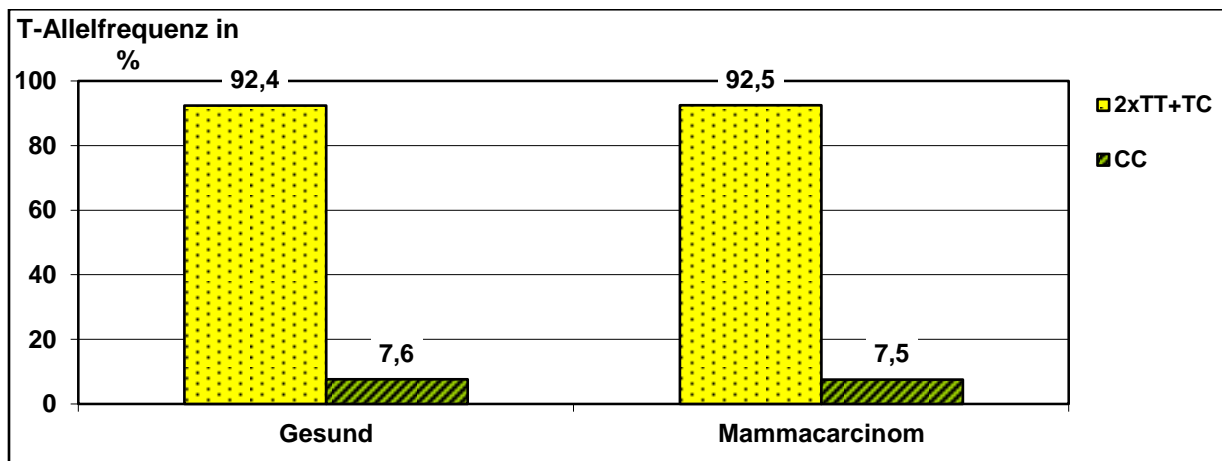


Abbildung 20: Darstellung der prozentualen Verteilung der T-Allelfrequenz bei der gesunden Kontrollgruppe und der Mammacarcinomgruppe bei SNP 676.

SNP 676	2 x CC + TC	TT	Gesamt
Gesunde	159 (43,0%)	210 (57,0%)	369 (100%)
Mammacarcinom	151 (40,0%)	226 (60,0%)	377 (100%)
Gesamt	310 (41,5%)	436 (58,5%)	746 (100%)

Tabelle 11: Prozentuale und absolute Häufigkeit der C-Allelfrequenz von SNP 676 in der Mammacarcinomgruppe und der gesunden Kontrollgruppe. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Allelverteilung nachgewiesen werden.

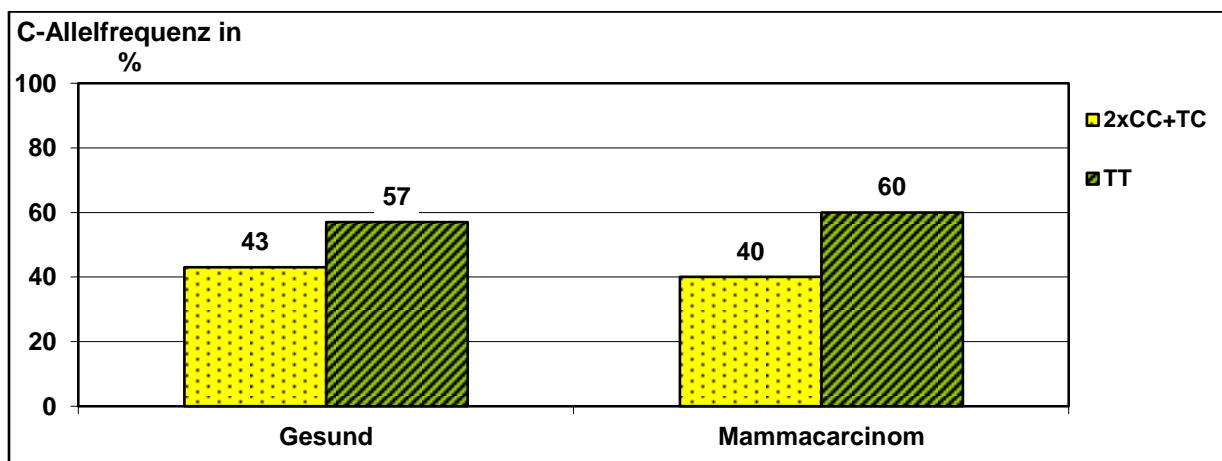


Abbildung 21: Darstellung der prozentualen Verteilung der C-Allelfrequenz bei der gesunden Kontrollgruppe und der Mammacarcinomgruppe bei SNP 676.

### 4.3 Genotypfrequenzanalyse zwischen Mammacarcinomgruppe und gesunder Kontrollgruppe

#### 4.3.1 Genotypfrequenzanalyse für SNP 845

Als nächstes wurden die Genotypfrequenzen für den SNP 845 untersucht. Hierbei konnten weder in der Heterozygotenanalyse, noch in der Homozygotenanalyse signifikante Unterschiede festgestellt werden. Beim Vergleich von T/T gegen T/C zeigte sich keine statistische Relevanz ( $OR=1.073$ ;  $p=0.765$ ). Auch die Untersuchung von C/C gegen T/C zeigte keine Signifikanz auf ( $OR=1.228$ ;  $p=0.464$ ). Der Vergleich der beiden homozygoten Genotypen T/T und C/C führten ebenso zu keinem signifikantem Ergebnis ( $OR=0.874$ ;  $p=0.671$ ). (vgl. Tabelle 13). Die graphische Darstellung der Genotypfrequenz von SNP 845 zeigt Abbildung 21.

SNP 845	Homozygot T/T	Heterozygot T/C	Homozygot C/C	Gesamt
Gesunde	52 (25,9%)	114 (56,7%)	35 (17,4%)	201 (100%)
Mammacarcinom	51 (25,4%)	120 (59,7%)	30 (14,9%)	201 (100%)
Gesamt	103 (25,6%)	234 (58,2%)	65 (16,2%)	402 (100%)

Tabelle 12: Absolute und prozentuale Genotypfrequenzen von SNP 845 für die gesunde Kontrollgruppe und die Mammacarcinomgruppe. Es fielen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen auf.

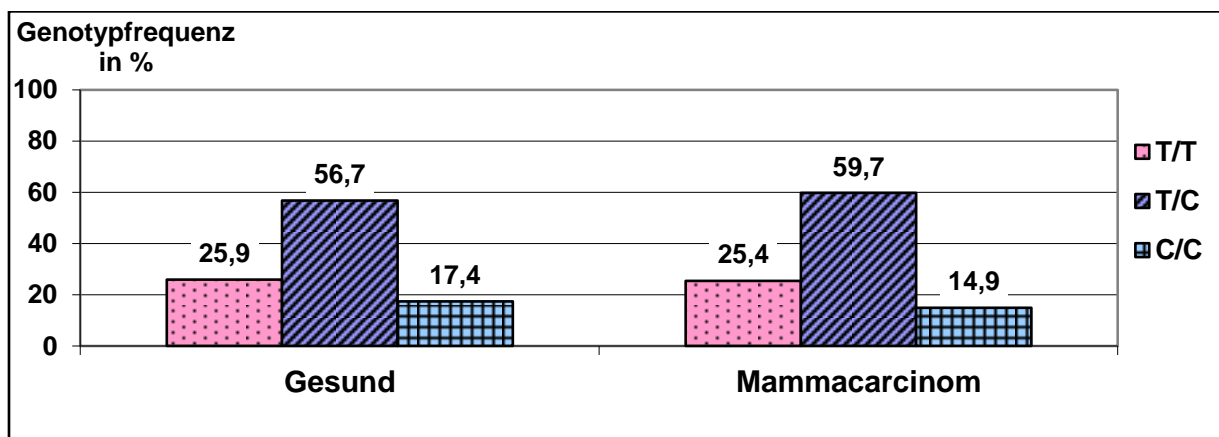


Abbildung 13: Prozentuale Verteilung der Genotypen von SNP 845 bei der Kontrollgruppe versus Mammacarcinomgruppe.

#### 4.3.2 Genotypfrequenzanalyse für SNP 676

Nun wurden die Genotypfrequenzen auch für den SNP 676 berechnet. Auch hier zeigte sich bei der Heterozygotenanalyse und bei der Homozygotenanalyse keinerlei statistische Relevanz. Der Vergleich von T/T gegen T/C führte zu keinem signifikantem Ergebnis (OR=0.872; p=0.460). Die Gegenüberstellung der homozygoten Genfrequenz C/C gegen die heterozygote Genfrequenz T/C zeigte keine herausragende Diskrepanz (OR=0.939; p=0.874). Der Vergleich der beiden Homozygoten TT und CC führte ebenfalls zu keinem statistisch signifikantem Ergebnis (OR=0.874; p=0.671) (vgl. Tabelle 14). Abbildung 22 zeigt eine graphische Darstellung der Ergebnisse.

SNP 676	Homozygot T/T	Heterozygot T/C	Homozygot C/C	Gesamt
Gesunde	105 (42,0%)	131 (52,4%)	14 (5,6%)	250 (100%)
Mammacarcinom	113 (45,2%)	123 (49,2%)	14 (5,6%)	250 (100%)
Gesamt	218 (43,6%)	254 (50,8%)	28 (5,6%)	500 (100%)

Tabelle 14: Prozentuale und absolute Genotypfrequenzen von SNP 676 für die gesunde Kontrollgruppe und die Mammacarcinomgruppe. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden.



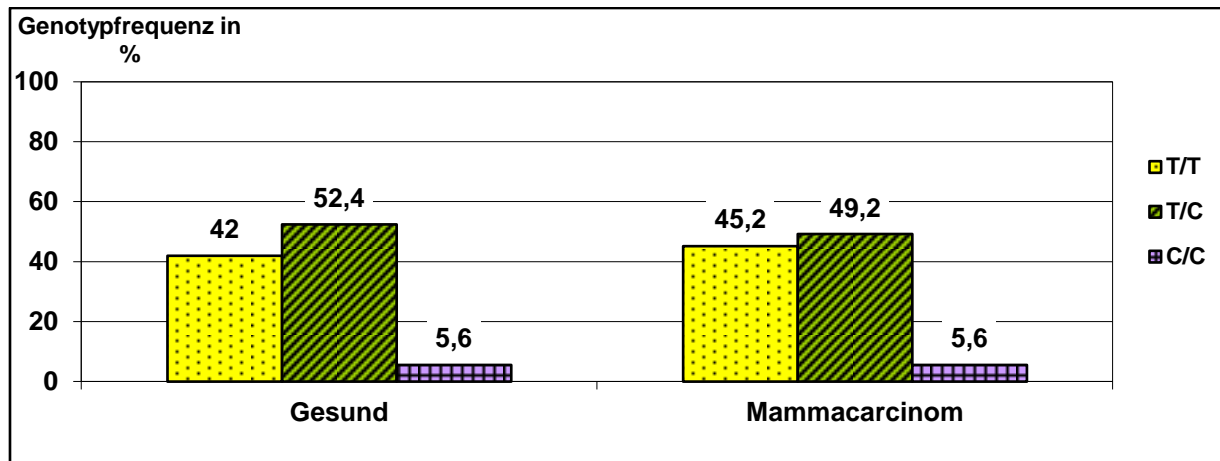


Abbildung 23: Prozentuale Verteilung der Genotypfrequenzen zwischen Mammacarcinomgruppe und gesunder Kontrollgruppe für SNP 676.

#### 4.4 Allelpositivitätsanalyse zwischen gesunder Kontrollgruppe und der Mammacarcinomgruppe

##### 4.4.1 Allelpositivität für SNP 845

Zur Analyse der C-Allelpositivität wurden nun alle C-Allel-positiven Frauen (C/C und C/T) den C-Allel-negativen Frauen (T/T) bei SNP 845 gegenübergestellt und verglichen. Es ergab sich keine statistische Relevanz ( $OR=0.974$ ;  $p=1.000$ ). (vgl. Tabelle 15 und Abbildung 23).

SNP 845	C/C und C/T	T/T	Gesamt
Gesunde	149 (74,1%)	52 (25,9%)	201 (100%)
Mammacarcinom	150 (74,6%)	51 (25,4%)	201 (100%)
Gesamt	299 (74,4%)	103 (25,6%)	402 (100%)

Tabelle 15: Prozentuale und absolute Häufigkeit der C-Allel-positiven und der C-Allel-negativen Patientinnen. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der gesunden Kontrollgruppe und der Mammacarcinomgruppe festgestellt werden.

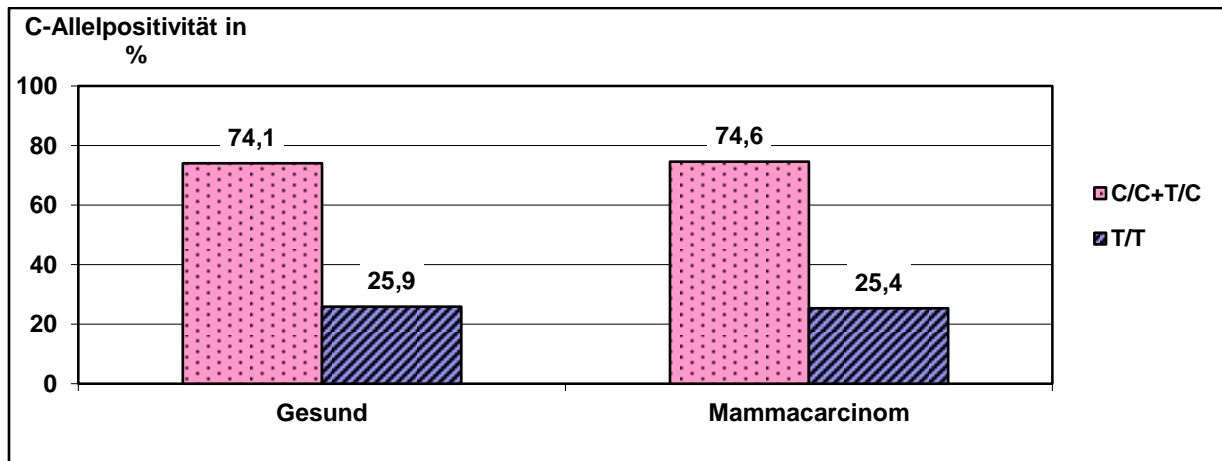


Abbildung 24: C-Allelpositivität in Prozent von SNP 845 zwischen gesunder Kontrollgruppe und der Mammacarcinomgruppe.

Zur Analyse der T-Allelpositivität von SNP 845 wurden nun alle T-Allel-positiven Frauen (T/T und C/T) mit den T-Allel-negativen Frauen verglichen. Es stellte sich kein signifikanter Unterschied heraus (Odds ratio=0.971; p=1.000). (vgl. Tabelle 16 und Abbildung 24).

SNP 845	T/T und T/C	C/C	Gesamt
Gesunde	166 (82,6%)	35 (17,4%)	201 (100%)
Mammacarcinom	171 (85,1%)	30 (14,9%)	201 (100%)
Gesamt	337 (83,8%)	65 (16,2%)	402 (100%)

Tabelle 16: Vergleich von T-Allel positiven und T-Allel negativen Proben zwischen gesunder Kontrollgruppe und Mammacarcinom-Patientinnen. Es zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied der beiden Gruppen.

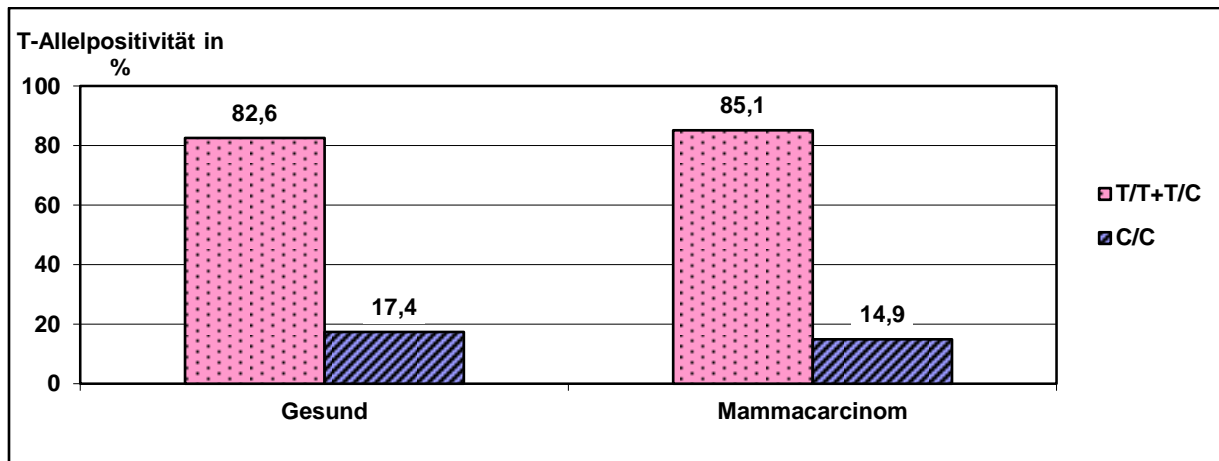


Abbildung 25: Vergleich der prozentualen Verteilung aller T-Allel positiven und aller T-Allel negativen Genotypen bei Kontrollgruppe und Mammacarcinomgruppe.

#### 4.4.2 Allelpositivität für SNP 676

Zur Analyse der C-Allelpositivität bei SNP 676 wurden wieder die C-Allelträger (C/C und C/T) in einer Gruppe zusammengefasst und den homozygoten T/T-Allelträgern gegenübergestellt. Bei dieser Analyse der C-Allelpositivität konnte kein signifikanter Unterschied gezeigt werden (OR=1.139; p=0.471). (vgl. Tabelle 17 und Abbildung 25).

SNP 676	C/C und C/T	T/T	Gesamt
Gesunde	145 (59,2%)	105 (40,8%)	250 (100%)
Mammacarcinom	137 (54,8%)	113 (45,2%)	250 (100%)
Gesamt	282 (56,4%)	218 (43,6%)	500 (100%)

Tabelle 17: Vergleich zwischen C-Allel positiven und C-Allel negativen Frauen in der gesunden Kontrollgruppe und der Mammacarcinomgruppe. Hierbei zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich der beiden Gruppen.

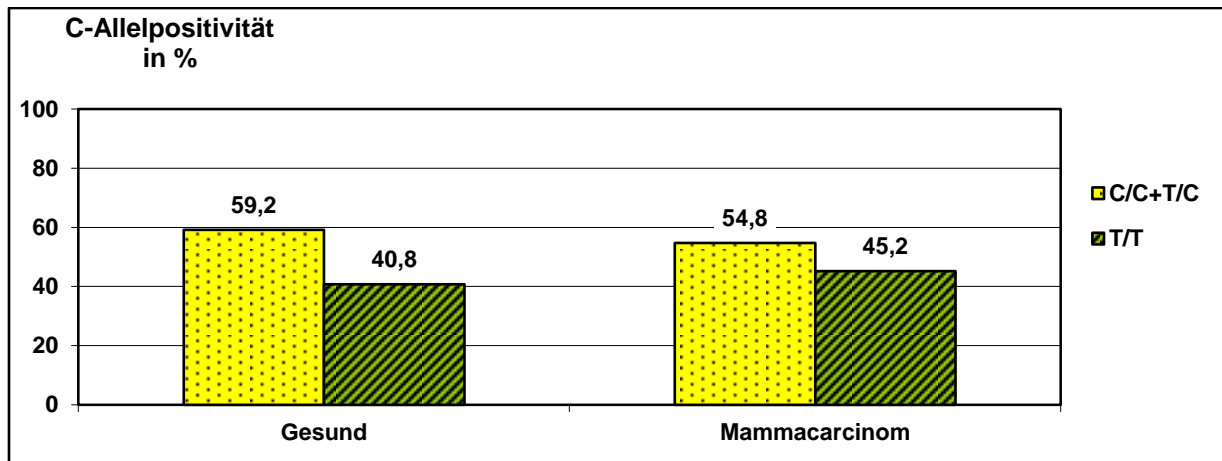


Abbildung 26: C-Allelpositivität im Vergleich von Mammacarcinom- und Kontrollgruppe von SNP 676 in Prozent.

Zur Analyse der T-Allelpositivität von SNP 676 wurden wiederum die Anzahl der T-Allel-positiven Proben (T/C und T/T) mit den T-Allel-negativen Proben (C/C) verglichen. Auch hierbei zeigte sich in der statistischen Analyse keine Signifikanz (OR=1.000; p=1.000). (vgl. Tabelle 18 und Abbildung 26).

SNP 676	T/T und T/C	C/C	Gesamt
Gesund	236 (94,4%)	14 (5,6%)	250 (100%)
Mammacarcinom	236 (94,4%)	14 (5,6%)	250 (100%)
Gesamt	471 (94,4%)	28 (5,6%)	500 (100%)

Tabelle 18: Vergleich zwischen T-Allel positiven Proben und T-Allel negativen Proben bei der gesunden Kontrollgruppe und den Mammacarcinomproben. Hierbei zeigte sich keine statistische Signifikanz.

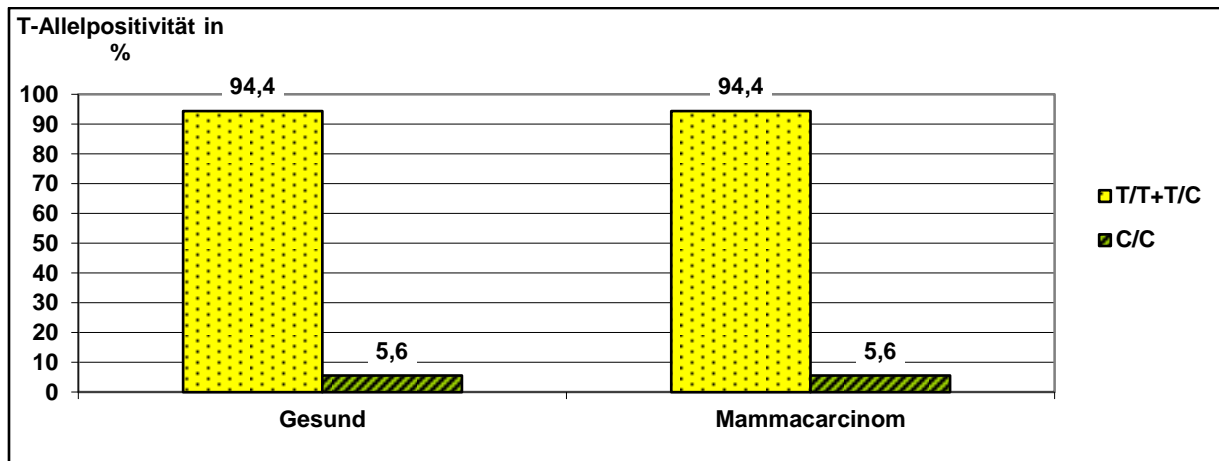


Abbildung 27: Prozentuale Verteilung der T-Allelpositivität zwischen Kontrollgruppe und Mammacarcinomgruppe bei SNP 676.

#### 4.5 Übersicht über die Ergebnisse der Analyse 1 für SNP 845 und SNP 676

Eine zusammenfassende Darstellung der Allelfrequenz-, Genotypfrequenz- und Allelpositivitätsanalyse der Analyse 1 von rs1937845 und rs3763676 zeigen die Tabellen 19 und 20. In der Analyse 1 wurde zur statistischen Analyse der Chi-Square-Test im 95% Confidence-Interval angewandt und die Odds Ratio und der p-Wert bestimmt. Statistisch relevant war ein p-Wert < 0.05. Daher zeigte sich im ersten Analyseschritt keine statistische Relevanz.

SNP 845	Allel-Untersuchung	Odds Ratio	p-Wert
Allelfrequenz	2xTT/TC ↔ CC	1,188	0,389
Allelfrequenz	2xCC/TC ↔ TT	0,997	0,988
Genotypfrequenz	T/T ↔ T/C	1,073	0,765
Genotypfrequenz	C/C ↔ T/C	1,228	0,464
Genotypfrequenz	T/T ↔ C/C	0,874	0,671
Allelpositivität	C/C+C/T ↔ T/T	0,974	1,0
Allelpositivität	T/T+C/T ↔ C/C	0,971	1,0

Tabelle 19: Ergebnisse der Signifikanz-Tests der Analyse 1 von SNP 845.

SNP 676	Allel-Untersuchung	Odds Ratio	p-Wert
Allelfrequenz	2xTT/TC $\leftrightarrow$ CC	1,023	0,933
Allelfrequenz	2xCC/TC $\leftrightarrow$ TT	0,882	0,400
Genotypfrequenz	T/T $\leftrightarrow$ T/C	0,872	0,460
Genotypfrequenz	C/C $\leftrightarrow$ T/C	0,939	0,874
Genotypfrequenz	T/T $\leftrightarrow$ C/C	0,874	0,671
Allelpositivität	C/C+C/T $\leftrightarrow$ T/T	1,139	0,471
Allelpositivität	T/T+C/T $\leftrightarrow$ C/C	1,0	1,0

Tabelle 20: Ergebnisse der Signifikanz-Tests der Analyse 1 von SNP 676.

#### 4.6 Analyse 2

In einem zweiten Schritt, der Subgruppenanalyse, wurden die Allelfrequenz, Allelpositivität und die Genotypfrequenz der beiden single nucleotide polymorphisms rs1937845 und rs3763676 nicht mehr hinsichtlich Mammacarcinomausprägung und gesunder Kontrollgruppe untersucht, sondern hinsichtlich ihrer klinisch-pathologischen Parameter. So wurden Mammacarcinomproben mit positivem Östrogenrezeptorstatus mit solchen, welche einen negativen Östrogenrezeptorstatus hatten, verglichen. Dasselbe wurde für Proben mit progesteron-positiven und -negativen Mammacarcinomproben, sowie Her2neu-Status und Lymphknotenstatus untersucht. Bei der Untersuchung des Lymphknotenstatus wurde N0, keine positiven Lymphknoten, mit N>0, verglichen. Die unterschiedlichen klinisch-pathologischen Parameter wurden auch untereinander verglichen. Auch in diesem Schritt der Analyse wurden der p-Wert und der Odds ratio im 95% Confidence-Interval hinsichtlich Genotypfrequenz, Allelfrequenz und Allelpositivität untersucht. Des Weiteren wurden die verschiedenen Subgruppen in einer weiteren Berechnung mit der gesunden Kontrollgruppe verglichen und hinsichtlich Allelfrequenz, Allelpositivität und Genotypfrequenz verglichen. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Analyse 2 tabellarisch gezeigt und signifikante Ergebnisse in den Tabellen farbig unterlegt. Die signifikante Ergebnisse werden zudem zusätzlich in Abbildungen in Kapitel 3.7.4 mittels Säulendiagrammen gezeigt. Das jeweilige Signifikanzniveau wurde nach Bonferroni berechnet. Die Ergebnisse wurden mithilfe der

Websites [www.quantitativeskills.com](http://www.quantitativeskills.com) und [www.medcalc.org](http://www.medcalc.org) berechnet. Bei Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht  $< 10$  wurde der Fisher's exact-Test angewandt.

#### 4.7 Subgruppenanalyse für SNP 845

##### 4.7.1 Numerische und prozentuale Übersicht der Subgruppen der Mammacarcinomproben bei SNP 845

In diesem Abschnitt werden die klinisch-pathologischen Parameter der Mammacarcinomproben von SNP 845 hinsichtlich ihrer statistischen Aussagekraft untersucht. Tabelle 21 zeigt die Parameter und ihre Häufigkeiten für die jeweiligen Allele.

SNP 845	Heterozygot TC	Homozygot TT	Homozygot CC	Gesamt
ER +	92 (59,7%)	37 (24,0%)	25 (16,3%)	154 (100%)
ER -	9 (34,6%)	11 (42,3%)	6 (23,1%)	26 (100%)
PR +	87 (64,0%)	27 (19,8%)	22 (17,2%)	136 (100%)
PR -	14 (33,3%)	20 (47,7%)	8 (19,0%)	42 (100%)
Her2-neu +	25 (55,6%)	14 (31,1%)	6 (13,3%)	45 (100%)
Her2-neu -	64 (55,6%)	30 (26,1%)	21 (18,3%)	115 (100%)
N 0	76 (57,1%)	35 (26,3%)	22 (16,6%)	133 (100%)
N>0	27 (57,5%)	12 (25,5%)	8 (17,0%)	47 (100%)

Tabelle 21: Numerische und prozentuale Häufigkeit der klinisch-pathologischen Parameter der Mammacarcinomproben von SNP 845.

##### 4.7.2 Multiple Comparison Analyse der klinisch-pathologischen Parameter untereinander bei SNP 845

Aus den 8 klinisch-pathologischen Parametern ergäben sich maximal 64 mögliche Kombinationen, würde jeder Parameter mit jedem verglichen. Wie im Kapitel 2.6 beschrieben

## Ergebnisse

können jedoch doppelte Vergleiche ausgeschlossen werden und die Anzahl der Untersuchungen reduziert sich somit auf 28. Das Signifikanzniveau sinkt hierbei nach Bonferroni auf  $\alpha = 0,05/28=0,00178$ . In den Tabellen 22-28 sind die Ergebnisse dargestellt. Unter der Nullhypothese, dass es keine Abhängigkeit gibt, wurden die Datensätze in den Tabellen 19-25 untersucht.

In den Tabellen 26, 28 und 29 konnten statistisch signifikante Abweichungen hiervon nachgewiesen werden. Die signifikanten Ergebnisse zunächst bei  $p<0,05$  und dann mit Bonferroni-Korrektur sind farbig hinterlegt. Dieses betrifft die C-Allelfrequenz, die C-Allelpositivität und die Genotypfrequenz hinsichtlich der Untersuchung von positivem Progesteronrezeptorstatus und negativem Progesteronrezeptorstatus in Mammacarcinomzellen. Des Weiteren konnte im Vergleich von negativem Progesteronrezeptorstatus und positiver Ausprägung des Östrogenrezeptors bei Mammacarcinomzellen in der Genotypfrequenzanalyse und in der C-Allelpositivität bei SNP 845 eine statistische Signifikanz aufgezeigt werden. Die statistisch signifikanten Ergebnisse der Subgruppenanalyse von SNP 845 werden, zusätzlich zu den farbigen Hinterlegungen in den Tabellen in diesem Kapitel, in Kapitel 3.7.4 in Form von Säulendiagrammen dargestellt.



SNP 845				
T-Allelfrequenz 2xTT/TC ↔ CC				
Untersuchung	Odds Ratio	p-Wert	Signifikanz 0,05	Signifikanz 0,00178
ER- ↔ ER+	0.77811	0.78461	H0	H0
PR+ ↔ ER+	0.96522	0.91024	H0	H0
PR+ ↔ ER-	1.2405	0.41809	H0	H0
PR- ↔ ER+	1.0166	0.58146	H0	H0
PR- ↔ ER-	1.3065	0.42979	H0	H0
PR- ↔ PR+	1.0532	0.5503	H0	H0
Her2-neu+ ↔ ER+	1.3303	0.36653	H0	H0
Her2-neu+ ↔ ER-	1.7097	0.28584	H0	H0
Her2-neu+ ↔ PR+	1.3783	0.34194	H0	H0
Her2-neu+ ↔ PR-	1.3086	0.42745	H0	H0
Her2-neu- ↔ ER+	0.88927	0.71279	H0	H0
Her2-neu- ↔ ER-	1.1429	0.48296	H0	H0
Her2-neu- ↔ PR+	0.92131	0.80323	H0	H0
Her2-neu- ↔ PR-	0.87478	0.692	H0	H0
Her2-neu- ↔ Her2-neu+	0.66846	0.85439	H0	H0
N0 ↔ ER+	0.99945	0.99861	H0	H0
N0 ↔ ER-	1.2845	0.39178	H0	H0
N0 ↔ PR+	1.0355	0.9143	H0	H0
N0 ↔ PR-	0.98316	0.59261	H0	H0
N0 ↔ Her2-neu+	0.75129	0.79035	H0	H0
N0 ↔ Her2-neu-	1.1239	0.72216	H0	H0
N>0 ↔ ER+	0.96009	0.63256	H0	H0
N>0 ↔ ER-	1.2339	0.46886	H0	H0
N>0 ↔ PR+	0.99468	0.60178	H0	H0
N>0 ↔ PR-	0.94444	0.64616	H0	H0
N>0 ↔ Her2-neu+	0.7217	0.80303	H0	H0
N>0 ↔ Her2-neu-	1.0796	0.52883	H0	H0
N>0 ↔ N0	0.96062	0.63206	H0	H0

Tabelle 22: Berechnete p-Werte für diverse klinische Parameter  
der T-Allelfrequenz bei SNP 845.

SNP 845				
C-Allelfrequenz 2xCC/TC ↔ TT				
Untersuchung	Odds Ratio	p-Wert	Signifikanz 0,05	Signifikanz 0,00178
ER- ↔ ER+	0.49744	0.088509	H0	H0
PR+ ↔ ER+	1.2642	0.40284	H0	H0
PR+ ↔ ER-	2.5414	0.025793	H1	H0
PR- ↔ ER+	0.39085	0.0051932	H1	H0
PR- ↔ ER-	0.78571	0.60836	H0	H0
PR- ↔ PR+	0.30916	0.00073481	H1	H1
Her2-neu+ ↔ ER+	0.68863	0.3038	H0	H0
Her2-neu+ ↔ ER-	1.3844	0.50335	H0	H0
Her2-neu+ ↔ PR+	0.54471	0.10516	H0	H0
Her2-neu+ ↔ PR-	1.7619	0.1821	H0	H0
Her2-neu- ↔ ER+	0.92066	0.7655	H0	H0
Her2-neu- ↔ ER-	1.8508	0.14445	H0	H0
Her2-neu- ↔ PR+	0.72824	0.28246	H0	H0
Her2-neu- ↔ PR-	2.3556	0.014411	H1	H0
Her2-neu- ↔ Her2-neu+	1.3369	0.43882	H0	H0
N0 ↔ ER+	0.89336	0.67201	H0	H0
N0 ↔ ER-	1.7959	0.15842	H0	H0
N0 ↔ PR+	0.70665	0.22288	H0	H0
N0 ↔ PR-	2.2857	0.015636	H1	H0
N0 ↔ Her2-neu+	1.2973	0.47858	H0	H0
N0 ↔ Her2-neu-	0.97035	0.91508	H0	H0
N>0 ↔ ER+	0.93369	0.85482	H0	H0
N>0 ↔ ER-	1.877	0.20031	H0	H0
N>0 ↔ PR+	0.73855	0.43474	H0	H0
N>0 ↔ PR-	2.3889	0.043234	H1	H0
N>0 ↔ Her2-neu+	1.3559	0.50065	H0	H0
N>0 ↔ Her2-neu-	1.0142	0.971	H0	H0
N>0 ↔ N0	1.0451	0.90721	H0	H0

Tabelle 23: Berechnete p-Werte für diverse klinische Parameter  
der C-Allelfrequenz bei SNP 845.

SNP 845				
T-Allelpositivität TT/TC ↔ CC				
Untersuchung	Odds Ratio	p-Wert	Signifikanz 0,05	Signifikanz 0,00178
ER- ↔ ER+	0.64599	0.87039	H0	H0
PR+ ↔ ER+	1.0042	0.98946	H0	H0
PR+ ↔ ER-	1.5545	0.27515	H0	H0
PR- ↔ ER+	0.82364	0.75193	H0	H0
PR- ↔ ER-	1.275	0.4582	H0	H0
PR- ↔ PR+	0.82018	0.75332	H0	H0
Her2-neu+ ↔ ER+	1.2597	0.4172	H0	H0
Her2-neu+ ↔ ER-	1.95	0.23133	H0	H0
Her2-neu+ ↔ PR+	1.2544	0.42398	H0	H0
Her2-neu+ ↔ PR-	1.5294	0.33248	H0	H0
Her2-neu- ↔ ER+	0.86748	0.66222	H0	H0
Her2-neu- ↔ ER-	1.3429	0.37437	H0	H0
Her2-neu- ↔ PR+	0.86383	0.66234	H0	H0
Her2-neu- ↔ PR-	1.0532	0.53846	H0	H0
Her2-neu- ↔ Her2-neu+	0.68864	0.83699	H0	H0
N0 ↔ ER+	0.9778	0.94402	H0	H0
N0 ↔ ER-	1.5136	0.29186	H0	H0
N0 ↔ PR+	0.97368	0.93553	H0	H0
N0 ↔ PR-	1.1872	0.4336	H0	H0
N0 ↔ Her2-neu+	0.77622	0.76862	H0	H0
N0 ↔ Her2-neu-	1.1272	0.72132	H0	H0
N>0 ↔ ER+	0.94477	0.64638	H0	H0
N>0 ↔ ER-	1.4625	0.36897	H0	H0
N>0 ↔ PR+	0.94079	0.64971	H0	H0
N>0 ↔ PR-	1.1471	0.50975	H0	H0
N>0 ↔ Her2-neu+	0.75	0.78238	H0	H0
N>0 ↔ Her2-neu-	1.0891	0.52376	H0	H0
N>0 ↔ N0	0.96622	0.62746	H0	H0

Tabelle 24: Berechnete p-Werte für diverse klinische Parameter der T-Allelpositivität bei SNP 845.

SNP 845				
C-Allelpositivität CC/TC ↔ TT				
Untersuchung	Odds Ratio	p-Wert	Signifikanz 0,05	Signifikanz 0,00178
ER- ↔ ER+	0.43124	0.051199	H0	H0
PR+ ↔ ER+	1.2767	0.39247	H0	H0
PR+ ↔ ER-	2.9605	0.013293	H1	H0
PR- ↔ ER+	0.34786	0.0028416	H1	H0
PR- ↔ ER-	0.80667	0.66912	H0	H0
PR- ↔ PR+	0.27248	0.00035961	H1	H1
Her2-neu+ ↔ ER+	0.70024	0.33822	H0	H0
Her2-neu+ ↔ ER-	1.6238	0.3413	H0	H0
Her2-neu+ ↔ PR+	0.54849	0.11783	H0	H0
Her2-neu+ ↔ PR-	2.013	0.11482	H0	H0
Her2-neu- ↔ ER+	0.89601	0.699	H0	H0
Her2-neu- ↔ ER-	2.0778	0.1	H0	H0
Her2-neu- ↔ PR+	0.70183	0.24016	H0	H0
Her2-neu- ↔ PR-	2.5758	0.010362	H1	H0
Her2-neu- ↔ Her2-neu+	1.2796	0.52223	H0	H0
N0 ↔ ER+	0.88547	0.65544	H0	H0
N0 ↔ ER-	2.0533	0.10003	H0	H0
N0 ↔ PR+	0.69358	0.20825	H0	H0
N0 ↔ PR-	2.5455	0.009524	H1	H0
N0 ↔ Her2-neu+	1.2645	0.53359	H0	H0
N0 ↔ Her2-neu-	0.98824	0.9674	H0	H0
N>0 ↔ ER+	0.92236	0.8333	H0	H0
N>0 ↔ ER-	2.1389	0.13954	H0	H0
N>0 ↔ PR+	0.72248	0.41245	H0	H0
N>0 ↔ PR-	2.6515	0.030183	H1	H0
N>0 ↔ Her2-neu+	1.3172	0.55244	H0	H0
N>0 ↔ Her2-neu-	1.0294	0.94168	H0	H0
N>0 ↔ N0	1.0417	0.91624	H0	H0

Tabelle 25: Berechnete p-Werte für diverse klinische Paramter der C-Allelpositivität bei SNP 845.

SNP 845				
Genotypfrequenz (Heterozygotenanalyse) TC ↔ TT				
Untersuchung	Odds Ratio	p-Wert	Signifikanz 0,05	Signifikanz 0,00178
ER- ↔ ER+	0.32905	0.0207	H1	H0
PR+ ↔ ER+	1.2959	0.37738	H0	H0
PR+ ↔ ER-	3.9383	0.0061906	H1	H0
PR- ↔ ER+	0.28152	0.0010429	H1	H1
PR- ↔ ER-	0.85556	0.7126	H0	H0
PR- ↔ PR+	0.21724	0.00011208	H1	H1
Her2-neu+ ↔ ER+	0.71817	0.39049	H0	H0
Her2-neu+ ↔ ER-	2.1825	0.12996	H0	H0
Her2-neu+ ↔ PR+	0.55419	0.13715	H0	H0
Her2-neu+ ↔ PR-	2.551	0.050135	H0	H0
Her2-neu- ↔ ER+	0.85797	0.60308	H0	H0
Her2-neu- ↔ ER-	2.6074	0.046666	H0	H0
Her2-neu- ↔ PR+	0.66207	0.18533	H0	H0
Her2-neu- ↔ PR-	3.0476	0.0058526	H1	H1
Her2-neu- ↔ Her2-neu+	1.1947	0.65676	H0	H0
N0 ↔ ER+	0.87329	0.63103	H0	H0
N0 ↔ ER-	2.654	0.040461	H1	H0
N0 ↔ PR+	0.67389	0.18779	H0	H0
N0 ↔ PR-	3.102	0.0041102	H1	H0
N0 ↔ Her2-neu+	1.216	0.61701	H0	H0
N0 ↔ Her2-neu-	1.0179	0.95313	H0	H0
N>0 ↔ ER+	0.90489	0.8016	H0	H0
N>0 ↔ ER-	2.75	0.064248	H0	H0
N>0 ↔ PR+	0.69828	0.38083	H0	H0
N>0 ↔ PR-	3.2143	0.015965	H1	H0
N>0 ↔ Her2-neu+	1.26	0.63095	H0	H0
N>0 ↔ Her2-neu-	1.0547	0.89704	H0	H0
N>0 ↔ N0	1.0362	0.92965	H0	H0

Tabelle 26:: Berechnete p-Werte für diverse klinische Paramter der Genotypfrequenz  
(Heterozygotenanalyse) bei SNP 845.

SNP 845				
Genotypfrequenz (Homozygotenanalyse) TT ↔ CC				
Untersuchung	Odds Ratio	p-Wert	Signifikanz 0,05	Signifikanz 0,00178
ER- ↔ ER+	1.2387	0.46663	H0	H0
PR+ ↔ ER+	0.82924	0.62807	H0	H0
PR+ ↔ ER-	0.66942	0.835	H0	H0
PR- ↔ ER+	1.6892	0.20283	H0	H0
PR- ↔ ER-	1.3636	0.44035	H0	H0
PR- ↔ PR+	2.037	0.12047	H0	H0
Her2-neu+ ↔ ER+	1.5766	0.28996	H0	H0
Her2-neu+ ↔ ER-	1.2727	0.50239	H0	H0
Her2-neu+ ↔ PR+	1.9012	0.192	H0	H0
Her2-neu+ ↔ PR-	0.93333	0.66799	H0	H0
Her2-neu- ↔ ER+	0.96525	0.92675	H0	H0
Her2-neu- ↔ ER-	0.77922	0.76082	H0	H0
Her2-neu- ↔ PR+	1.164	0.70708	H0	H0
Her2-neu- ↔ PR-	0.57143	0.91358	H0	H0
Her2-neu- ↔ Her2-neu+	0.61224	0.8745	H0	H0
N0 ↔ ER+	1.0749	0.84741	H0	H0
N0 ↔ ER-	0.86777	0.69859	H0	H0
N0 ↔ PR+	1.2963	0.51153	H0	H0
N0 ↔ PR-	0.63636	0.87568	H0	H0
N0 ↔ Her2-neu+	0.68182	0.83048	H0	H0
N0 ↔ Her2-neu-	1.1136	0.78452	H0	H0
N>0 ↔ ER+	1.0135	0.59655	H0	H0
N>0 ↔ ER-	0.81818	0.73608	H0	H0
N>0 ↔ PR+	1.2222	0.46038	H0	H0
N>0 ↔ PR-	0.6	0.87235	H0	H0
N>0 ↔ Her2-neu+	0.64286	0.83987	H0	H0
N>0 ↔ Her2-neu-	1.05	0.57311	H0	H0
N>0 ↔ N0	0.94286	0.64973	H0	H0

Tabelle 27: Berechnete p-Werte für diverse klinische Parameter der Genotypfrequenz (Homozygotenanalyse) bei SNP 845.

SNP 845				
Genotypfrequenz (Heterozygotenanalyse) CC ↔ TC				
Untersuchung	Odds Ratio	p-Wert	Signifikanz 0,05	Signifikanz 0,00178
ER- ↔ ER+	1.2387	0.46663	H0	H0
PR+ ↔ ER+	0.82924	0.62807	H0	H0
PR+ ↔ ER-	0.66942	0.835	H0	H0
PR- ↔ ER+	1.6892	0.20283	H0	H0
PR- ↔ ER-	1.3636	0.44035	H0	H0
PR- ↔ PR+	2.037	0.12047	H0	H0
Her2-neu+ ↔ ER+	1.5766	0.28996	H0	H0
Her2-neu+ ↔ ER-	1.2727	0.50239	H0	H0
Her2-neu+ ↔ PR+	1.9012	0.192	H0	H0
Her2-neu+ ↔ PR-	0.93333	0.66799	H0	H0
Her2-neu- ↔ ER+	0.96525	0.92675	H0	H0
Her2-neu- ↔ ER-	0.77922	0.76082	H0	H0
Her2-neu- ↔ PR+	1.164	0.70708	H0	H0
Her2-neu- ↔ PR-	0.57143	0.91358	H0	H0
Her2-neu- ↔ Her2-neu+	0.61224	0.8745	H0	H0
N0 ↔ ER+	1.0749	0.84741	H0	H0
N0 ↔ ER-	0.86777	0.69859	H0	H0
N0 ↔ PR+	1.2963	0.51153	H0	H0
N0 ↔ PR-	0.63636	0.87568	H0	H0
N0 ↔ Her2-neu+	0.68182	0.83048	H0	H0
N0 ↔ Her2-neu-	1.1136	0.78452	H0	H0
N>0 ↔ ER+	1.0135	0.59655	H0	H0
N>0 ↔ ER-	0.81818	0.73608	H0	H0
N>0 ↔ PR+	1.2222	0.46038	H0	H0
N>0 ↔ PR-	0.6	0.87235	H0	H0
N>0 ↔ Her2-neu+	0.64286	0.83987	H0	H0
N>0 ↔ Her2-neu-	1.05	0.57311	H0	H0
N>0 ↔ N0	0.94286	0.64973	H0	H0

Tabelle 28: Berechnete p-Werte für diverse klinische Parameter der Genotypfrequenz (Heterozygotenanalyse) bei SNP 845.

#### 4.7.3 Multiple Comparison Analyse zwischen den klinisch-pathologischen Parametern versus Gesunde bei SNP 845

In diesem Abschnitt sind die 8 klinisch-pathologischen Parameter der Mammacarcinomzellen mit gesunden Zellen hinsichtlich der Allelfrequenz, Allelpositivität und der Genotypfrequenz verglichen. Eine Korrektur des Konfidenzintervalls nach Bonferroni ergibt einer Verminderung auf  $\alpha = 0,05/8 = 0,00625$ . Die Ergebnisse werden in den Tabellen 26-32 gezeigt. Signifikante Ergebnisse sind in den Tabellen 29 und 30 zwischen gesunder Kontrollgruppe und Mammacarcinomzellen mit negativem Progesteronrezeptorstatus bei der C-Allelpositivität und der Genotypfrequenz dargestellt. In Kapitel 3.7.4 werden die signifikanten Ergebnisse von SNP 845 im Vergleich der klinisch-pathologischen Parameter versus der gesunden Kontrollgruppe in Form von Säulendiagrammen nochmals übersichtlich abgebildet.

SNP 845				
T-Allelfrequenz 2xTT/TC ↔ CC				
Untersuchung	Odds Ratio	p-Wert	Signifikanz 0,05	Signifikanz 0,00625
Gesunde ↔ ER+	0.93804	0.82016	H0	H0
Gesunde ↔ ER-	1.2055	0.42837	H0	H0
Gesunde ↔ PR+	0.97183	0.92225	H0	H0
Gesunde ↔ PR-	0.92275	0.64451	H0	H0
Gesunde ↔ Her2-neu+	0.70512	0.83209	H0	H0
Gesunde ↔ Her2-neu-	1.0548	0.85784	H0	H0
Gesunde ↔ N0	0.93855	0.82824	H0	H0
Gesunde ↔ N>0	0.97703	0.59255	H0	H0

Tabelle 29: Berechnete p-Werte im Vergleich von klinisch-pathologischen Parametern versus Gesunden in der T-Allelfrequenz bei SNP 845.



SNP 845				
C-Allelfrequenz 2xCC/TC ↔ TT				
Untersuchung	Odds Ratio	p-Wert	Signifikanz 0,05	Signifikanz 0,00625
Gesunde ↔ ER+	0.92199	0.7375	H0	H0
Gesunde ↔ ER-	1.8535	0.12237	H0	H0
Gesunde ↔ PR+	0.7293	0.22952	H0	H0
Gesunde ↔ PR-	2.359	0.0078392	H1	H0
Gesunde ↔ Her2-neu+	1.3389	0.40448	H0	H0
Gesunde ↔ Her2-neu-	1.0015	0.99554	H0	H0
Gesunde ↔ N0	1.0321	0.89883	H0	H0
Gesunde ↔ N>0	0.98748	0.97225	H0	H0

Tabelle 30: Berechnete p-Werte im Vergleich von klinisch-pathologischen Parametern versus Gesunden in der C-Allelfrequenz bei SNP 845.

SNP 845				
T-Allelpositivität TT/TC ↔ CC				
Untersuchung	Odds Ratio	p-Wert	Signifikanz 0,05	Signifikanz 0,00625
Gesunde ↔ ER+	0.91916	0.76891	H0	H0
Gesunde ↔ ER-	1.4229	0.31881	H0	H0
Gesunde ↔ PR+	0.91529	0.76642	H0	H0
Gesunde ↔ PR-	1.116	0.47527	H0	H0
Gesunde ↔ Her2-neu+	0.72967	0.80998	H0	H0
Gesunde ↔ Her2-neu-	1.0596	0.84937	H0	H0
Gesunde ↔ N0	0.94003	0.8358	H0	H0
Gesunde ↔ N>0	0.97289	0.5986	H0	H0

Tabelle 31: Berechnete p-Werte im Vergleich von klinisch-pathologischen Parametern versus Gesunden in der T-Allelpositivität bei SNP 845.

SNP 845				
C-Allelpositivität CC/TC ↔ TT				
Untersuchung	Odds Ratio	p-Wert	Signifikanz 0,05	Signifikanz 0,00625
Gesunde ↔ ER+	0.90615	0.69105	H0	H0
Gesunde ↔ ER-	2.1013	0.07819	H0	H0
Gesunde ↔ PR+	0.70977	0.20077	H0	H0
Gesunde ↔ PR-	2.6049	0.0049959	H1	H1
Gesunde ↔ Her2-neu+	1.294	0.47326	H0	H0
Gesunde ↔ Her2-neu-	1.0113	0.96634	H0	H0
Gesunde ↔ N0	1.0234	0.9277	H0	H0
Gesunde ↔ N>0	0.98242	0.96189	H0	H0

Tabelle 32: Berechnete p-Werte im Vergleich von klinisch-pathologischen Parametern versus Gesunden in der C-Allelpositivität bei SNP 845.

SNP 845				
Genotypfrequenz (Heterozygotenanalyse) TC ↔ TT				
Untersuchung	Odds Ratio	p-Wert	Signifikanz 0,05	Signifikanz 0,00625
Gesunde ↔ ER+	0.88169	0.62369	H0	H0
Gesunde ↔ ER-	2.6795	0.033664	H1	H0
Gesunde ↔ PR+	0.68037	0.16277	H0	H0
Gesunde ↔ PR-	3.1319	0.0023401	H1	H1
Gesunde ↔ Her2-neu+	1.2277	0.58237	H0	H0
Gesunde ↔ Her2-neu-	1.0276	0.9217	H0	H0
Gesunde ↔ N0	1.0096	0.97109	H0	H0
Gesunde ↔ N>0	0.97436	0.94623	H0	H0

Tabelle 33: Berechnete p-Werte im Vergleich von klinisch-pathologischen Parametern versus Gesunden in der Genotypfrequenz (Heterozygotenanalyse) bei SNP 845.

SNP 845				
Genotypfrequenz (Homozygotenanalyse) TT ↔ CC				
Untersuchung	Odds Ratio	p-Wert	Signifikanz 0,05	Signifikanz 0,00625
Gesunde ↔ ER+	1.0039	0.99093	H0	H0
Gesunde ↔ ER-	0.81039	0.73979	H0	H0
Gesunde ↔ PR+	1.2106	0.59633	H0	H0
Gesunde ↔ PR-	0.59429	0.91044	H0	H0
Gesunde ↔ Her2-neu+	0.63673	0.86582	H0	H0
Gesunde ↔ Her2-neu-	1.04	0.91296	H0	H0
Gesunde ↔ N0	0.93388	0.8446	H0	H0
Gesunde ↔ N>0	0.99048	0.60299	H0	H0

Tabelle 34: Berechnete p-Werte im Vergleich von klinisch-pathologischen Parametern versus Gesunden in der Genotypfrequenz (Homozygotenanalyse) bei SNP 845.

SNP 845				
Genotypfrequenz (Heterozygotenanalyse) CC ↔ TC				
Untersuchung	Odds Ratio	p-Wert	Signifikanz 0,05	Signifikanz 0,00625
Gesunde ↔ ER+	1.1298	0.681	H0	H0
Gesunde ↔ ER-	0.46053	0.95196	H0	H0
Gesunde ↔ PR+	1.2141	0.52717	H0	H0
Gesunde ↔ PR-	0.53728	0.93681	H0	H0
Gesunde ↔ Her2-neu+	1.2792	0.40654	H0	H0
Gesunde ↔ Her2-neu-	0.93567	0.83393	H0	H0
Gesunde ↔ N0	1.0606	0.84934	H0	H0
Gesunde ↔ N>0	1.0362	0.56605	H0	H0

Tabelle 35: Berechnete p-Werte im Vergleich von klinisch-pathologischen Parametern versus Gesunden in der Genotypfrequenz (Heterozygotenanalyse) bei SNP 845.

#### 4.7.4 Signifikante Ergebnisse der Subgruppenanalyse von SNP 845

In diesem Kapitel sollen nochmals zusammenfassend die signifikanten Ergebnisse von SNP 845, zum einen der Vergleich der klinisch-pathologischen Parameter untereinander, zum anderen der Vergleich der klinisch-pathologischen Parameter versus der gesunden Kontrollgruppe, übersichtlich in Abbildungen dargestellt werden. (vgl. Abbildungen 19-24).

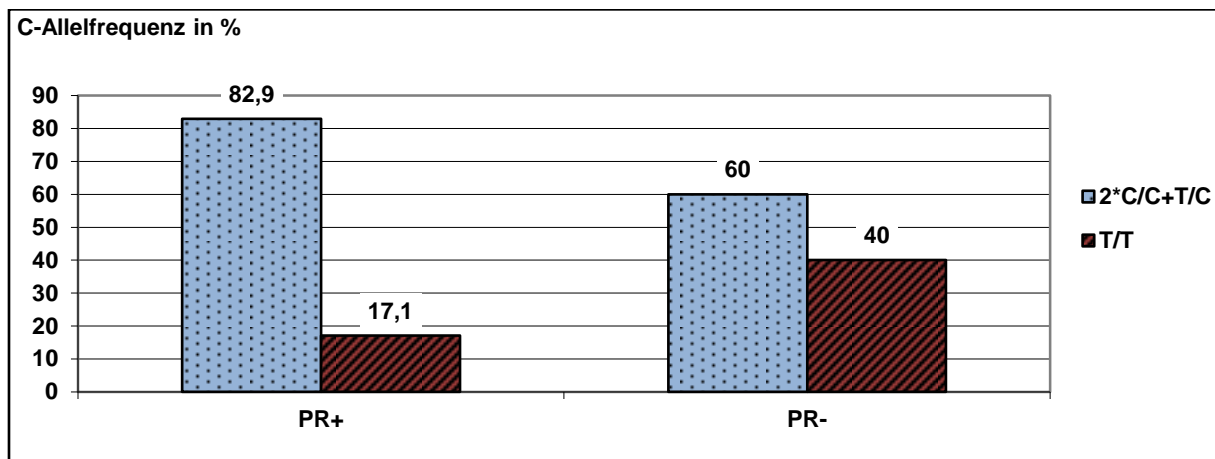
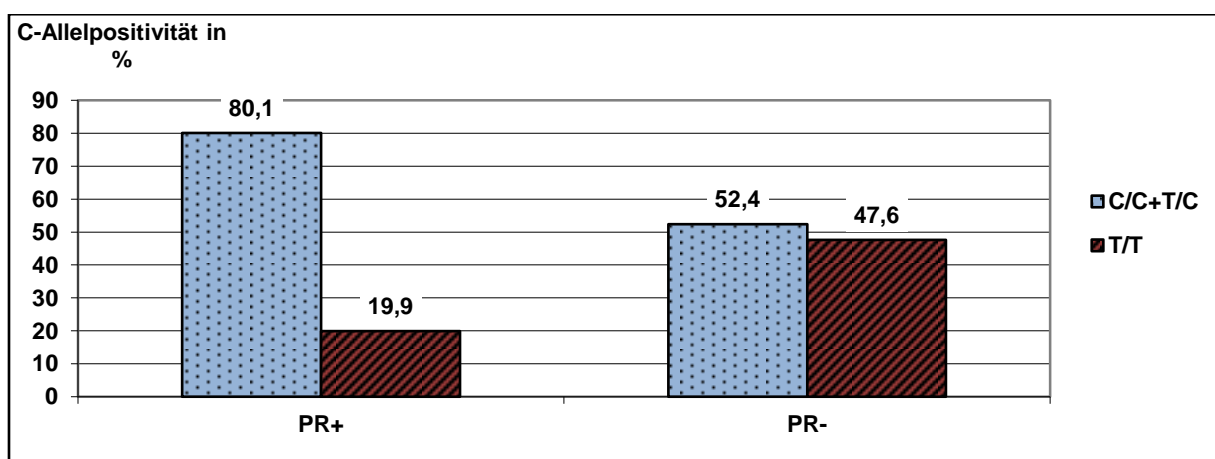


Abbildung 28: Prozentuale Verteilung der C-Allelfrequenz zwischen Mammacarcinomzellen mit positivem Progesteronrezeptorstatus und Mammacarcinomzellen mit negativem Progesteronrezeptorstatus bei SNP 845 (OR=0.309; p=0.00073).



## Ergebnisse

Abbildung 29: Prozentuale Verteilung der C-Allelpositivität zwischen Mammacarcinomzellen mit positivem im Vergleich zu negativem Progesteronrezeptorstatus bei SNP 845 (OR=0.272;  $p=0,00036$ ).

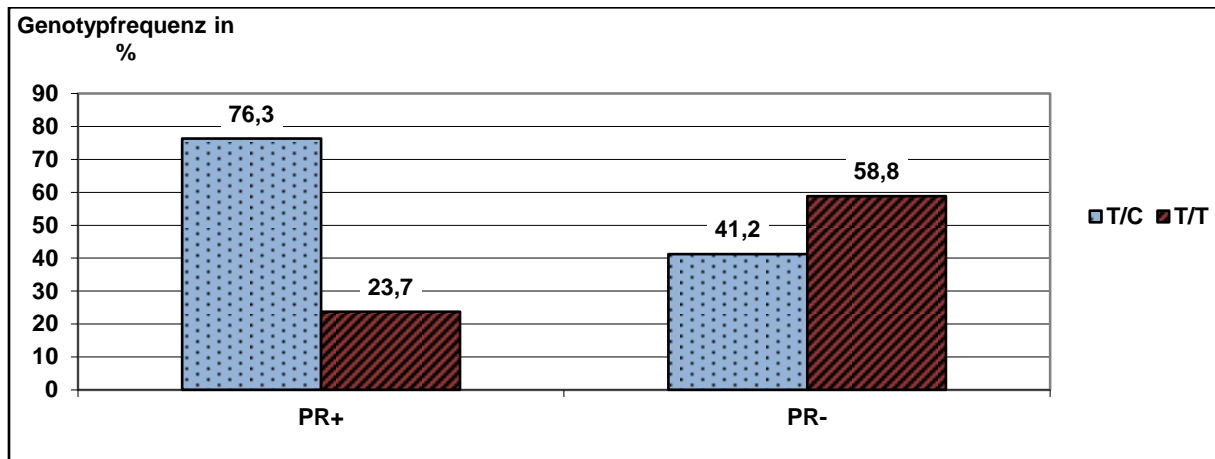


Abbildung 30: Prozentuale Verteilung der Genotypfrequenz zwischen Mammacarcinomzellen mit positivem im Vergleich zu negativem Progesteronrezeptorstatus bei SNP 845 (OR=0.217;  $p=0.00011$ ).

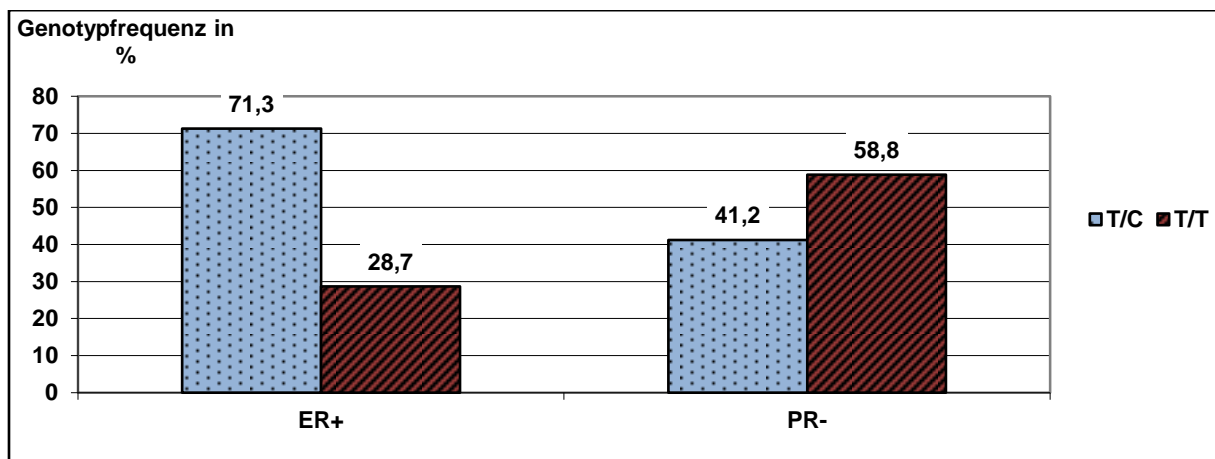


Abbildung 31: Prozentuale Verteilung der Genotypfrequenz zwischen Mammacarcinomzellen mit positivem Östrogenrezeptorstatus im Vergleich zu negativem Progesteronrezeptorstatus bei SNP 845 (OR=0.281;  $p=0.00104$ ).

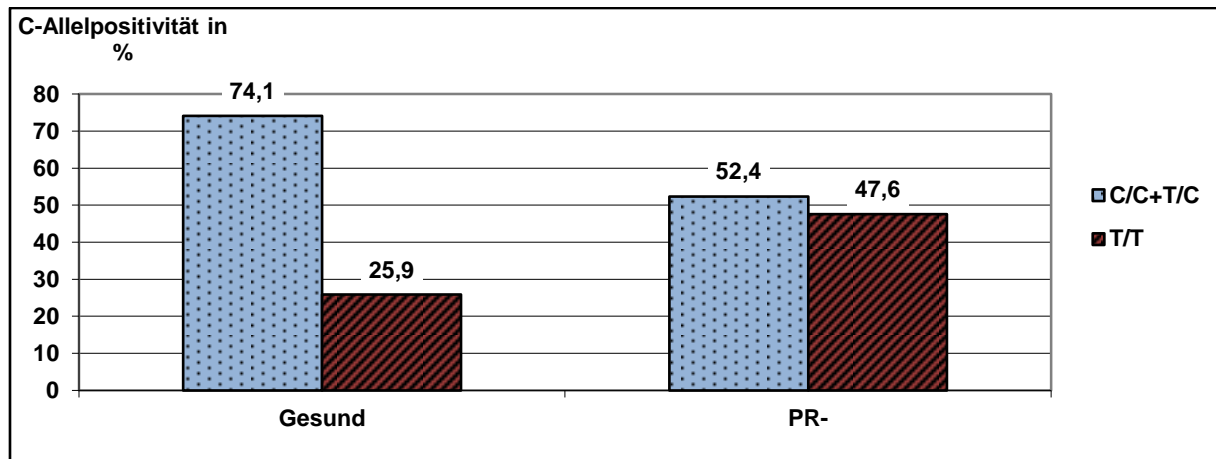


Abbildung 32: Prozentuale Verteilung der C-Allelpositivität zwischen Kontrollgruppe und Mammacarcinomgruppe mit negativem Progesteronrezeptorstatus bei SNP 845 (OR=2.604;  $p=0.00500$ ).

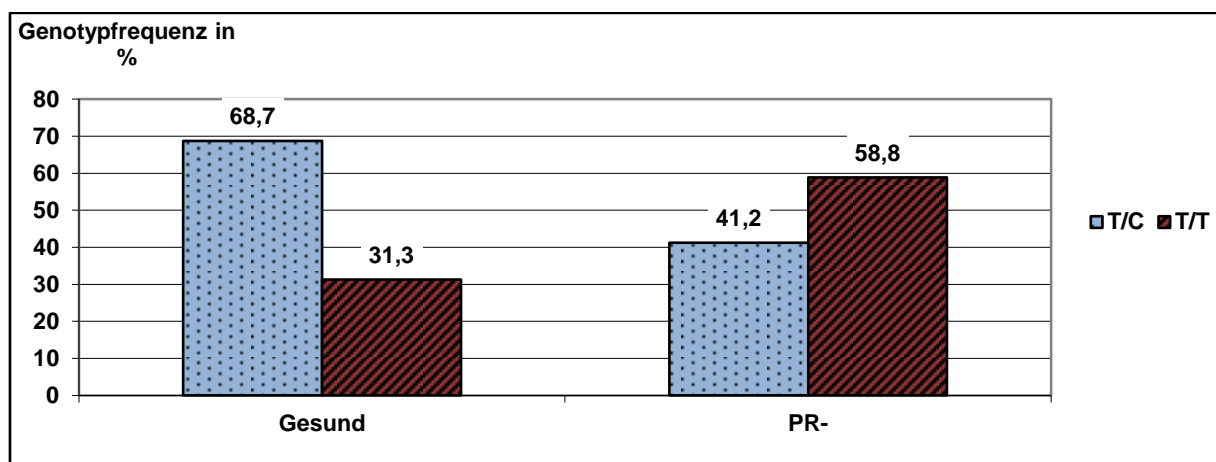


Abbildung 33: Prozentuale Verteilung der Genotypfrequenz (Heterozygotenanalyse) zwischen Kontrollgruppe und Mammacarcinomgruppe mit negativem Progesteronrezeptorstatus bei SNP 845 (OR=3.131;  $p=0.00234$ ).

#### 4.8 Subgruppenanalyse für SNP 676

##### 4.8.1 Numerische und prozentuale Übersicht der Subgruppen der Mammacarcinomproben für SNP 676

In diesem Abschnitt werden die klinisch-pathologischen Parameter, wie auch beim SNP 845, der Mammacarcinomproben von SNP 676 hinsichtlich ihrer statistischen Aussagekraft untersucht. Tabelle 36 zeigt die Parameter und ihre Häufigkeiten für die jeweiligen Allele.

SNP 676	Heterozygot TC	Homozygot TT	Homozygot CC	Gesamt
ER +	103 (49,8%)	92 (44,4%)	12 (5,8%)	207 (100%)
ER -	14 (48,3%)	13 (44,8%)	2 (6,9%)	29 (100%)
PR +	93 (50,5%)	82 (44,6%)	9 (4,9%)	184 (100%)
PR -	22 (43,1%)	24 (47,1%)	5 (9,8%)	51 (100%)
Her2-neu +	24 (63,2%)	14 (36,8%)	0 (0%)	38 (100%)
Her2-neu -	78 (45,5%)	77 (46,1%)	14 (8,4%)	167 (100%)
N 0	83 (49,4%)	75 (44,6%)	10 (6,0%)	168 (100%)
N>0	27 (44,3%)	30 (49,2%)	4 (6,5%)	61 (100%)

Tabelle 36: Numerische und prozentuale Häufigkeit der klinisch-pathologischen Parameter der Mammacarcinomproben von SNP 845.

##### 4.8.2 Multiple Comparison Analyse der klinisch-pathologischen Parameter untereinander von SNP 676

Die Multiple Comparison Analyse der klinisch-pathologischen Parameter untereinander erfolgte wie bereits im Kapitel 3.7.2 für SNP 845 beschrieben. Es wurden die 8 klinisch-pathologischen Parameter untereinander hinsichtlich der Allelfrequenz, der Allelpositivität und der Genotypfrequenz untersucht. Das Signifikanzniveau ist hierbei nach Bonferroni auf  $\alpha = 0,05/28=0,00178$  reduziert (vgl. Kapitel 3.7.2). Die Ergebnisse der statistischen Analysen stehen in den Tabellen 34-40. Des Weiteren ist Her2-neu+ für die Homozygote CC null-fach detektiert worden. Eine Berechnung der Odds Ratio ist hiermit nicht möglich und in den

## Ergebnisse

Tabellen erfolgt keine Angabe von Parametern. Um Vollständigkeit zu gewährleisten wurde dieser Parameter trotzdem mit in die Berechnungen einbezogen, wobei die statistische Signifikanz der übrigen Parameter hiervon nicht betroffen ist, wie in einer separaten Studie ohne Hern2-neu+ überprüft wurde. Es konnten hierbei keine signifikanten Ergebnisse ausgemacht werden (vgl. Tabellen 34-40).



SNP 676				
T-Allelfrequenz 2xTT/TC ↔ CC				
Untersuchung	Odds Ratio	p-Wert	Signifikanz 0,05	Signifikanz 0,00178
ER- ↔ ER+	0.83624	0.75858	H0	H0
PR+ ↔ ER+	1.194	0.43343	H0	H0
PR+ ↔ ER-	1.4278	0.45679	H0	H0
PR- ↔ ER+	0.58537	0.89825	H0	H0
PR- ↔ ER-	0.7	0.78945	H0	H0
PR- ↔ PR+	0.49027	0.93792	H0	H0
Her2-neu+ ↔ ER+	-	-	-	-
Her2-neu+ ↔ ER-	-	-	-	-
Her2-neu+ ↔ PR+	-	-	-	-
Her2-neu+ ↔ PR-	-	-	-	-
Her2-neu- ↔ ER+	0.69288	0.3605	H0	H0
Her2-neu- ↔ ER-	0.82857	0.70852	H0	H0
Her2-neu- ↔ PR+	0.58032	0.92996	H0	H0
Her2-neu- ↔ PR-	1.1837	0.46857	H0	H0
Her2-neu- ↔ Her2-neu+	-	-	-	-
N0 ↔ ER+	0.97422	0.95235	H0	H0
N0 ↔ ER-	1.165	0.55062	H0	H0
N0 ↔ PR+	0.81595	0.74833	H0	H0
N0 ↔ PR-	1.6643	0.26417	H0	H0
N0 ↔ Her2-neu+	-	-	-	-
N0 ↔ Her2-neu-	1.406	0.41996	H0	H0
N>0 ↔ ER+	0.90941	0.69166	H0	H0
N>0 ↔ ER-	1.0875	0.61792	H0	H0
N>0 ↔ PR+	0.76167	0.78497	H0	H0
N>0 ↔ PR-	1.5536	0.37999	H0	H0
N>0 ↔ Her2-neu+	-	-	-	-
N>0 ↔ Her2-neu-	1.3125	0.43709	H0	H0
N>0 ↔ N0	0.93348	0.67526	H0	H0

Tabelle 37: Berechnete p-Werte für diverse klinische-pathologische Parameter  
der T-Allelfrequenz bei SNP 676.

SNP 676				
C-Allelfrequenz 2xCC/TC ↔ TT				
Untersuchung	Odds Ratio	p-Wert	Signifikanz 0,05	Signifikanz 0,00178
ER- ↔ ER+	1.003	0.9938	H0	H0
PR+ ↔ ER+	0.9806	0.92193	H0	H0
PR+ ↔ ER-	0.97764	0.954	H0	H0
PR- ↔ ER+	0.96588	0.90871	H0	H0
PR- ↔ ER-	0.96296	0.93363	H0	H0
PR- ↔ PR+	0.98498	0.96067	H0	H0
Her2-neu+ ↔ ER+	1.2418	0.55032	H0	H0
Her2-neu+ ↔ ER-	1.2381	0.66631	H0	H0
Her2-neu+ ↔ PR+	1.2664	0.51866	H0	H0
Her2-neu+ ↔ PR-	1.2857	0.55977	H0	H0
Her2-neu- ↔ ER+	0.99724	0.98913	H0	H0
Her2-neu- ↔ ER-	0.99423	0.98827	H0	H0
Her2-neu- ↔ PR+	1.017	0.93581	H0	H0
Her2-neu- ↔ PR-	1.0325	0.91758	H0	H0
Her2-neu- ↔ Her2-neu+	0.80303	0.55077	H0	H0
N0 ↔ ER+	0.99486	0.97987	H0	H0
N0 ↔ ER-	0.99185	0.98345	H0	H0
N0 ↔ PR+	1.0145	0.94531	H0	H0
N0 ↔ PR-	1.03	0.92398	H0	H0
N0 ↔ Her2-neu+	0.80111	0.54735	H0	H0
N0 ↔ Her2-neu-	0.99761	0.99105	H0	H0
N>0 ↔ ER+	0.84514	0.55333	H0	H0
N>0 ↔ ER-	0.84259	0.69754	H0	H0
N>0 ↔ PR+	0.86186	0.60594	H0	H0
N>0 ↔ PR-	0.875	0.71605	H0	H0
N>0 ↔ Her2-neu+	0.68056	0.35662	H0	H0
N>0 ↔ Her2-neu-	0.84748	0.56858	H0	H0
N>0 ↔ N0	0.84951	0.5756	H0	H0

Tabelle 38: Berechnete p-Werte für die 8 klinisch-pathologischen Parameter  
der C-Allelfrequenz bei SNP 676.

SNP 676				
T-Allelpositivität TT/TC ↔ CC				
Untersuchung	Odds Ratio	p-Wert	Signifikanz 0,05	Signifikanz 0,00178
ER- ↔ ER+	0.83077	0.76086	H0	H0
PR+ ↔ ER+	1.1966	0.43357	H0	H0
PR+ ↔ ER-	1.4403	0.45701	H0	H0
PR- ↔ ER+	0.56615	0.90632	H0	H0
PR- ↔ ER-	0.68148	0.79915	H0	H0
PR- ↔ PR+	0.47314	0.94331	H0	H0
Her2-neu+ ↔ ER+	-	-	-	-
Her2-neu+ ↔ ER-	-	-	-	-
Her2-neu+ ↔ PR+	-	-	-	-
Her2-neu+ ↔ PR-	-	-	-	-
Her2-neu- ↔ ER+	0.68132	0.3444	H0	H0
Her2-neu- ↔ ER-	0.82011	0.71483	H0	H0
Her2-neu- ↔ PR+	0.56939	0.93429	H0	H0
Her2-neu- ↔ PR-	1.2034	0.46125	H0	H0
Her2-neu- ↔ Her2-neu+	-	-	-	-
N0 ↔ ER+	0.97231	0.94926	H0	H0
N0 ↔ ER-	1.1704	0.552	H0	H0
N0 ↔ PR+	0.81257	0.75057	H0	H0
N0 ↔ PR-	1.7174	0.25287	H0	H0
N0 ↔ Her2-neu+	-	-	-	-
N0 ↔ Her2-neu-	1.4271	0.40533	H0	H0
N>0 ↔ ER+	0.87692	0.71304	H0	H0
N>0 ↔ ER-	1.0556	0.63372	H0	H0
N>0 ↔ PR+	0.73286	0.8019	H0	H0
N>0 ↔ PR-	1.5489	0.38725	H0	H0
N>0 ↔ Her2-neu+	-	-	-	-
N>0 ↔ Her2-neu-	1.2871	0.45451	H0	H0
N>0 ↔ N0	0.9019	0.69586	H0	H0

Tabelle 39: Berechnete p-Werte für die klinisch-pathologischen Parameter der T-Allelpositivität bei  
SNP 676.

SNP 676				
C-Allelpositivität CC/TC ↔ TT				
Untersuchung	Odds Ratio	p-Wert	Signifikanz 0,05	Signifikanz 0,00178
ER- ↔ ER+	0.98462	0.96898	H0	H0
PR+ ↔ ER+	0.99512	0.98086	H0	H0
PR+ ↔ ER-	1.0107	0.97892	H0	H0
PR- ↔ ER+	0.9	0.73673	H0	H0
PR- ↔ ER-	0.91406	0.84742	H0	H0
PR- ↔ PR+	0.90441	0.75149	H0	H0
Her2-neu+ ↔ ER+	1.3714	0.3846	H0	H0
Her2-neu+ ↔ ER-	1.3929	0.50908	H0	H0
Her2-neu+ ↔ PR+	1.3782	0.38164	H0	H0
Her2-neu+ ↔ PR-	1.5238	0.33512	H0	H0
Her2-neu- ↔ ER+	0.95584	0.82842	H0	H0
Her2-neu- ↔ ER-	0.97078	0.94149	H0	H0
Her2-neu- ↔ PR+	0.96053	0.85083	H0	H0
Her2-neu- ↔ PR-	1.062	0.85088	H0	H0
Her2-neu- ↔ Her2-neu+	0.69697	0.3278	H0	H0
N0 ↔ ER+	0.992	0.96933	H0	H0
N0 ↔ ER-	1.0075	0.98526	H0	H0
N0 ↔ PR+	0.99686	0.98832	H0	H0
N0 ↔ PR-	1.1022	0.76141	H0	H0
N0 ↔ Her2-neu+	0.72333	0.38067	H0	H0
N0 ↔ Her2-neu-	1.0378	0.86535	H0	H0
N>0 ↔ ER+	0.82667	0.5139	H0	H0
N>0 ↔ ER-	0.83958	0.69925	H0	H0
N>0 ↔ PR+	0.83072	0.53062	H0	H0
N>0 ↔ PR-	0.91852	0.82294	H0	H0
N>0 ↔ Her2-neu+	0.60278	0.22956	H0	H0
N>0 ↔ Her2-neu-	0.86486	0.62722	H0	H0
N>0 ↔ N0	0.83333	0.54241	H0	H0

Tabelle 40: Berechnete p-Werte für die klinisch-pathologischen Parameter der C-Allelpositivität bei  
SNP 676.

SNP 676				
Genotypfrequenz (Heterozygotenanalyse) TC ↔ TT				
Untersuchung	Odds Ratio	p-Wert	Signifikanz 0,05	Signifikanz 0,00178
ER- ↔ ER+	0.96191	0.92472	H0	H0
PR+ ↔ ER+	1.013	0.95054	H0	H0
PR+ ↔ ER-	1.0531	0.90045	H0	H0
PR- ↔ ER+	0.81877	0.54198	H0	H0
PR- ↔ ER-	0.85119	0.73979	H0	H0
PR- ↔ PR+	0.80824	0.52068	H0	H0
Her2-neu+ ↔ ER+	1.5312	0.24172	H0	H0
Her2-neu+ ↔ ER-	1.5918	0.36202	H0	H0
Her2-neu+ ↔ PR+	1.5115	0.26073	H0	H0
Her2-neu+ ↔ PR-	1.8701	0.15997	H0	H0
Her2-neu- ↔ ER+	0.9048	0.64227	H0	H0
Her2-neu- ↔ ER-	0.94063	0.88339	H0	H0
Her2-neu- ↔ PR+	0.89317	0.60884	H0	H0
Her2-neu- ↔ PR-	1.1051	0.76618	H0	H0
Her2-neu- ↔ Her2-neu+	0.59091	0.15548	H0	H0
N0 ↔ ER+	0.98848	0.95689	H0	H0
N0 ↔ ER-	1.0276	0.94788	H0	H0
N0 ↔ PR+	0.97577	0.91116	H0	H0
N0 ↔ PR-	1.2073	0.57413	H0	H0
N0 ↔ Her2-neu+	0.64556	0.2375	H0	H0
N0 ↔ Her2-neu-	1.0925	0.69582	H0	H0
N>0 ↔ ER+	0.80388	0.46873	H0	H0
N>0 ↔ ER-	0.83571	0.70104	H0	H0
N>0 ↔ PR+	0.79355	0.44862	H0	H0
N>0 ↔ PR-	0.98182	0.96312	H0	H0
N>0 ↔ Her2-neu+	0.525	0.13054	H0	H0
N>0 ↔ Her2-neu-	0.88846	0.70288	H0	H0
N>0 ↔ N0	0.81325	0.5038	H0	H0

Tabelle 41: Berechnete p-Werte für die klinisch-pathologischen Parameter der Genotypfrequenz (Heterozygotenanalyse) bei SNP 676.

SNP 676				
Genotypfrequenz (Homozygotenanalyse) TT ↔ CC				
Untersuchung	Odds Ratio	p-Wert	Signifikanz 0,05	Signifikanz 0,00178
ER- ↔ ER+	0.84783	0.75174	H0	H0
PR+ ↔ ER+	1.1884	0.44654	H0	H0
PR+ ↔ ER-	1.4017	0.48298	H0	H0
PR- ↔ ER+	0.62609	0.86891	H0	H0
PR- ↔ ER-	0.73846	0.77333	H0	H0
PR- ↔ PR+	0.52683	0.91576	H0	H0
Her2-neu+ ↔ ER+	-	-	-	-
Her2-neu+ ↔ ER-	-	-	-	-
Her2-neu+ ↔ PR+	-	-	-	-
Her2-neu+ ↔ PR-	-	-	-	-
Her2-neu- ↔ ER+	0.71739	0.43056	H0	H0
Her2-neu- ↔ ER-	0.84615	0.70631	H0	H0
Her2-neu- ↔ PR+	0.60366	0.91008	H0	H0
Her2-neu- ↔ PR-	1.1458	0.50707	H0	H0
Her2-neu- ↔ Her2-neu+	-	-	-	-
N0 ↔ ER+	0.97826	0.96152	H0	H0
N0 ↔ ER-	1.1538	0.57008	H0	H0
N0 ↔ PR+	0.82317	0.73999	H0	H0
N0 ↔ PR-	1.5625	0.32079	H0	H0
N0 ↔ Her2-neu+	-	-	-	-
N0 ↔ Her2-neu-	1.3636	0.48437	H0	H0
N>0 ↔ ER+	0.97826	0.64767	H0	H0
N>0 ↔ ER-	1.1538	0.60535	H0	H0
N>0 ↔ PR+	0.82317	0.74451	H0	H0
N>0 ↔ PR-	1.5625	0.39638	H0	H0
N>0 ↔ Her2-neu+	-	-	-	-
N>0 ↔ Her2-neu-	1.3636	0.4227	H0	H0
N>0 ↔ N0	1	0.63505	H0	H0

Tabelle 42: Berechnete p-Werte für die klinisch-pathologischen Parameter der Genotypfrequenz (Homozygotenanalyse) bei SNP 676.

SNP 676				
Genotypfrequenz (Heterozygotenanalyse) CC ↔ TC				
Untersuchung	Odds Ratio	p-Wert	Signifikanz 0,05	Signifikanz 0,00178
ER- ↔ ER+	1.2262	0.53522	H0	H0
PR+ ↔ ER+	0.83065	0.73467	H0	H0
PR+ ↔ ER-	0.67742	0.82963	H0	H0
PR- ↔ ER+	1.9508	0.19712	H0	H0
PR- ↔ ER-	1.5909	0.47517	H0	H0
PR- ↔ PR+	2.3485	0.13822	H0	H0
Her2-neu+ ↔ ER+	-	-	-	-
Her2-neu+ ↔ ER-	-	-	-	-
Her2-neu+ ↔ PR+	-	-	-	-
Her2-neu+ ↔ PR-	-	-	-	-
Her2-neu- ↔ ER+	1.5406	0.3022	H0	H0
Her2-neu- ↔ ER-	1.2564	0.56493	H0	H0
Her2-neu- ↔ PR+	1.8547	0.12442	H0	H0
Her2-neu- ↔ PR-	0.78974	0.76683	H0	H0
Her2-neu- ↔ Her2-neu+	-	-	-	-
N0 ↔ ER+	1.0341	0.94091	H0	H0
N0 ↔ ER-	0.84337	0.75361	H0	H0
N0 ↔ PR+	1.245	0.41522	H0	H0
N0 ↔ PR-	0.53012	0.91539	H0	H0
N0 ↔ Her2-neu+	-	-	-	-
N0 ↔ Her2-neu-	0.67126	0.36619	H0	H0
N>0 ↔ ER+	1.2716	0.45369	H0	H0
N>0 ↔ ER-	1.037	0.6734	H0	H0
N>0 ↔ PR+	1.5309	0.35631	H0	H0
N>0 ↔ PR-	0.65185	0.82937	H0	H0
N>0 ↔ Her2-neu+	-	-	-	-
N>0 ↔ Her2-neu-	0.8254	0.72031	H0	H0
N>0 ↔ N0	1.2296	0.4824	H0	H0

Tabelle 43: Berechnete p-Werte für die klinisch-pathologischen Parameter der Genotypfrequenz (Heterozygotenanalyse) bei SNP 676.

#### 4.8.3 Multiple Comparison Analyse zwischen den klinisch-pathologischen Parametern versus Gesunden bei SNP 676

In diesem Abschnitt sind die 8 klinisch-pathologischen Parameter der Mammacarcinomzellen mit Gesunden, wie auch beim SNP 845 in Kapitel 3.7.3 beschrieben, hinsichtlich der Allelfrequenz, der Allelpositivität und der Genotypfrequenz verglichen. Eine Korrektur des Konfidenzintervalls nach Bonferroni ergibt einer Verminderung auf  $\alpha = 0,05/8=0,00625$  (vgl. Kapitel 3.7.3). Da Her2-neu+ bei der Homozygoten CC null-fach nachgewiesen wurde, konnte eine entsprechende Berechnung der Odds Ratio wiederum nicht vorgenommen werden und die entsprechenden Zeilen enthalten keine Werte. Signifikante Ergebnisse konnten nicht nachgewiesen werden.

SNP 676				
T-Allelfrequenz 2xTT/TC ↔ CC				
Untersuchung	Odds Ratio	p-Wert	Signifikanz 0,05	Signifikanz 0,00625
Gesunde ↔ ER+	1.0184	0.96374	H0	H0
Gesunde ↔ ER-	1.2179	0.52056	H0	H0
Gesunde ↔ PR+	0.85297	0.71652	H0	H0
Gesunde ↔ PR-	1.7398	0.22289	H0	H0
Gesunde ↔ Her2-neu+	-	-	-	-
Gesunde ↔ Her2-neu-	1.4698	0.31758	H0	H0
Gesunde ↔ N0	1.0454	0.91639	H0	H0
Gesunde ↔ N>0	1.1199	0.51855	H0	H0

Tabelle 44: Berechnete p-Werte im Vergleich von klinisch-pathologischen Parametern versus Gesunden bei der T-Allelfrequenz bei SNP 676.



SNP 676				
C-Allelfrequenz 2xCC/TC ↔ TT				
Untersuchung	Odds Ratio	p-Wert	Signifikanz 0,05	Signifikanz 0,00625
Gesunde ↔ ER+	1.097	0.61856	H0	H0
Gesunde ↔ ER-	1.0937	0.81613	H0	H0
Gesunde ↔ PR+	1.1187	0.55996	H0	H0
Gesunde ↔ PR-	1.1357	0.66909	H0	H0
Gesunde ↔ Her2-neu+	0.88333	0.72959	H0	H0
Gesunde ↔ Her2-neu-	1.1	0.62591	H0	H0
Gesunde ↔ N0	1.1026	0.62009	H0	H0
Gesunde ↔ N>0	1.298	0.34882	H0	H0

Tabelle 45: Berechnete p-Werte im Vergleich von klinisch-pathologischen Parametern versus Gesunden bei der C-Allelfrequenz bei SNP 676.

SNP 676				
T-Allelpositivität TT/TC ↔ CC				
Untersuchung	Odds Ratio	p-Wert	Signifikanz 0,05	Signifikanz 0,00625
Gesunde ↔ ER+	1.0374	0.92785	H0	H0
Gesunde ↔ ER-	1.2487	0.51222	H0	H0
Gesunde ↔ PR+	0.86694	0.7033	H0	H0
Gesunde ↔ PR-	1.8323	0.20274	H0	H0
Gesunde ↔ Her2-neu+	-	-	-	-
Gesunde ↔ Her2-neu-	1.5226	0.28046	H0	H0
Gesunde ↔ N0	1.0669	0.87932	H0	H0
Gesunde ↔ N>0	1.183	0.48468	H0	H0

Tabelle 46: Berechnete p-Werte im Vergleich von klinisch-pathologischen Parametern versus Gesunden bei der T-Allelpositivität bei SNP 676.

SNP 676				
C-Allelpositivität CC/TC ↔ TT				
Untersuchung	Odds Ratio	p-Wert	Signifikanz 0,05	Signifikanz 0,00625
Gesunde ↔ ER+	1.1048	0.5994	H0	H0
Gesunde ↔ ER-	1.122	0.77047	H0	H0
Gesunde ↔ PR+	1.1102	0.59382	H0	H0
Gesunde ↔ PR-	1.2275	0.50585	H0	H0
Gesunde ↔ Her2-neu+	0.80556	0.54744	H0	H0
Gesunde ↔ Her2-neu-	1.1558	0.47052	H0	H0
Gesunde ↔ N0	1.1137	0.59264	H0	H0
Gesunde ↔ N>0	1.3364	0.31036	H0	H0

Tabelle 47: Berechnete p-Werte im Vergleich von klinisch-pathologischen Parametern versus Gesunden bei der C-Allelpositivität bei SNP 676.

SNP 676				
Genotyp (Heterozygote) TC ↔ TT				
Untersuchung	Odds Ratio	p-Wert	Signifikanz 0,05	Signifikanz 0,00625
Gesunde ↔ ER+	1.1144	0.57714	H0	H0
Gesunde ↔ ER-	1.1585	0.71744	H1	H0
Gesunde ↔ PR+	1.1001	0.63393	H0	H0
Gesunde ↔ PR-	1.361	0.33867	H1	H1
Gesunde ↔ Her2-neu+	0.72778	0.37729	H0	H0
Gesunde ↔ Her2-neu-	1.2316	0.31461	H0	H0
Gesunde ↔ N0	1.1274	0.561	H0	H0
Gesunde ↔ N>0	1.3862	0.2685	H0	H0

Tabelle 48: Berechnete p-Werte im Vergleich von klinisch-pathologischen Parametern versus Gesunden bei der Genotypfrequenz (Heterozygotenanalyse) bei SNP 676.

SNP 676				
Genotyp (Homozygote) TT ↔ CC				
Untersuchung	Odds Ratio	p-Wert	Signifikanz 0,05	Signifikanz 0,00625
Gesunde ↔ ER+	0.97826	0.95812	H0	H0
Gesunde ↔ ER-	1.1538	0.56233	H0	H0
Gesunde ↔ PR+	0.82317	0.74156	H0	H0
Gesunde ↔ PR-	1.5625	0.30287	H0	H0
Gesunde ↔ Her2-neu+	-	-	-	-
Gesunde ↔ Her2-neu-	1.3636	0.44445	H0	H0
Gesunde ↔ N0	1	1	H0	H0
Gesunde ↔ N>0	1	0.60225	H0	H0

Tabelle 49: Berechnete p-Werte im Vergleich von klinisch-pathologischen Parametern versus Gesunden bei der Genotypfrequenz (Homozygotenanalyse) bei SNP 676.

SNP 676				
Genotyp (Heterozygote) CC ↔ TC				
Untersuchung	Odds Ratio	p-Wert	Signifikanz 0,05	Signifikanz 0,00625
Gesunde ↔ ER+	0.9173	0.83514	H0	H0
Gesunde ↔ ER-	0.74809	0.79938	H0	H0
Gesunde ↔ PR+	1.1043	0.50463	H0	H0
Gesunde ↔ PR-	0.47023	0.94634	H0	H0
Gesunde ↔ Her2-neu+	-	-	-	-
Gesunde ↔ Her2-neu-	0.59542	0.19606	H0	H0
Gesunde ↔ N0	0.88702	0.78381	H0	H0
Gesunde ↔ N>0	0.72137	0.81169	H0	H0

Tabelle 50: Berechnete p-Werte im Vergleich von klinisch-pathologischen Parametern versus Gesunden bei der Genotypfrequenz (Heterozygotenanalyse) bei SNP 676.

## 5 Diskussion

Diese Arbeit ist eine Untersuchung darüber, ob ein korrelativer Zusammenhang zwischen gesunder Kontrollgruppe und an einem Mammacarcinom erkrankter Patientengruppe besteht, also darüber, ob es eine Assoziation zwischen den untersuchten SNPs rs1937845 (SNP 845) und rs3763676 (SNP 676) und dem Auftreten von Brustkrebs gibt. In einem zweiten Schritt, der Subgruppenanalyse, wurde geschaut, ob es einen assoziativen Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer Allelvariante von SNP 676 oder SNP 845 und der Ausprägung der pathologisch-klinischen Parameter gibt. Dazu wurden nun die Proben hinsichtlich ihres Östrogenrezeptorstaus, ihres Progesteronrezeptorstaus, ihres Her2neu-Status und ihres Lymphknotenstatus untersucht.

Bei SNP 676 konnte in der ersten Analyse keine statistische Signifikanz erkannt werden, sodass nicht von einem Zusammenhang zwischen SNP 676 und der Erkrankung an einem Mammacarcinom auszugehen ist. Auch in der Subgruppenanalyse zeigte sich in der statistischen Auswertung kein korrelativer Zusammenhang (vgl. Kapitel 3.8).

Warum SNP 676, gelegen in der Promotorregion vom Gen AKR1C3, zu Untersuchungen in Zusammenhang mit Brustkrebs ausgewählt wurde, wird anhand zweier verschiedener Studien deutlich, in welchem SNP 676 zum einen mit dem Auftreten von Prostatacarcinom [Schulze 2012], zum anderen mit dem Auftreten eines Harnblasencarcinoms [Figueora 2008] eine Assoziation zeigt. In einer Fall-Kontroll Studie wurden an einem Prostatacarcinom erkrankte Personen in der schwedischen Bevölkerung im Vergleich mit einer gesunden Kontrollgruppe untersucht. Es stellte sich ein signifikantes Ergebnis hinsichtlich eines Vorteils einer Allelvariante für SNP 676 heraus [Schulze 2012]. Dieses assoziative Ergebnis wurde in einer in vitro Studie kausal unterstützt. AKR1C3 katalysiert unter anderem die Inaktivierung von Dihydroandrostendion zu dem weniger aktiven Androgen 3alpha-Adiol [Lin 1997]. In einer Prostatazellreihe wurde gesehen, dass die Transkriptionsaktivität bei einer Allel-Variante des SNPs 676 erniedrigt ist, was letztlich dazu führt, dass weniger Androgen inaktiviert wird und somit das Prostatacarcinomrisiko erhöht ist. Außerdem wurde gesehen, dass die Promotoraktivität bei einer anderen Variante von SNP 676 von Dihydroandrostendion erhöht wird [Jakobsson 2007]. Diese kausalen Ergebnisse unterstützen den korrelativen Zusammenhang mit dem Ergebnis eines Nachteils hinsichtlich eines Prostatacarcinoms bei

einer bestimmten Variante des SNPs 676 in der Promotorregion von AKR1C3. In einer Studie aus dem Jahr 2008 wurde gezeigt, dass SNP 676 eine Assoziation mit dem Auftreten eines Harnblasencarcinoms besitzt. Dazu wurden spanische Personen, welche an einem Harnblasenkrebs erkrankt waren mit einer gesunden Kontrollgruppe verglichen und dieses u.a. auch mit dem Raucherstatus in Beziehung gesetzt. Es zeigte sich ein erhöhtes Risiko bei SNP 676, dieses war jedoch auf rauchende Personen mit einem Harnblasencarcinom begrenzt [Figueora 2008].

Bei der Untersuchung des SNPs 845 konnte in der ersten Analyse, im Vergleich zwischen Mammacarcinompatienten und gesunder Kontrollgruppe, keine Korrelation zwischen diesen beiden Parametern und der SNP-Variante statistisch festgehalten werden. In der Subgruppenanalyse fanden sich jedoch signifikante Ergebnisse. Es lässt sich zusammenfassend sagen, dass bei allen signifikanten Ergebnissen ein negativer Progesteronrezeptorstatus mit einem höheren Anteil des T-Allels bzw. mit einem reduzierten Anteil des C-Allels assoziiert ist. Es fanden sich 6 signifikante Ergebnisse: positive Ausprägung des PR im Vergleich zum Fehlen eines PR in der C-Allelfrequenz, in der C-Allelpositivität und der Genotypfrequenz. Hier zeigte sich eine höhere Dichte an T-Allelen im negativen PR-Status als im positiven PR-Status, sowie eine geringere Dichte des C-Allels im negativen PR-Status als im positiven PR-Status. Ähnliche Ergebnisse fanden sich auch in der Genotypfrequenz im Vergleich von ER positiv und PR negativ und in der C-Allelpositivität im Vergleich von Gesund versus PR negativen Proben. Auch hier zeigte sich wieder eine Verschiebung der Allelverteilung hinsichtlich des T-Allels bei negativem Progesteronrezeptorstatus (vgl. Kapitel 3.7 und Abbildungen 28-33).

Dass signifikante Ergebnisse bei SNP 845 beschrieben werden, ist nicht das erste Mal. Auch in der bereits beim SNP 676 erwähnten Studie aus dem Jahr 2008 zeigen sich für SNP 845 dort auch signifikante Ergebnisse in der Assoziation mit einem Blasenkrebs. Dieses sind beim SNP 845, im Gegensatz zum SNP 676, dort jedoch nicht vom Raucherstatus des Patienten abhängig [Figueora 2008].

Im oberen Abschnitt der Arbeit wurde diskutiert, warum die SNPs 676 und 845 für die vorliegende Arbeit ausgewählt worden sind. Aus vorherigen Arbeiten ist deutlich geworden, dass die SNPs 676 und 845 im Gen AKR1C3 u.a. hinsichtlich ihrer Wirkung auf den

Sexualhormonhaushalt Einfluss auf die Krankheitsentstehung nehmen. Auch aus den im Kapitel 1.3.1 beschriebenen Reaktionen lässt sich dieser Einfluss ablesen. Um jedoch die Bedeutung der von AKR1C3 katalysierten Reaktionen einordnen zu können, ist es wichtig, sich eine Bild von der Hormonaktion in der gesunden Brustdrüse zu machen, um dann, in einem weiteren Schritt, ermitteln zu können, welche Dysbalancen letztlich zu einem Mammacarcinom führen können und inwiefern die SNPs 845 und 676 im Gen AKR1C3 dieses beeinflussen können. Die Hormonaktion in der gesunden Brustdrüse wurde in Kapitel 1.4 beschrieben.

Nachdem in Kapitel 1.4 dargestellt worden ist, dass sowohl Östrogen als auch Progesteron einen maßgeblichen Einfluss auf die Entstehung bzw. auf den Progress eines Mammacarcinoms haben, möchte ich erläutern inwiefern das Gen AKR1C3, in welchem die SNPs 676 und 845 lokalisiert sind, Einfluss zum einen auf den östrogen-vermittelte Entwicklung eines Brustkrebses haben, als auch inwiefern AKR1C3 einen Einfluss im progesteron-vermittelten Signalweg zur Entstehung eines Brustkrebs nimmt. Im unteren Teil wird die Rolle von AKR1C3 im hormon-unabhängigem Brustkrebs erörtert.

Dass AKR1C3 generell eine wichtige Bedeutung für die Entstehung von Neoplasien allgemein im menschlichen Körper hat, belegt die Tatsache, dass es in einigen Krebsarten dereguliert exprimiert wird. Darunter fallen sogenannte geschlechtshormon-abhängige Carcinome, wie das Endometriumcarcinom [Rizner 2006; Zakharov 2010; Ito 2006], das Prostatacarcinom [Fung 2006; Nakamura 2005; Stanbrough 2006; Wako 2008] und das Mammacarcinom [Jansson 2006; Lewis 2004; Lin 2004; Suzuki 2007]. Aber auch in geschlechtshormon-unabhängigen Carcinomen konnte eine erhöhte Expression nachgewiesen werden, so v.a. im Urothelcarcinom [Figueora 2008], Nierenzellcarcinom [Azzarello 2008] und bei dem beim Kleinkind vorkommenden Wilms-Tumor [Azzarello 2009]. Physiologisch findet man eine Verteilung von AKR1C3 in hormonabhängigen Geweben wie der Brust [Lin 2004], dem Endometrium [Rizner 2006; Zakharov 2010], der Prostata [Lin 2004; Fung 2006] und dem Hoden [Ashley 2010] sowie in hormonunabhängigen Epithel wie dem Urothel [Fung 2006]. Die Pathogenese von AKR1C3 mit der Entstehung dieser verschiedenen Krebsarten ist noch nicht ausreichend geklärt [Miller 2012].

Ganz besonders belegen zahlreiche Studien die wichtige Bedeutung von AKR1C3 für die Entstehung oder Progression von Brustkrebs. Diese Studien belegen die Bedeutung für AKR1C3 besonders hinsichtlich der östrogen-vermittelten Brustkrebsentstehungstheorien [u.a. Byrns 2009; Penning 2009; Jansson 2006; Lin 2004; Suzuki 2007; Byrns 2010].

Wie bereits oben erwähnt, ist einer der wesentlichen Faktoren für die Entstehung oder Progression eines Mammacarcinoms der Östrogenmetabolismus, entweder über den proliferationsfördernden Effekt via ERalpha oder über den genotoxischen östrogen-vermittelten Signalweg via Östrogenmetaboliten und anschließender DNA-Schädigung. Kurz nochmal zusammenfassend gibt es in der intrakrinen lokalen Hormonregulation der Brust bezüglich des Östrogenmetabolismus drei sogenannte Schlüsselenzymgruppen. Die proöstrogen-wirkende Aromatase, die reduktive 17betaHSD Typ5, codiert von AKR1C3, die Östrogensulfotransferase und die Östrogensulfatase [Byrns 2009; Sasano 2006].

Es wurde bereits einmal im oberen Abschnitt der Diskussion erwähnt, dass man einen systemischen, also endokrinen, Hormonweg von einem lokalen, also intrakrinen, Hormonweg unterscheiden kann [Sanao 2006]. AKR1C3 spielt eine Rolle in der intrakrinen, lokalen Hormonproduktion. Zu der Frage, welche der beiden Systeme, endokrin oder intrakrin, die entscheidende Rolle hinsichtlich der Entstehung oder Progression eines östrogen-vermittelten Brustkrebses zukommt, gibt es voneinander abweichende Meinungen. Dies möchte ich im Folgenden diskutieren, um dann einordnen zu können, welche Tiefe der Bedeutung AKR1C3, als Vertreter einer intrakrinen Hormonregulation, in der Entstehung eines Brustkrebses hinsichtlich der östrogen-vermittelten Signalwege zukommt.

Die Konzentration von Östradiol (E2) als potentestem Östrogen des Körpers [Sasano 2006], ist im Brustkrebsgewebe bis zu 10x höher als im Vergleich mit Östradiol-Level im Plasma bei postmenopausalen Frauen [Van Landeghem 1985] und ca. 4-8x höher in ER positiven Brustkrebs als in gesundem Brustgewebe. Östradiol-Level sind noch einmal im hormonrezeptor-positiven Mammacarcinom höher, als im hormonrezeptor-negativen [Lonning 2009]. Zudem sind die Östron (E1) -Level, als weniger potentem Östrogen, in östrogenrezeptor-positiven Brustkrebszellen erniedrigt. Die E1/E2-Relationen sind demnach bei einem (ER+) Brustkrebs verändert. [Haynes 2010]. Haynes et al. wollten Faktoren herausfinden, welche die unterschiedliche Östrogendisposition im Tumorgewebe und im

normalen Gewebe erklären könnten. Dazu korrelierten sie die Östrogen-Level im Plasma und im Tumorgewebe mit 10 verschiedenen mRNA-Level, zum einen vom ER selbst und zum anderen von im Östrogenmetabolismus tätigen Enzymen: CYP19 (Aromatase), STS, SULT1E1 und 6 Isoformen der betaHSDs, darunter auch die von AKR1C3 codierte 17beta HSD Typ 5, welche Östron zu Östradiol katalysiert. Die Korrelationen sollten folgende Fragen beantworten: Gibt es eine Korrelation für oder gegen eine Östrogenaufnahme aus dem Plasma über den ERalpha? Oder gibt es eine Korrelation für oder gegen eine intratumorale Östrogensynthese durch östrogen-metabolisierende Enzyme? Die Ergebnisse zeigten eine Korrelation von E2-Level in gesundem Brustgewebe und der Plasma E2-Konzentration, was darauf hindeutet, dass in der gesunden Brust das E2 nur zu einem kleinen Teil selbst hergestellt wird und dass das meiste E2 in der gesunden Brust über das Plasma aufgenommen wird. Es konnte jedoch eine positive Korrelation zwischen E2-Level in Tumorgewebe und ESR1 (ERalpha) sowie eine Korrelation zwischen E2-Level im Tumorgewebe und dreier 17beta HSDs erkannt werden. Die von AKR1C3 exprimierte 17beta HSD Typ 5 befand sich jedoch nicht darunter. Merkwürdigerweise fand sich keine Assoziation zwischen der Aromatase und dem intratumoralen E2-Level. Sie kamen letztlich zu dem Ergebnis, dass das intratumorale Östradiol-Level hauptsächlich über das Plasma via Östrogenrezeptor aufgenommen wird und dass die Rolle der 17betaHSDs in der Regulierung der Umgebungs-E2 -Level besteht. Daher kommen Haynes et al. zu dem Ergebnis, dass eine systemische antihormonelle Therapie (welche auf die systemischen Östrogene wirkt) sinnvoller sei als eine lokale antihormonelle Therapie (welche auf die lokalen Enzyme wirkt). Eine lokale antihormonelle Therapie hat nur einen additiv-unterstützenden Effekt [Haynes 2010]. Meiner Meinung nach sprechen einfache Zahlen gegen dieses „Östrogenmodell“ der Autoren: Das Ergebnis einer Studie zeigte, dass bei an Brustkrebs erkrankten Patientinnen die Entwicklung eines Zweittumors in der kontralateralen Brust unter Therapie mit einem Aromataseinhibitor 50% geringer ist, als unter einer Therapie mit einem SERM (selective estrogen receptor modulator) [Santen 2007], obwohl die Autoren keine Assoziation zwischen intratumoralen E2-Level und der Expression von Aromatase gefunden haben und eine Überexpression der Aromatase in vielen Studien bei Brustkrebs nachgewiesen worden ist [Santen 2009 und Literaturangaben darin]. Ein weiterer Umstand spricht gegen das „Östrogenmodell“ nämlich, dass die meisten Mammacarcinome dann auftreten, wenn die gonadale Steroidhormonproduktion schwindet [Penning 2009] und in die postmenopausale lokale Produktion via Aromatase, AKR1C3 und STS übergeht. Zwei getrennte



Arbeitsgruppen fanden heraus, dass ca. 50-70% des Östrogens in der Brust lokal synthetisiert werden und dass der Rest, ca. 30-50% von der Aufnahme von Plasma-Östrogen resultiert [Larionov 2002; Reed 1986]. Bei Labrie et al. lassen sich Zahlen finden, die aussagen, dass ca. 75% der gesamten Östrogenproduktion bei prämenopausalen Frauen und fast 100% bei postmenopausalen Frauen im lokalen Östrogenmetabolismus synthetisiert werden [Labrie 2003]. Diese Zahlen rücken die Bedeutung der lokalen, intrakrinen Hormonproduktion in den Vordergrund und damit auch die Bedeutung von AKR1C3 als Vertreter der lokalen Östrogensynthese.

In vielen anderen Studien konnten eine Überexpression von AKR1C3 in Brustkrebszellen nachgewiesen werden, eine Hochregulation wurde in 65-85% der Brustkrebsfälle gemessen. Zudem konnte eine Expression von AKR1C3 mit einer schlechten Prognose assoziiert werden [Jansson 2006; Lin 2004; Suzuki 2007]. Patienten mit den höchsten AKR1C3-Level hatten eine schlechtere Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit als solche mit niedrigerem Spiegel [Jansson 2006].

Eine erhöhte AKR1C3-Expression konnte aber auch *in vitro* in undifferenzierten Fibroblasten, welche mit einem mit Mammacarcinomzellen aufbereitetem Medium behandelt wurden, festgestellt werden. So gibt es parakrine Interaktionen zwischen undifferenzierten Fibroblasten und den malignen Brustkrebszellen. Die malignen Zellen senden Faktoren aus, welche bei den undifferenzierten Fibroblasten die Differenzierung inhibiert und dafür die Expression von Aromatase steigert, die wiederum durch eine gesteigerte Östradiolsynthese eine wachstumsfördernde Umgebung schafft. Amin et al. wollten weitere parakrine Interaktionen darstellen: Undifferenzierte Fibroblasten aus der Brust von gesunden Frauen wurden einmal mit einem Medium behandelt, welches mit Mammacarcinomzellen aufbereitet war und ein anderes Mal mit einem Medium mit gesunden Brustdrüsenepithelien. Sie fanden heraus, dass die Expression von AKR1C3 in den mit Brustkrebszellen aufbereiteten Medien erhöht wurde. Sie kamen also zu dem Ergebnis, dass Brustkrebszellen Faktoren aussenden, welche signifikant AKR1C3 und Aromatase hochregulieren und in den angrenzenden stromalen Fibroblasten, welches *in vivo* die stromale Komponente eines Mammacarcinoms wäre, eine wachstumsfördernde Umgebung schaffen. Es konnte außerdem eine positive Korrelation zwischen AKR1C3- und Aromatase-Expression in Brustkrebszellen nachgewiesen werden [Amin 2006]. Da die Aromatase zum einen die Reaktion von

Testosteron zu 17beta-Östradiol katalysiert und AKR1C3 die Reaktion von Androstendion zu Testosteron, zum anderen die Aromatase die Reaktion von Androstendion zu Östron und AKR1C3 die Reaktion von Östron zu 17beta-Östradiol (vgl. Abbildung 4 in Kapitel 1.3.1) hat die gemeinsame Hochregulation der Aromatase und der AKR1C3 einen additiven Effekt auf das Tumorstadium. Es wird die wichtige Bedeutung von AKR1C3 hinsichtlich eines pro-östrogenen Status in der Brustgewebszelle deutlich.

Jedoch ist natürlich für die Beurteilung der Bedeutung dieser von AKR1C3 möglichen Katalysationen wichtig zu wissen, ob es präferierte oder weniger präferierte Reaktionen von AKR1C3 gibt: Bei der Frage nach der Prioritätensetzung der von AKR1C3 vermittelten Reaktionsschritte gibt es in unterschiedlichen Studien voneinander abweichende Ergebnisse, jedoch wurden diese an unterschiedlichen Zellreihen untersucht.

So überprüften Dufort et al. die Reduktionsraten von AKR1C3 an HEK293-Zellen (HEK=human embryonic kidney), welche AKR1C3 exprimierten und fanden heraus, dass die Reduktionsrate von Androstendion zu Testosteron und von Progesteron zu 20alpha-Hydroxyprogesteron weitaus höher war, als die Reduktionsrate von Östron zu Östradiol. Daraus folgerten sie, dass die Reduktion von Androstendion und Progesteron die wichtigsten Reaktionen von AKR1C3 sind. Ihr Zusammenhang mit Brustkrebs besteht zum einen darin, dass die AKR1C3-vermittelte Synthese von Testosteron als Substrat der Aromatase indirekt die Östradiolsynthese steigert, zum anderen führt die Progesteron-Reduktion durch Erhöhung der Östrogen/Progesteron-Ratio zu einem pro-östrogenen Status in der Brustgewebszelle [Dufort 1999].

Dem gegenüber stehen Arbeiten von Byrns et al.. Sie etablierten MCF-7 Zellen, welche ständig AKR1C3 exprimierten (MCF-7-AKR1C3 Zellen) und untersuchten die katalysierten Reaktionen vom AKR1C3-Protein in den MCF-7 Zellen. Sie konnten wie zu erwarten war die Reaktionen von Androstendion zu Testosteron, von Progesteron zu alpha-Hydroxyprogesteron, Östron zu 17beta-Östradiol und PGD2 zu alpha, 11beta-PGF2 detektieren. Unerwarteterweise machten sie jedoch die Beobachtung, dass in MCF-7-AKR1C3 Zellen die Konversion von Östron zu Östradiol signifikant die schnellste aller detektierten Reaktionen bei gleicher Konzentration des Substrates war und mehr noch, dass dies Auswirkungen auf die Proliferationsgeschwindigkeit der Zellen hat. MCF-7-AKR1C3 Zellen proliferierten unter der Bildung von 17beta-Östradiol dreimal schneller [Byrns 2010].

Gründe für die unterschiedliche Priorisierung der von AKR1C3 vermittelten Reaktionsschritte in den HEK293-Zellen bei Dufort et al. [Dufort 1999] und bei den MCF7-Zellen bei Byrns et al. [Byrns 2010] könnte darin liegen, dass die HEK293-Zellen eine erhaltene oxidative 17beta-HSD haben, welche das von AKR1C3 katalysierte Produkt 17beta-Östradiol wieder zurück in Östron verwandeln und daher die Aktivität der AKR1C3 in den HEK293-Zellen maskieren. Diese Erklärung für die Diskrepanz hinsichtlich der Priorisierung der Reaktionsschritte von AKR1C3 wird dadurch unterstützt, dass bei Byrns et al. im Vergleich zwischen HEK293-Zellen und MCF7-Zellen die oxidative 17beta-HSD Aktivität bei HEK293 deutlich niedriger ist als bei MCF7-Zellen [Byrns 2010]. Dass AKR1C3 nach Arbeiten von Byrns et al. den signifikantesten Effekt auf die Reduktion von Östron zu Östradiol hat, zeigt die wichtige Bedeutung dieses AKR1C3-vermittelten Reaktionsschrittes, denn auf diese Weise beeinflusst AKR1C3 das lokale Östradiol/Progesteron-Verhältnis in der Brust hin zu einem pro-östrogenen Zustand [Byrns 2009; Byrns 2010]. U.a. Byrns et al. wiesen auch auf ein verändertes Rezeptorverhältnis zwischen erhöhter Östrogen-Rezeptor alpha (ERalpha)-Dichte und erniedrigter Progesteronrezeptor (PR)-Dichte hin. [Byrns 2009; Penning 2009; Sasano 2006]. AKR1C3-Expression führt demnach zu einem pro-östrogenen Zustand im Brustgewebe. Der pro-östrogene Zustand kann dann nach Santen et al. zum einen krebsfördernd über den ERalpha-vermittelten Signalweg wirken oder über den genotoxischen östrogen-vermittelten Signalweg eine DNA-Schädigung hervorrufen [Santen 2009].

In Kapitel 1.4.3 wurden zwei Mammacarcinom-Entstehungstheorien erläutert. Zum einen über den Weg der Östrogene, welcher im oberen Abschnitt der Diskussion in Zusammenhang mit AKR1C3 betrachtet wurde. Zum anderen über den Weg der Progesterone, welcher in diesem Abschnitt in Zusammenhang mit AKR1C3, in dessen Promotor SNP 845 und SNP 676 liegen, betrachtet werden soll.

Untersuchungen konnten zeigen, dass der Progesteronmetabolismus in den Zellen der gesunden Brust sich von denen der Brustkrebszellen unterscheidet. In der Brustdrüse unterscheidet man generell die 4-Pregnene und die 5-Pregnane. Die 4-Pregnene werden aus Progesteron durch die 20alpha-Hydroxysteroid-Oxidoreductase (20alpha-HSO) und durch die 3alpha-Hydroxysteroid-Oxidoreductase (3alpha-HSO) reversibel zwischen reduktiv vs. oxidativ interconvertiert. Auch den äußeren Ring können die 3alpha-HSOs und die 20alpha-HSOs reversibel interconvertieren. Jedes 4-Pregnen kann durch eine 5alpha-Reductase

(5 $\alpha$ R) irreversibel und unidirectional zu einem 5-Pregnan konvertiert werden [Wiebe 2000; Wiebe 2003].

Der Zusammenhang des Progesteronmetabolismus mit AKR1C3 besteht darin, dass AKR1C3 als 3 $\alpha$ -HSO Typ 2 wirkt, d.h. reversibel die 4-Pregnene und die 5-Pregnane interconvertieren kann. Gleichzeitig können die Isoenzyme von AKR1C3 dieselben Effekte auslösen: AKR1C1 codiert für eine 20 $\alpha$ -HSO-Aktivität und AKR1C2 codiert für eine 3 $\alpha$ -HSO Typ 3. In Brustkrebsgewebe und in Brustkrebszelllinien (MCF-7, MDA-MB-231, T-47D) konnte eine erhöhte 5 $\alpha$ -Reductase-Aktivität und mRNA-Expression nachgewiesen werden, während die 3 $\alpha$ -HSO und 20 $\alpha$ -HSO-Aktivität und mRNA-Expression wesentlich niedriger war, als in normalem Brustgewebe und nicht-tumorigene Zelllinien (MCF-10A). Studien verschiedener Brustkrebszelllinien konnten *in vitro* zeigen, dass die 5 $\alpha$ -Pregnane und die 3 $\alpha$ -Hydroxyprogesterone (also zu den 4-Pregnenen gehörend einander gegensätzliche Wirkungen haben: Die 4-Pregnene haben anticanceröse Effekte, indem sie antiproliferativ sind und die Metastasierung hemmen. Die 5-Pregnane dagegen werden durch die 5 $\alpha$ -Reductase u.a. aus Progesteron gebildet und fördern zum einen die Zellproliferation, zum anderen vermindern sie die Zelladhäsion und fördern auf diesem Wege die Metastasierung.

Aufgrund dieser Erkenntnisse postulierten Wiebe et al. [Wiebe 2006], dass die Änderungen vom normalen Brustgewebe zu Neoplasien über die Änderung der relativen Zusammensetzung der Progesteronmetabolite entstehen. Der Zusammenhang von AKR1C3 mit den Progesteronmetaboliten besteht in der bereits oben kurz angedeuteten Tatsache, dass AKR1C3 unter anderem auch für die 3 $\alpha$ -HSO Typ 2 codiert und dass diese die Interconversion zum einen der 4-Pregnene und zum anderen der 5-Pregnane reversibel katalysiert. Erstaunlicherweise, und ganz im Gegensatz zu bereits oben genannten Studien [u.a. Byrns 2009; Penning 2009; Jansson 2006; Lin 2004; Suzuki 2007], kamen John P. Wiebe und Michael J. Lewis zu dem Ergebnis, dass die Aktivität von 3 $\alpha$ -HSO und 20 $\alpha$ -HSO in Brustkrebszelllinien (MCF-7, MDA-MB-231, T-47D) deutlich höher war, als in nicht tumorigenen (MCF-10A) Zellen. Die höhere Rate der 3 $\alpha$ -HSO und der 20 $\alpha$ -HSO-Aktivität korrelierte mit einer erhöhten mRNA-Expression von u.a. AKR1C3 in nicht tumorigenen Zelllinien (MCF-10A). Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den oben

genannten Studien, in welchem in Brustkrebsgewebe eine erhöhte AKR1C3-Expression nachgewiesen werden konnte. Aus meiner Sicht lässt sich hierbei ergänzen, dass die Studien von Wiebe&Lewis [Wiebe 2003] aktuell *in vitro* Studien sind, wobei oben genannte Studien teilweise *in vivo* Studien sind [u.a. Byrns 2009; Penning 2009; Jansson 2006; Lin 2004; Suzuki 2007]. Der aus den von Wiebe & Lewis abgeleitete Zusammenhang zwischen Progesteronmetabolismus und AKR1C3 besteht in der Tatsache, dass durch die erniedrigte Expression in Brustkrebszelllinien die Ratio zwischen procancerogenen 5-Pregnanen vs. anticancerogenen 4-Pregnenen zu den 5-Pregnanen hin verschoben wird und dadurch, durch die geänderte Zusammensetzung der Progesteronmetabolite, ein Tumorgeschehen begünstigt wird. [Wiebe 2003; Lewis 2004; Wiebe 2006; Pasqualini 2009; Reding 2009]. Man kann dies auch mit dem Metabolismus der Östrogene in Zusammenhang setzen: Das durch AKR1C3 veränderte Progesteronmetabolit-Verhältnis hat auch Auswirkungen auf die von Progesteron supprimierten Gene, welche für die östrogenproduzierende Aromatase und das Protoonkogen Her2-neu codieren und führen auch über diesen Weg zu einer Tumoprogession [Byrns 2009].

Eine weitere Dimension von AKR1C3 misst sich in dem Verhältnis von non-hormonsensitiven Brustkrebs und dem durch AKR1C3 modifizierten Prostaglandinhaushalt. So katalysiert AKR1C3 unter anderem die Reaktion von PGD<sub>2</sub> zu PGF<sub>2</sub>, welches eine erhöhte Affinität zum Prostaglandin-F-Rezeptor (FP-Rezeptor) besitzt als PGD<sub>2</sub> selbst. Auch über die Umwandlung von PGH<sub>2</sub> wird PGF<sub>2</sub>α und somit der FP-Rezeptor aktiviert. Die Wirkung des FP-Rezeptors ist letztlich eine vermehrte Proliferation und Angiogenese der Zelle. Der FP-Rezeptor aktiviert die MAP-Kinase ( MAP = mitogen-activated-protein), wodurch es zum einen zu einer Hemmung von PPARγ (PPAR = peroxisome proliferator- activated receptor ) und dadurch zu einem Ausfall der Proliferationshemmung kommt, zum anderen kommt es zu einer Aktivierung von NFκB (NfκB = nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) und somit zur Proliferationsförderung (siehe Abbildung 5 in Kapitel 1.3.1) Die Reaktionen, die AKR1C3 im Steroidhormon- und Prostaglandinmetabolismus katalysiert, belegt die Bedeutung von AKR1C3 einerseits im hormonsensitiven Brustkrebs sowie andererseits im non-hormonsensitiven Brustkrebs. Byrns et al. weisen auf die Bedeutung von AKR1C3 als therapeutisches Target zur Hemmung hin, sowohl hinsichtlich eines hormonabhängigen, aber insbesondere auch als mögliche zukünftige Therapieoption beim nicht-hormonsensitiven Mammacarcinom. Dies ist zurzeit Gegenstand der Forschung [Byrns 2009].

Hinsichtlich des Gens AKR1C3 gibt es in verschiedenen Studien voneinander abweichende Ergebnisse. So gibt es Ergebnisse v.a. im Zusammenhang mit dem Östrogenmetabolismus, die darauf hindeuten, dass AKR1C3 erhöht in Brustkrebsgewebe exprimiert wird [u.a. Byrns 2009; Penning 2009; Jansson 2006; Lin 2004; Suzuki 2007] und es gibt Studien, v.a. in Zusammenhang mit dem Progesteronmetabolismus, die darauf hindeuten, dass AKR1C3 in Brustkrebsgewebe vermindert exprimiert wird [Wiebe 2003; Lewis 2004; Wiebe 2006; Reding 2009]. In beiden Studien wirkt AKR1C3 dadurch (durch Erhöhung bzw. Verminderung) procarcinogen. In der modellhaften Abbildung 16 wird deutlich, dass die Brustkrebsentstehung und der Progress ein Stadienprozess ist, indem jeweils unterschiedliche Faktoren auf das Brustgewebe wirken. Beurteilt man die Bedeutung von AKR1C3 und damit von SNP 845 nach Wiebe et al. hinsichtlich des Progesteronmetabolismus [Wiebe 2003], dann ist die Bedeutung von AKR1C3 und damit AKR1C3 SNP 845 a.e. den Anfangsstadien der Brustkrebsentstehung zuzuordnen, da hier nach C. Briskin [Briskin 2013] der Progesteronmetabolismus entscheidend ist. Beurteilt man AKR1C3 und damit SNP 845 nach u.a. Byrns et al. hinsichtlich des Östrogenmetabolismus [Byrns 2009], dann liegt die Bedeutung dessen eher in den fortgeschrittenen Stadien des östrogen-getriggerten Tumorwachstums (vgl. Abbildung 16 in Kapitel 1.4.3).

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit wird zum einen deutlich, dass es keinen Zusammenhang zwischen dem Auftreten eines Mammacarcinoms und dem Auftreten einer Allelvariante bei SNP 845 und SNP 676 gibt. Zum anderen gibt es bei SNP 845 einen statistischen Zusammenhang in der Analyse 2 zwischen dem negativen Progesteronrezeptor-Status und einer Verminderung des C-Allels und einer Erhöhung des T-Allels. Ob es zu einer Promotoraktivierung oder zu einer Promotordeaktivierung durch verschiedene Allelvarianten bei SNP 845 kommt, ist nicht klar. Bei bereits bekannten SNPs, welche in Bezug zum Mammacarcinom stehen, ist deutlich geworden, dass die verschiedenen SNPs, welche das Mammacarcinomrisiko erhöhen, spezifisch zu bestimmten Subgruppen des Mammacarcinoms stehen. So ist bereits in Kapitel 1.2.2 ein SNP im FGFR2-Gen auf Chromosom 10 beschrieben worden, welcher stark mit einem ER positiven Brustkrebs assoziiert ist. Diese Erkenntnis, dass SNPs subgruppen-spezifisch sind, untermauert das statistisch signifikante Ergebnis bei SNP 845 hinsichtlich des Progesteronrezeptor-Status in dieser Arbeit. Es beweist, dass SNPs fähig sind Mammacarcinomsgruppen zu beeinflussen. In dieser Arbeit lässt sich daraus der Schluss ziehen, dass der SNP 845 nicht das Brustkrebsrisiko selbst, also das Auftreten oder

## Diskussion

Nichtauftreten, beeinflusst, sondern die pathohistologische Spezifizierung hinsichtlich des Progesteronrezeptors bei bereits erkrankten Personen. In der Einleitung habe ich darauf hingewiesen, dass eine Assoziationsstudie einen korrelativen Zusammenhang statistisch aufzeigen kann, jedoch keine Erklärung im Sinne eines kausalen Zusammenhanges liefern kann. Unter der Annahme einer Beeinflussung der Subgruppenspezifizierung von SNPs im Allgemeinen und SNP 845 im Besonderen und der gegebenen statistischen Signifikanz bei SNP 845 ergibt sich die Vermutung, dass es einen kausalen Zusammenhang zwischen dem Progesteronrezeptor-Status und dem SNP 845 geben könnte, dessen Ursache hier letztlich jedoch nicht zu klären ist.

### **6 Zusammenfassung**

Diese Arbeit ist eine Assoziationsstudie zwischen Phänotyp und Genotyp. Der Phänotyp ist hier das Auftreten eines Mammacarcinoms und der Genotyp ist hier die Bestimmung der Allelvarianten zweier SNPs (single nucleotide polymorphisms). Eine Assoziationsstudie liefert einen rein korrelativen Hinweis auf eine eventuell bestehende Signifikanz und kann daher nur deskriptiv, nicht kausal wirken.

Die SNPs rs1937845 und rs3763676 (kurz: SNP 845 und SNP 676), welche in dieser Arbeit in Zusammenhang mit dem Mammacarcinom untersucht wurden, sind genregulatorische SNPs und liegen in der Promotorregion des Gens AKR1C3. AKR1C3 katalysiert u.a. Reaktionen im Steroidmetabolismus (hier v.a. Östrogene, Progesterone) und auch im prostaglandin-vermittelten Signalweg mittels NFkappaB (vgl. Abbildungen 4 und 5 in Kapitel 1.3.1). Methodisch angewendet wurde in dieser Arbeit die PCR, dessen Ergebnisse dann in der Gelelektrophorese dargestellt wurden (vgl. Kapitel 2.3 und 2.4).

Diese Arbeit besteht aus zwei Analyseschritten. Im ersten Schritt wurden die Mammacarcinomproben hinsichtlich der beiden oben genannten SNPs bestimmt und dann jeweils mit einer gesunden Kontrollgruppe verglichen. Die Ergebnisse wurden dann statistisch mittels Bestimmung der Odds Ratio und des p-Wertes im 95%-Confidence Interval hinsichtlich der Genotypfrequenz, der Allelfrequenz und der Allelpositivität untersucht. Im ersten Schritt galt es herauszufinden, ob es einen korrelativen Zusammenhang zwischen dem Auftreten oder eben Nichtauftreten eines Mammacarcinoms und der Ausprägung von Allelvarianten (TT, TC, CC) im SNP 845 oder im SNP 676 gibt. Dieses ließ sich statistisch bei beiden SNPs nicht bestätigen (vgl. Kapitel 3.1 bis 3.5).

In einem zweiten Schritt wurden dieselben Analysen hinsichtlich klinisch-pathologischer Parameter, Östrogenstatus (ER), Progesteronstatus (PR), Her2-neu-Ausprägung und Lymphknotenstatus, untersucht. Dazu wurden zum einen Mammacarcinomproben untereinander statistisch untersucht und zum anderen mit den gesunden Proben verglichen. In diesem Schritt der Analyse galt es herauszufinden, ob es einen korrelativen Zusammenhang zwischen dem Auftreten oder eben Nichtauftreten eines bestimmten klinisch-pathologischen Merkmals eines Mammacarcinoms, hinsichtlich von Allelvarianten (TT, TC, CC) im SNP 845 oder im SNP 676, gibt (vgl. Kapitel 3.6). Bei SNP 845 konnte eine statistische Signifikanz erkannt werden. Es konnten insgesamt 6 statistisch relevante Werte ausgemacht



## Zusammenfassung

werden, welche alle in Bezug zum Fehlen eines Progesteronrezeptorstatus (PR negativ) standen. Dabei ist zu sagen, dass ein negativer Progesteronrezeptorstatus mit einem höheren Anteil des T-Allels bzw. mit einem reduzierten Anteil des C-Allels assoziiert ist (vgl. Kapitel 3.7). Bei SNP 676 konnten keine statistisch signifikanten Werte detektiert werden (vgl. Kapitel 3.8).

Anhand dieser statistischen Ergebnisse kann man schlussfolgern, dass SNP 845 keinen Einfluss auf das Mammacarcinomrisiko selbst hat, also auf das Auftreten oder Nichtauftreten dieser Erkrankung, jedoch Einfluss auf die Subgruppenspezifizierung der Mammacarcinomzellen bei bereits erkrankten Personen nimmt. Es besteht daher die Möglichkeit, dass es auch einen kausalen Zusammenhang zwischen dem Progesteronrezeptor-Status und dem SNP 845 gibt. Unterstützt wird diese Annahme dadurch, dass bereits andere, subgruppen-spezifische, mammacarcinom-prädisponierende SNPs detektiert worden sind (vgl. Kapitel 1.2.2). Wie oben schon vermerkt, lässt sich ein Kausalzusammenhang in dieser Assoziationsstudie letztlich jedoch nicht ermitteln.

## 7 Literaturverzeichnis

Antuna-Puente 2008: „Adipokines: The missing link between insulin resistance and obesity“  
Antua-Puente B, Feve B, Fallahi S, Bastard JP; Diabetes Metab 2008; 34: 2-11

Amin 2006: „Paracrine-stimulated gene expression profile favors estradiol production in breast tumors“ Amin SA, Huang CC, Reierstad S, Lin Z, Arbieva Z, Wiley E, Saborian H, Haynes B, Cotterill H, Dowsett M, Bulun SE.; Mol Cell Endocrinol. 2006 Jul 11; 253(1-2):44-55

Ashley 2010: “Developmental evaluation of aldo-keto reductase 1C3 expression in the cryptorchid testis” Ashley RA, Yu Z, Fung KM, Frimberger D, Kropp BP, Penning TM and Lin HK; Urology 2010; 76: 67-72

Azzarello 2008: “Tissue distribution of human AKR1C3 and rat homolog in adult genitourinary system” Azzarello J, Fung KM and Lin HK; J Histochem Cytochem 2008; 56: 853-861

Azzarello 2009: “Expression of AKR1C3 in renal cell carcinoma, papillary urothelial carcinoma, and Wilms` tumor” Azzarello JT, Lin HK, Gherezghiher A, Zakharov V, Yu Z, Kropp BP, Culkin DJ, Penning TM and Fung KM; int J Clin Exp Pathol 2009; 3: 147-155

Beatson 1896: “On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestions for a new method of treatment, with illustrative cases” Beatson GT, Lancet 104-107

Beleut 2010: “Two distinct mechnaisms underlie progesterone-induced cell proliferation in the mammary gland” Beleut M et al.; Proc Natl Acad Sci USA 2010; 107: 2989-2994

Beral 2003: “Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women study” Beral V; Lancet 2003, 362;419-427

Briskin 1998: “A paracrine role for the epithelial progesterone receptor in mammary gland development” Briskin C et al.; Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 5076-5081

Briskin 1999: "Prolactin controls mammary and development via direct and indirect mechanisms" Briskin C, Kaur S, Chavarria TE, Binart N, Sutherland RL, Weinberg RA, Kelly PA, Ormandy CJ; Dev. Cell 3: 877-887

Briskin 2000: "Essential function of Wnt-4 in mammary gland development downstream of progesterone signaling" Genes Dev 2000; 14: 650-654

Briskin 2002: "Essential function of Wnt-4 in mammary gland development downstream of progesterone signaling" Briskin C et al.; Genes Dev 2002; 14: 650-654

Briskin 2010: "Hormone action in the Mammary Gland" Cathrin Briskin and Bert O'Malley; Cold Spring Harb Perspect Biol 2010;2:a003178

Briskin 2013: "Progesterone signalling in breast cancer: a neglected hormone coming into the limelight" Briskin C.; Nature Reviews Cancer, June 2014,p 385-396, doi:10.1038/nrc3518

Byrns 2009: "Type 5 17beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase/Prostaglandin F Synthase (AKR1C3): Role In Breast Cancer and Inhibition by Nonsteroidal Antiinflammatory Drug Analogs" Michael C. Byrns, PhD and Trevor Penning, PhD.; Chem Biol Interact. 2009 March 16; 178(1-3):221-227

Byrns 2010: "Aldo-Keto Reductase 1C3 Expression in MCF-7 Cells Reveals Roles in Steroid Hormone and Prostaglandin Metabolism that may Explain its Overexpression in Breast Cancer" Michael C. Byrns, Ling Duan, Seon Hwa Lee, Ian A. Blair, and Trevor M. Penning.; J Steroid Biochem Mol Biol. 2010 February 15; 118(3):177

Byrns 2011: "Inhibitors of type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3): Overview and structural insights. " Byrns MC, Jin Y, Penning TM.; J Steroid Biochem Mol Biol. 2011 May; 125(1-2):95-104.

Cavalieri 2006: “Catechol estrogen quinones as initiators of breast and other human cancers: implications for biomarkers of susceptibility and cancer prevention” Cavalierei E, Chakravarti D, Guttenplan J, Hart E, Ingle J, Jankowiak R, Muti P, Rogan E, Russo J, Santen R, Sutter T; Biochem Biophys Acta 1766: 63-78

Chapell 1999: “Absence of gonadotropin surges and gonadotropin releasing hormone self-priming in ovariectomized (ovx), estrogen (E2)-treated, progesterone receptor knockout (PRKO) mice” Chappell P, Schneider JS, Kim P, Xu M, Lydon JP, O'Malley BW & Levien JE; Endocrinology 140; 3653-3658

Cheng 2002: “A role for the androgen receptor in follicular atresia of estrogen receptor beta knockout mouse ovary” Cheng G, Weihua Z, Makinen S et al.; Biol Reprod 2002; 98: 6330-5

Cheng 2004: “Estrogen receptors ER alpha and beta in proliferation in the rodent mammary gland” Cheng G, Weihua Z, Warner M, Gustafsson JA; Proc Natl Aca Sci USA 2004; 101: 3739-46

Chlebowski 2010: “ Estrogen plus progestin and breast cancer incidence and mortality in postmenopausal women” Chlebowski RT, Anderson GL, Gass M, Lane DS, Aragaki AK, Kuller LH, Manson JE, Stefanick ML, Ockene J, Sarto GE, et al.; JAMA 2010, 304:1684-1692

Ciarlioni 2007: “AMphiregulin is an essential mediator of estrogen receptor alpha function in mammary gland” Ciarlioni L, Mallepell S and Brisken C; Proc Natl Acad Sci USA 2007; 104: 5455-5460

Clarke 1997: “Dissociation between steroid receptor expression and cell proliferation in the human breast” Clarke RB, Howell A, Potten CS & Anderson E; Cancer Res 1997; 57: 4987-4991

Conneely 1989: “The chicken progesterone receptor A and B isoforms are products of an alternate translate initiation event” Conneely OM, Kettelberger DM, Tsai M-J, Schrader WT und O'Malley BW; Journal of Biological Chemistry 264; 14062-14064

Couse 1995: “Analysis of transcription and estrogen insensitivity in the female mouse after targeted disruption of the estrogen receptor gene” Couse JF, Curtis SW, Washburn TF, Lindzey J, Golding TS, Lubahn DB, Smithies O and Korach KS; Molecular Endocrinology; 9: 1441-1454

Couse 1999a: “Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptor alpha and beta” Couse JF, Hewitt SC, Bunch DO, Sar M, Walker VR, Davis BJ and Korach KS; Science; 286: 2328-2331

Couse 1999b: “Prevention of the polycystic ovarian phenotype and characterization of ovulatory capacity in the estrogen receptor-alpha knockout mouse” Couse JF, Bunch DO, Lindzey J, Schomberg DW and Korach KS; Endocrinology; 140: 5855-5865

Couse&Korach 1999: “Estrogen receptor null mice: what have we learnt and what will they lead us?” Couse JF and Korach KS; Endocrine Reviews; 20: 358-417

Dahlmann-Wright 2006: „International Union of Pharmacology. Estrogen receptors.“ Dahlmann-Wright K, Cavailles, Fugua SA, Jordan VC, Katzenellenbogen JA, Korach KS, Maggi A, Muramatsu M, Parker MG, Gustafsson JA.; Pharmacol.Rev.2006 Dec; 58(4):773-81

Daniel 2009: “Signaling inputs to progesterone receptor gene regulation and promotor selectivity” Mol Cell Endocrinol. 2009 September 24; 308(0): 47-52. Doi: 10.1016/j.mce.2009.01.004

Dickson 1999: “Estrogen Receptor-Mediated Processes in Normal and Cancer Cells” Robert B. Dickson, George M. Stancel; J Natl Cancr Inst Monogr 2000;27:135-45;

Dong 2011: “ ID4 regulates mammary gland development by suppressing p38MAPK activity” Dong J et al. Development 2011; 138: 5247-5256

Dufort 1999: “Characteristics of a highly labile human type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase” Dufort I, Rheault P, Huang XF, Soucy P, Luu-The V.; Endocrinology. 1999 Feb; 140(2):568-74

Easton 2008: “Genome-wide association studies in cancer” Easton DF, Eeles RA; Hum Mol Genet 2008,17: 1692-1703

Evans 1988: “The steroid and thyreoid hormone receptor superfamily” Science 1988; 240: 889-895

Figueroa 2008: “Bladder cancer risk and genetic variation in AKR1C3 and other metabolizing genes” Figueroa JD, Malats N, Garcia-Closas M, Real FX, Silverman D, Kogevinas M, Chanock S, Welch R, Dosemeci M, Lan Q, Tardon A, Serra C, Carrato A, Garcia-Closas R, Costano-Vinyals G, Rothman N; erschienen in: Carcinogenesis. 2008 October; 29(10):1955-1962

Foster 2008: “Steroid metabolism in breast cancer” Foster PA; Minerva Endocrinol. 2008 Mar; 33 (1): 7-37

Fung 2006: “Increased expression of type 2 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase/type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3) and its relationship with androgen receptor in prostate carcinoma” Fung KM, Samara ENS, Wong C, Metwalli A, Krlin R, Bane B, Liu CZ, Yang JT, Pitha JT, Culkin DJ, Kropp BP, Penning TM and Lin HK; Endocr Relat Cancer 2006; 13: 169-180

Gallego 2001: “Prolactin, growth hormone , and epidermal growth factor activate Stat5 in different compartments of mammary tissue and exert different and overlapping developmental effects” Gallego MI, Binart N, Robinson GW, Okagaki R, Coschigano KT, Perry J, Kopchick JJ, Oka T, Kelly PA, Henninghausen I; Dev Biol; 229: 163-175

Garcia-Closas 2008: “Heterogeneity of breast cancer associations with five susceptibility loci by clinical and pathological characteristics” Garcia-Closas M, Hall P, Nevanlinna H, Pooley

## Literaturverzeichnis

K, Morrison J, Richesson DA, Bojesen SE, Nordestgaard BG, Axelsson CK, Arias JI et al.; PLoS Genet 2008, 2:e1000054

Genecards 2013:

<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=AKR1C3&search=AKR1C3>, 15.11.2013

Ghoussaini 2009: "Polygenic susceptibility to breast cancer: current- state- of- the- art" Future Oncol. 2009;5: 689-701

Giguere 1986: "Function domains of the human glucocorticoid receptor" Giguere V, Hollenberg SM, Rosenfeld MG, Evans RM, Cell 1986; 46: 645-52

Grimm 2002: "Disruption of sterpod and prolactin receptor patterning in the mammary gland correlates with a block in lobuloalveolar development" Grimm SL et al.; Mol Endocrinol 2002; 16: 2675-2691

Gronemeyer 1991: "Transcription activation by estrogen and progesterone receptors" Gronemeyer H; Annual Review of Genetics; 25: 89-123

Hagan 2014: Molecular determinants of context-dependent progesterone receptor action in breast cancer" Christy R Hagan and Carol A Lange ; BMC Medicine 2014

Haynes 2008: "Intratumoral estrogen disposition in breast cancer." Haynes BP, Straume AH, Geisler J, A'Hern R, Helle H, Smith IE, Lønning PE, Dowsett M. Clin Cancer Res. 2010 Mar 15; 16(6):1790-801

Heldring 2007: "Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets" Heldring N, Pike A, Andreasson S et al.; Physiol Rev 2007; 87: 905-31

Hewitt&Korach 2000: "Progesterone action and responses in the alphaERKO mouse" Hewitt SC and Korach KS; Steroids; 65: 551-557

Hewitt&Korach 2003: “Oestrogen receptor knockout mice: roles for oestrogen receptors alpha and beta in reproductive tissues” SC Hewitt&KS Korach; Reproduction 2003; 125: 143-149

Hollenberg 1988: “Multiple and cooperative transactivation domains of the human glucocorticoid receptor” Hollenberg SM, Evans RM; Cell 1988; 55: 899-906

Houlston 2008: “Meta-analysis of genome-wide association data identifies four new susceptibility loci for colorectal cancer” Houlston RS, Webb E, Broderick P, Pittman AM, Di Bernardo MC, Lubbe S, Chandler I, Vijayakrishnan J, Sullivan K, Penegar S et al.; Nat Genet 2008, 40: 1426-1435

Ito 2006: “17beta-hydroxysteroid dehydrogenase in human endometrium and its disorders” Ito K, Utsonomiya H, Suzuki T, Saitou S, Akahira J, Okamura K, Yaegashi N and Sasano H; Mol Cell Endocrinol 2006; 248: 136-140

Jakobsson 2007: “A novel polymorphism in the 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 5 (aldo-keto reductase 1C3) gene is associated with lower serum testosterone levels in Caucasian men” Jakobsson J., Palonek E., Lorentzon M., Ohlsson C., Rane A., and Ekström L; Pharmacogenomics J. 7; 282-289

Jansson 2006: “17beta-hydroxysteroid dehydrogenase 14 affects estradiol levels in breast cancer cells and is a prognostic marker in estrogen receptor positive breast cancer” Jansson AK, Gunnarsson C, Cohen M, Sivik T, Stal O; Cancer Res 2006;66(23):11471-11477

Jensen 1972: “The use of estrogen antagonists in hormone receptor studies” Jensen EV, Jacobson HI, Smith S, Jungblut PW, De Sombre ER; Gynecol Invest 1972;3: 108-23

Kastner 1990: “Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor isoforms A and B” Kastner P, Krust A, Turcotte B, Strupp U, Tora L, Gronemeyer H und Chambon P; The EMBO Journal 9; 1603-1614



Kato 1995: "Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase" Kato S, Endo H, Masuhiro Y et al.; Science 1995; 270: 1491-4

King 1991: "Biology of female sex hormone action in relation to contraceptive agents and neoplasia" King RJ; Contraception 1991;43:527-12

Kraus&Katzenellenbogen 1993: "Regulation of progesterone receptor gene expression and growth in the rat uterus: modulation of estrogen actions by progesterone and sex steroid hormone antagonists" ; Endocrinology 132; 2371-2379

Krege 1998: "Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta" Krege JH, Hodgin JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, Sar M, Korach KS, Gustafsson JA and Smithies O; Proceedings National Academy of Sciences USA; 95: 15 677-15 682

Kuiper 1996: "Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary" Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA; Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 5925-30

Kuiper 1997: "Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta" Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K et al.; Endocrinology 1997; 138: 863-70

Kumar 1987: "Functional domains of the human estrogen receptor" Kumar V, Green S, Stack G, Berry M, Jin JR, Chambon P; Cell 1987; 51: 941-51

Kushner 2000: "Estrogen receptor pathways to AP-1" Kushner PJ, Agard DA, Greene DL et al.; J Steroid Biochem Mol Biol 2000; 74: 311-7

Labrie 1995: "DHEA and peripheral androgen and estrogen formation: Intracrinology." Labrie F, Belanger A, Simard J et al.; Ann N Y Acad Sci 1995; 774: 16-28

Labrie 2003: "Endocrine and intracrine sources of androgens in women: Inhibition of breast cancer and other roles of androgens and their precursor dehydroepiandrosterone" Labrie F, Luu-The V, Labrie C et al.; Endocr. Rev 2003; 24: 152-82

Lam 2009: "Adiponektin haploinsufficiency promotes mammary tumor development in MMTV-PyVT mice modulation of phosphatase and tensin homolog activities" Lam JB, Chow KH, Xu A, Lam KS, Liu J, Wong NS, Moon RT, Shepard RT, Cooper GJ, Wang Y; PLoS One 2009; 4: e4968

Larinov 2002: "Lokal uptake and synthesis of oestrone in normal and malignant postmenopausal breast tissues" Larinov AA, Berstein LM, Miller WR; J Steroid Biochem Mol Biol 81: 57-64

Law 1987: "The progesterone receptor gene maps to human chromosome band 11q13, the site of the mammary oncogene int-2. Law ML, Kao FT, Wei Q, et al. ; Proc Natl Acad Sci USA 1987;84:2877-81

Lehninger 2011: Nelson, David L.; Cox, Michael M.: *Lehninger Biochemie*. 4., vollst. überarb. und erw. Aufl.. Berlin [u.a.] : Springer, 2011.

Lewis 2004: „Expression of progesterone metabolizing enzyme genes AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, SRD5A1, SRD5A2) is altered in human breast carcinoma." Lewis MJ, Wiebe JP, Heathcote JG. BMC Cancer 2004 Jun 22; 4: 27

Li 2009: "SNP detection for massively parallel whole-genome resequencing" Li R, Li W, Yang H, Wang J, Kristiansen J, Wang J; erschienen in: Genome Res. 2009 June; 19(6): 1124-1132

Lin 1997: "Expression and characterization of recombinant type 2 3 alpha-dehydroxysteroid dehydrogenase (HSD) from human prostate: demonstration of bifunctional 3 alpha/17beta-HSD activity and cellular distribution. Lin H.K., Jez J.M., Schlegel B.P., and Penning T.M.; Mol. Endocrinol. 11; 1971-1984

Lin 2004: "Characterization of a monoclonal antibody for human 17 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3 (type 2 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase/type 5 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase); immunohistochemical detection in breast and prostate" Lin HK, Steckelbroeck S, Fung KM, Jones AN, Penning TM; Steroids 2004;69(13-14): 795-801

Longacre 1986: "A correlative morphologic study of human breast endometrium in the menstrual cycle" Longacre TA, Bartow SA; Am J Surg Pathol 1986; 10: 382-393

Lonning 2009: "Tissue estradiol is selectively elevated in receptor positive breast cancers while tumor estrone is reduced independent of receptor status" J Steroid Biochem Mol Biol 2009; 117: 31-34

Lu 2008: "Genetic mosaic analysis reveals FGF receptor 2 function in terminal end buds during mammary gland branching morphogenesis" Lu P, Ewald AJ, Martin GR, Werb Z; Dev Biol 2008; 321: 77-87

Luisi 1991: "Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA" Luisi BF, Xu WX, Otwinowski Z, Freedman LP, Yamamoto KR, Sigler PB; Nature 1991; 352: 497-505

Lydon 1995: "Mice lacking progesterone receptors exhibit pleiotropic reproductive abnormalities" Lydon JP, DeMayo FJ, Funk CR, Mani SK, Hughes AR, Montgomery CA Jr, Shyamala G, Conneely OM & O'Malley BW; Genes and Development 9, 2266-2278

Mallepell 2006: "Paracrine signaling through the epithelial estrogen receptor  $\alpha$  is required for proliferation and morphogenesis in the mammary gland" Mallepell S, Krust A, Chambon P & Briskin C; Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103: 2196-2201

Mangelsdorf 1995: "The nuclear receptor superfamily: the second decade" ; Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, et al. ; Cell 1995;83:835-9

Mani 1996: “Dopamine requires the unoccupied progesterone receptor to induce sexual behavior in mice” Mani SK, Allen JMC, Lydon JP, Mulac-Jericevic B, Blaustein JD, DeMayo FJ, Conneely OM & O`Malley BW; Molecular Endocrinology, 10, 1728-1737

Masters 1977: “Cyclic variation of DNA-Synthesis in human breast epithelium” Masters JR, Drife J and Scarisbrick JJ; J Natl Cancer Inst 1977; 58: 1263-1265

Mattei 1987: “Assignment of the human progesterone receptor to the q22 band of chromosome 11 using in situ hybridization” (Abstract).Mattei MG, Krust A, Stropp U, et al. ; Cytogenet Cell Genet 19876(suppl):658

Mattei 1988: “Assignment of the human progesterone receptor to the q22 band of chromosome 11; Mattei MG, Krust A, Stropp U, et al. ; Hum Genet 1988;87:96-7

Miller 2012: „Aldo-keto reductase family 1 member C3 (AKR1C3) is expressed in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma but not small cell carcinoma“ Valerie L Miller, Hsueh-Kung Lin, Paari Murugan, Michael Fan, Trevor M Penning, Lacy S Brame, Qing Yang and Kar-Ming Fung; Int J Clin Exp Pathol. 2012; 5(4): 278-289

Milne 2009: “Risk of estrogen receptor-positive and –negative breast cancer and single-nucleotide polymorphisms 2q35-rs13387042” Milne RL, Benitez J, Navanlinna H, Heikkinen T, Aittomaki K, Blomquist C, Arias JI, Zamora MP, Burwinkel B, Bartram CR et al.; J Natl Cancer Inst 2009, 101: 1012-1018

Modugno 2003:”Ovarian Cancer and Polymorphisms in the Androgen and Progesterone Receptor: A HuGE Review” ; Francesmary Modugno; Am J Epidemiol 2004;159:319-335

Monteiro 2013: “Lessons from postgenome-wide association studies: functional analysis of cancer predisposition loci” A.N.A. Monteiro & M.L.Freedman; Journal of Internal Medicine, 2913, 274; 414-424

Mooney 2005: “Bioinformatics approaches and resources for single nucleotide polymorphism functional analysis” Sean Mooney; Briefings in Bioinformatics. Vol. 6. NO 1. 44-5; März 2005

Morani 2008: “Biological functions and clinical implications of oestrogen receptors alfa and beta in epithelial tissues” A. Morani, M. Warner & J.-A. Gustafsson; Journal of Internal Medicine 264:128-142

Mulac-Jericevic 2000: “Subgroup of reproductive functions of progesterone mediates by progesterone receptor-B isoform” Mulac-Jericevic B, Mullinax RA, DeMayo FJ, Lydon JP & Conneely OM; Science 289; 1751-1754

Mulac-Jericevic 2003: “Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform” Mulac-Jericevic B, Lydon JP, DeMayo FJ, & Conneely OM; PNAS 100; 9744-9749

Mulac-Jericevic 2004: “Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors” Biserka Mulac-Jericevic and Orla M Conneely, Reproduction 2004; 128; 139-146

Nakamura 2005: “In situ androgen producing enzymes in human prostate cancer” Nakamura Y, Suzuki T, Nakabayashi M, Endoh M, Sakamoto K, Mikami Y, Moriya T, Ito A, Takahashi S, Yamada S, Arai Y and Sasano H; Endocr Relat Cancer 2005; 12: 101-107

Nielsen 1987: “Breast cancer atypia among young and middle-aged women: a study of 110 medicolegal autopsies” Br. J. Cancer 1987; 56: 814-819

Nilsson 2001: “Mechanism of estrogen action” Nilsson S, Makela S, Treuter E; Physiol Rev 2001; 81: 1535-65

O`Malley&Conneely 1992: “Orphan receptors: in search of a unifying hypothesis for activation” O`Malley BW and Conneely OM; Mol Endocrinology 133: 761-769

Ormandy 2003: "Investigation of the transcriptional changes underlying functional defects in the mammary glands of prolactin receptor knockout mice" Ormandy CJ, Naylor M, Harris J, Robertson F, Horseman ND, Lindeman GJ, Visvader PA; Recent Prog Horm Res; 58: 297-323

Pasqualini 2009: "Breast cancer and steroid metabolizing enzymes: the role of progestogens" Pasqualini JR; Maturitas. 2009 Dec;65 Suppl 1:S17-21. doi: 10.1016/j.maturitas.2009.11.006. Epub 2009 Dec 3.

Patrone 2003: "Regulation of postnatal lung development and homeostasis by estrogen receptor beta" Patrone C, Cassel TN, Pettersson K et al.; Mol Cell Biol 2003; 23: 8542-52

Penning 2009: "Steroid Hormone Transfprming Aldo-Keto Reductases and Cancer" Trevor M. Penning and Michael C. Byrns; Ann N Acad Sci. 2009 February; 1155:33-42

Perou 2000: "Molecular portraits of human breast tumours" Charles M Perou, Therese Sorlie Michael B Eisen, Matt van de Rijn, Stenfanie S Jeffrey, Christian A Rees, Jonathan R Pollack, Douglas T Ross, Hilde Johnsen, Lars A Akslen, Oystein Fluge, Alexander Pergamenschikov, Cheryl Williams, Shirley X Zhu, Per E Lonning, Anne-Lise Borreses-Dale, Patrick O Brown und David Botstein; Nature 2000; 406; 747-752

Pratt 1988: "A region in the steroid binding domain determines formation of the non-DNA-binding, 9 S glucocorticoid receptor complex" Pratt WB, Jolly DJ, Pratt DV et al.; J Biol Chem 1988; 263: 267-207

Rafnar 2009: "Sequence variants at the TERT-CLPTM1L Locus associate with many cancer types" Rafnar T, Sulem P, Stecey SN, Geller F, Gudmundsson J, Sigurdsson A, Jakobsdottir M, Helgadottir H, Thorlacius S, Aben KK et al.; Nat Genet 2009, 41: 221-227

Reed 1986: "Estrogen production and metabolism in normal postmenopausal women and postmenopausal women with breast or endometrial cancer" Eur J Cancer Clin Oncol 22: 1395-1400

Reding 2009: Genetic variation in the progesterone receptor and metabolism pathways and hormone therapy in relation to breast cancer risk.” Reding KW, Li Cl, Weiss NS, Chen C, Carlson CS, Duggen D, Thummel KE, Daling JR, Malone KE; Am J Epidemiol. 2009 Nov 15; 170 (10): 1241-9

Risma 1995: “Targeted overexpression of luteinizing hormone in transgenic mice leads to infertility, polycystic ovaries, and ovarian tumors” Risma KA, Clay CM, Nett TM, Wagner T, Yun J and Nilson JH; Proceedings National Academy of Sciences USA; 92: 1322-1326

Rizner 2006: “AKR1C1 and AKR1C3 may determine progesterone and estrogen ratios in endometrial cancer” Rizner TL, Smuc T, Ruprecht R, Sinkovec J and Penning TM; Mol Cell Endocrinol 2006; 248: 126-135

Rousseau-Merck 1987:”Localization of the human progesterone receptor gene to chromosome 11q22-q23” ; Rousseau-Merck MF, Misrahi M, Loosfelt H, et al.; Hum Genet 1987;77:280-2

Santen 2007: “Endocrine responsive cancer” Santen HJ, Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR, eds. Williams Textbook of Endocrinology. 11<sup>th</sup> ed Philadelphia: W.B. Saunders; 1763-1801

Santen 2009: “History of aromatase: Saga of an important biological mediator and therapeutic target” R.J. Santen, H. Brodie., E.R. Simpson, P.K. Siiteri and A. Brodie; Endoc.Rev. 2009; 30: 343-375

Sartorius 1994: ” A third transactivation function (AF3) of human progesterone receptors located in the unique N-terminal segment of B-isoform” Sartorius CA, Melville MY Hovland AR, et al. ; Mol Endocrinol 1994;8:1347-60

Sasano 2006: “New development in intracrinology of breast carcinoma.”Sasano H, Suzuki T, Nakata T, Moriya T.; Breast Cancer. 2006; 13(2):129-36

Saville 2000: “Ligand-, cell-, and estrogen receptor subtype (alpha-/beta-)dependent activation at GC-rich (SP1) promotor elements” Saville B, Wormke M, Wang F et al.; J Biol Chem 2000; 275: 5379-87

Schroeder 1998: “Dynamic expression and activation of ERBB receptors in the developing mouse mammary gland” Schroeder JA, Lee DC; Cell Growth Differ 1998; 9: 451-464

Schulze 2012: “Basal and regulatory promotor studies of the AKR1C3 gene in relation to prostate cancer” Jenny J. Schulze, Helena Karypidis and Lena Ekström; frontiers in pharmacology, published : 06.August 2012 Volume 3, Article 151

Seagroves 2000: “C/EBPb (CCAAT/enhancer binding protein) controls cell fate determination during mammary gland development” Seagroves TN, Lydon JP, Hovey RC, Vonderhaar BK & Rosen JM; Molecular Endocrinology 14; 359-368

Sevelda 1990: “Oestrogen and progesterone receptor content as a prognostic factor in advanced epithelial ovarian carcinoma” Sevelda P, Denison U, Schemper M, et al. ; Br J Gynaecol 1990;97:706-12

Stanbrough 2006: “Increased expression of genes converting adrenal androgens to testosterone in androgen-independent prostate cancer” Stanbrough M, Bubley G, Ross K, Golub TR, Rubin MA, Penning TM, Febbo PG and Balk SP; Cancer Res 2006; 66: 2815-2825

Stauber 3. Auflage: “Gynäkologie und Geburtshilfe” Stauber, Weyerstahl; 3.Auflage Thieme-Verlag

Sunnarborg 2002: „Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE) regulates epidermal growth factor receptor ligand availability” Sunnarborg SW, Hinkle CL, Stevenson M, Russell WE, Raska CS, Peschon JJ, Castner BJ, Gerhart MJ, Paxton RJ, Black RA et al.; J Biol Chem 2002; 277: 12838-12845



Suzuki 2007: „In situ production of sex steroids in human breast carcinoma“ Suzuki T, Miki Y, Moriya T, Akahira J, Hirakawa H, Ohuchi N, Sasano H; Med Mol Morphol 2007; 40(3): 121-127

Taillon-Miller 1998: „Overlapping genomic sequences: A treasure trove of single-nucleotide polymorphisms“ Taillon-Miller P, Gu Z, Li Q et al. 1998; Genome Res., Vol. 8 (7), pp. 748-754

The Cancer Genome Atlas Network 2000: „Comprehensive molecular portraits of human breast tumors“ The Cancer Genome Atlas Network 2000; Nature 406, 747-752 (17 August 2000); doi:10.1038/35021093

Tibbetts 1998: “Mutual and intercompartmental regulation of estrogen receptor and progesterone receptor expression in the mouse uterus” Biology of Reproduction 59, 1143-1152

Tsai 1991: “Mechanisms of regulation of gene transcription by steroid receptors” Tsai M-J, O'Malley BW; The Hormonal Control of Gene Expression, pp 101-116. Eds P Cohen & JG Foulkes. Amsterdam: Elsevier Press.

Van Landeghem 1985: “Endogenous concentration and subcellular distribution of estrogens in normal and malignant breast tissue” Van Landeghem AAJ, Poortman J, Nabuurs M, Thijssen JHH; Cancer Res 1985; 45: 2900-4

Varghese 2010: “Genome-wide association studies in common cancers- what have we learnt?” Jajini Susan Varghese and Douglas F Easton; Current Opinion in Genetics and Development 2010, 20:201-209

Vazquez 1999: “Progesterone regulates proliferation of endothelial cells” Vazquez F, Rodriguez-Manzanique JC, Lydon JP, Edwards DP, O'Malley BW & Iruela-Arispe ML; Journal of Biological Chemistry 274; 2185-2192

Vegato 1993: "Human progesterone receptor A is a cell-and promotor-specific repressor of human progesterone receptor B receptor function" Vegato E, Shahbaz MM, Wen DX, et al.; Mol Endocrinol 1993;13:146-63

Vegeto 1992: "The mechanism of RU486 antagonism is dependent on the confirmation of the carboxy-terminal tail of the human progesterone receptor" Vegeto E, Allen GF, Schrader WT, Tsai MJ, McDonnell DP, O'Malley BW; Cell 1992; 69: 703-13

Wako 2008: "Expression of androgen receptor through androgen converting enzymes is associated with biological aggressiveness in prostate cancer" Wako K, Kawasaki T, Yamana K, Suzuki K, Jiang S, Umezu H, Nishiyama T, Takahashi K, Hamakubo T, Kodama T and Naito M; J Clin Pathol 2008; 61: 448-454

Wang 2005: "Single nucleotide polymorphism in transcriptional regulatory regions and expression of environmentally responsive genes" Wang X, Tomso DJ, Liu X, Bell DA; erschienen in: Toxicol Appl Pharmacol. 2005 Sep 1; 207(2 Suppl):84-90

Webster 1988: "The hormone-binding domains of the oestrogen and glucocorticoids receptors contain an inducible transcription activation function" Webster NJ, Green S, Jin JR, Chambon P; Celkl 1988; 54: 199-207

Wellings 1973: "On the origin and progression of ductal carcinoma in the human breast" Wellings SR and Jensen HM; J. Natl Cancer Inst. 50; 1111-1118

Wen 1994: "The A and B isoforms of the human progesterone receptor operate through distinct signaling pathways within target cells" ; Wen DX, Xu YF, Mais DE, et al. ; Mol Cell Biol 1994;14:8356-64

Wiebe 2000: "The 4-pregnene and 5alpha-pregnane progesterone metabolites formed in nontumorous and tumorous breast tissue have opposite effects on breast cell proliferation and adhesion" Wiwbw JP, Muzia D, Szwajcer D, Hill SA and Seachrist JL; Cancer Res 2000, 60: 936-943

Wiebe 2003: “Activity and expression of progesterone metabolizing 5 $\alpha$ -reductase, 20 $\alpha$ -hydroxysteroid oxidoreductase and 3 $\alpha$ -( $\beta$ )-hydroxysteroid oxidoreductase in tumorigenic (MCF-7, MDA-MB-231, T-47D) and nontumorigenic (MCF-10A) human breast cancer cells.” Wiebe JP, Lewis MJ. BMC Cancer 2003 Mar 22; 3:9

Wiebe 2006: “Progesterone metabolites in breast cancer” Wiebe JP Endocr Relat Cancer 2006 Sep; 13 (3): 17-38

Yang 2014: “Systematic dissection of the mechanisms underlying progesterone receptor downregulation in endometrial cancer” Oncotarget, Advance Publication 2014; published September 22, 2014

Zakharov 2010: “Suppressed expression of type 2 3 $\alpha$ /type 5 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3) in endometrial hyperplasia and carcinoma” Zakharov V, Lin HK, Azzarello J, McMeekin S, Moore KN, Penning TM and Fung KM; Int J Clin Exp Pathol 2010; 3: 608-617

Zeimet 1994: “Immunocytochemical versus biochemical receptor determination in normal and tumorous tissues of the female reproductive tract and the breast” Zeimet AG, Muller-Holzner E, Marth C, et al. JAMA 1994;49:365-372

Zinser 2002: „Vitamin D(3) receptor ablation alters mammary gland morphogenesis“ Zinser G, Packman K, Welsh J; Development; 129: 3067-3076

Zinser 2004: “Accelerated mammary gland development during pregnancy and delayed postlactational involution in vitamin D3 receptor null mice” Zinser GM, Welsh J; Mol Endocrinol; 18: 2208-2223