

Aus der  
Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe - Innenstadt  
der Ludwigs-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. K. Frieze

**Treten die Varianten  
R72P des p53 Gens und  
S31R des p21 Gens  
bei Frauen mit einer  
Mammakarzinomkrankung  
gehäuft auf?**

**Eine Fallkontrollstudie an der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und  
Geburtshilfe der Universität München - Innenstadt**

Dissertation  
Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von  
Florian Ebner

aus  
Deggendorf

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

|                             |                              |
|-----------------------------|------------------------------|
| Berichterstatter:           | PD Dr. med. J. Rehbock       |
| Mitberichterstatter:        | Prof. Dr. med. Th. Kirchner  |
| Dekan:                      | Prof. Dr. Dietrich Reinhardt |
| Tag der mündlichen Prüfung: | 18.1.2007                    |

# Inhaltsverzeichnis

|          |                                                                    |           |
|----------|--------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>Einleitung</b>                                                  | <b>5</b>  |
| 1.1      | Fragestellungen                                                    | 16        |
| <b>2</b> | <b>Material und Methode</b>                                        | <b>17</b> |
| 2.1      | Art der Studie                                                     | 17        |
| 2.2      | Datenbank und Definitionen                                         | 17        |
| 2.3      | Merkmalskatalog                                                    | 18        |
| 2.3.1    | Allgemeine Patientendaten                                          | 18        |
| 2.3.2    | Alters- und Hormonstatus                                           | 18        |
| 2.3.3    | Hormontherapie                                                     | 19        |
| 2.3.4    | Tumordaten                                                         | 19        |
| 2.3.4.1  | TNM Klassifikation                                                 | 19        |
| 2.3.4.2  | Histologie                                                         | 21        |
| 2.3.4.3  | Grading                                                            | 21        |
| 2.3.5    | Die Analyse der Gene p53 und p21                                   | 23        |
| 2.3.5.1  | Analysemethode                                                     | 23        |
| 2.3.6    | Material und Methode                                               | 23        |
| 2.3.6.1  | Primer Design                                                      | 23        |
| 2.3.6.2  | DNA Quantifizierung                                                | 24        |
| 2.3.6.3  | PCR Protokoll                                                      | 24        |
| 2.3.6.4  | Vorbereitung der Einzelstrang DNA für die<br>MassEXTEND Reaktion   | 25        |
| 2.3.6.5  | Primer Extension Protokol                                          | 25        |
| 2.3.6.6  | MALDI-TOF Massenspektrometrie                                      | 26        |
| 2.3.7    | Studienprozess am Patienten und Studienkriterien                   | 29        |
| 2.3.7.1  | Aufklärung und Einverständnis                                      | 29        |
| 2.3.7.2  | Blutentnahme                                                       | 29        |
| 2.3.7.3  | Studienkriterien                                                   | 30        |
| <b>3</b> | <b>Ergebnisse</b>                                                  | <b>31</b> |
| 3.1      | Abstammung                                                         | 31        |
| 3.2      | Familienanamnese                                                   | 32        |
| 3.3      | Alter und Erkrankungsdauer der Patientinnen im<br>Gesamtkollektiv  | 32        |
| 3.4      | Postmenopausenstatus und Hormontherapie                            | 33        |
| 3.5      | Tumordaten                                                         | 34        |
| 3.5.1    | Allgemeine klinische und biochemische Angabenzur<br>Karzinomgruppe | 34        |
| 3.5.2    | TNM Stadium                                                        | 35        |
| 3.5.2.1  | Tumorgroße                                                         | 35        |
| 3.5.2.2  | Lymphknotenmetastasen                                              | 35        |
| 3.5.2.3  | Organmetastasen                                                    | 36        |
| 3.5.3    | Histologie                                                         | 36        |
| 3.5.4    | Grading                                                            | 38        |

|           |                                                                              |           |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.6       | Genanalyse .....                                                             | 39        |
| 3.6.1     | Klinische und biochemische Angaben der Kontroll- und<br>Karzinomgruppe ..... | 39        |
| 3.6.2     | Gegenkontrolle .....                                                         | 39        |
| 3.6.3     | Analyseergebnisse.....                                                       | 40        |
| 3.6.4     | Erkrankungsdauer und Polymorphismus .....                                    | 42        |
| 3.6.5     | Alter und Polymorphismus.....                                                | 44        |
| 3.6.6     | Alter und Polymorphismus: Gesamtkollektiv .....                              | 44        |
| 3.6.6.1   | Alter und Polymorphismus: Matched Pairs.....                                 | 45        |
| 3.6.7     | TNM und Polymorphismus .....                                                 | 46        |
| 3.6.7.1   | TumorgroÙe .....                                                             | 46        |
| 3.6.7.2   | Lymphknotenstatus .....                                                      | 48        |
| 3.6.7.3   | Metastasen .....                                                             | 50        |
| 3.6.7.4   | Grading .....                                                                | 50        |
| 3.7       | Hormontherapie und Polymorphismus .....                                      | 51        |
| <b>4</b>  | <b>Diskussion .....</b>                                                      | <b>52</b> |
| 4.1       | S31R Variante im p21 Gen .....                                               | 58        |
| 4.2       | Mutation am p53 Gen .....                                                    | 60        |
| 4.3       | Kombination der Varianten am p21 und p 53 Gen.....                           | 61        |
| <b>5</b>  | <b>Zusammenfassung .....</b>                                                 | <b>63</b> |
| <b>6</b>  | <b>Abkürzungen .....</b>                                                     | <b>65</b> |
| <b>7</b>  | <b>Datenerhebungsbogen .....</b>                                             | <b>67</b> |
| <b>8</b>  | <b>Abbildungsverzeichniss .....</b>                                          | <b>68</b> |
| <b>9</b>  | <b>Tabellenverzeichniss.....</b>                                             | <b>69</b> |
| <b>10</b> | <b>Literaturverzeichniss.....</b>                                            | <b>70</b> |
| <b>11</b> | <b>Danksagung.....</b>                                                       | <b>80</b> |

# 1 Einleitung

Das Mammakarzinom ist nach dem Lungenkrebs in den USA wie auch in den meisten europäischen Industrienationen die häufigste maligne Erkrankung der Frau.

Verschiedene Statistiken zeigen, dass in diesen Ländern etwa 10% aller Frauen im Laufe ihres Lebens an einem Karzinom der Brust erkranken.

Als Ursache für dieses Malignom werden viele und unterschiedliche Gründe diskutiert.

Der erste Bericht über eine familiäre Belastung mit Brustkrebs stammt aus dem Jahre 1757 von Le Dran, der von einem Kollegen aus Avignon berichtet, welcher bei einer 19-jährigen Frau, einer Nonne, diese Diagnose stellte. Sie verweigerte die Mastektomie mit dem Hinweis, daß ihre Großmutter und ein Großonkel mütterlicherseits dieselbe Krankheit gehabt haben<sup>27</sup>.

Wie wir heute wissen, liegt bei 5-10% der an einem Brustkrebs erkrankten Patientinnen eine nachweisbare genetische Veränderung vor<sup>62</sup>. Gesunde Frauen, mit einer dieser genetischen Veränderung haben ein erhöhtes Erkrankungsrisiko für Brustkrebs.

Die Anstrengungen einen ursächlichen Gendefekt zu identifizieren, führten zur Beschreibung mehrerer Gene.

Die beiden bekanntesten Gene für Brustkrebserkrankungen sind BRCA1 und BRCA2. Daneben sind weitere Gene in der Diskussion, wie BRCA3, BRCATA, BWSCR1A<sup>54</sup>.

Mutationen dieser bekannten Gene können etwa 1-2% der Mammakarzinomneuerkrankungen pro Jahr erklären. Zur Begründung des Neuauftretens von genetischen Defekten werden Spontanmutationen und multifokale Vererbungsmodi diskutiert.

Wie epidemiologischen Studien erwarten lassen, variieren die Häufigkeiten der Mutationen von Nation zu Nation. So ist in

Osteuropa und in Russland in 40% eine Variante des Exons 20 im Genabschnitt BRCA-1 zu finden. Im Gegensatz dazu weisen die erkrankten Frauen in Israel eine Variante im Exon 2 des BRCA-2 auf. In Italien und Deutschland konnten mehrere Polymorphismen auf den verschiedenen Genen gefunden werden.

Bei der Suche nach der genetischen Ursache für maligne Erkrankungen wurden Gene nach ihrer auslösenden Wirkung klassifiziert. So sind im menschlichen Erbgut Gen - Abschnitte enthalten, die nach einer Mutation zu einer Entartung der Zelle führen können. Dies sind z.B. Gene, die an der Regulation der Proliferation und Differenzierung der Zelle beteiligt sind.

Eine Mutation kann die Funktionstüchtigkeit dieser regulierenden Gene beeinträchtigen, so dass ungehemmte, undifferenzierte Zellen entstehen können. Damit ist aus dem regulierenden Gen durch Mutation ein Onkogen geworden. Aus diesem Grund werden diese Gene als Protoonkogene bezeichnet<sup>10</sup>.

Im Fokus der Forschung stehen seit einigen Jahren die sog. Tumorsuppressorgene (TSP-Gene) wie:

- das ATM (Ataxia-teleangiectatica)-Gen  
(auf Chromosom 17q23),
- das Retinoblastomgen (auf Chromosom 13q14),
- das p53 Gen (auf Chromosom 17q13) und
- das p21 Gen (auf Chromosom 6p21.2)

Die Tumorsuppressorgene sind Gene, die in ihrer normalen Wirkungsweise die Zellvermehrung hemmen. Kommt es zu einem Verlust der ‚Bremswirkung‘ dieser Gene oder Genprodukte, kann sich die Zelle unkontrolliert teilen und somit zur Krebszelle entarten. In den letzten Jahren sind eine Reihe dieser „Kontrollgene“ beschrieben worden. Zu ihren Aufgaben gehört die direkte oder indirekte Kontrolle des Zellzyklus. Hierunter wird u.a. die Proliferation, DNA-Reparatur und Apoptose verstanden.

Die meisten Körperzellen sind postmitotisch in der G<sub>0</sub> Zyklusphase arretiert und nicht in der Lage sich von selbst zu teilen.

Erst durch den Einfluss von Wachstumsfaktoren kann die Zelle aus der G<sub>0</sub>-Phase in die G<sub>1</sub>-Phase übergehen. Dieses Stadium ist biochemisch durch die RNA- und Proteinsynthese sowie durch eine Größenzunahme des Zytoplasmas und des Nukleolus gekennzeichnet.

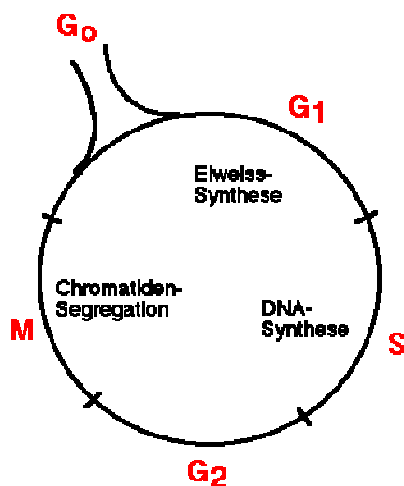


Abbildung 1: Zellzyklusphase

Die G<sub>1</sub> Phase dauert bei sich rasch teilenden, menschlichen Zellen (z.B. Epithelien) 4-10 Stunden. Ab eines bestimmten Punktes innerhalb dieser Phase, ist ein Rückschritt in die G<sub>0</sub> Phase nicht mehr möglich. Dieser Zeitpunkt wird durch die Aktivität des Tumorsuppressorgenes p53 bestimmt.

Das Transkriptionsprodukt des p53 Gens (das P53 Protein) verhindert eine Zellteilung bei eingetretenen DNA-Schäden. Somit können Reparaturmechanismen die entstandenen Zellschäden ausbessern oder es wird das Absterben der Zelle veranlasst (Apoptose). Diese Wirkungsweise des p53 Gens als Tumorsuppressor-Gen ist lange Zeit verkannt worden<sup>59</sup>. Zahlreiche Studien konnten jedoch die Bedeutung des p53 Gens herausstellen.

So finden sich, abhängig von der Zellzyklusphase (G1/S-Phase), unterschiedliche Konzentrationen des P53 Proteins in der Zelle, was für eine differenzierte Aufgabe im Zellzyklus spricht<sup>48;50;59</sup>.

Eine Anreicherung des P53 Proteins führt zu einer transkriptionellen Aktivierung des p21 Gens und schließlich zum Zellzyklusarrest<sup>23;37;40;65;69</sup>.

Wie in Abbildung 2 dargestellt, können in der Zelle DNA Schäden vorliegen. Diese werden nun durch entsprechende Reparaturmechanismen behoben, oder es wird die Apoptose eingeleitet<sup>42;55</sup>.

**Kommentar [FE1]:** Abbil Doppelpunkt

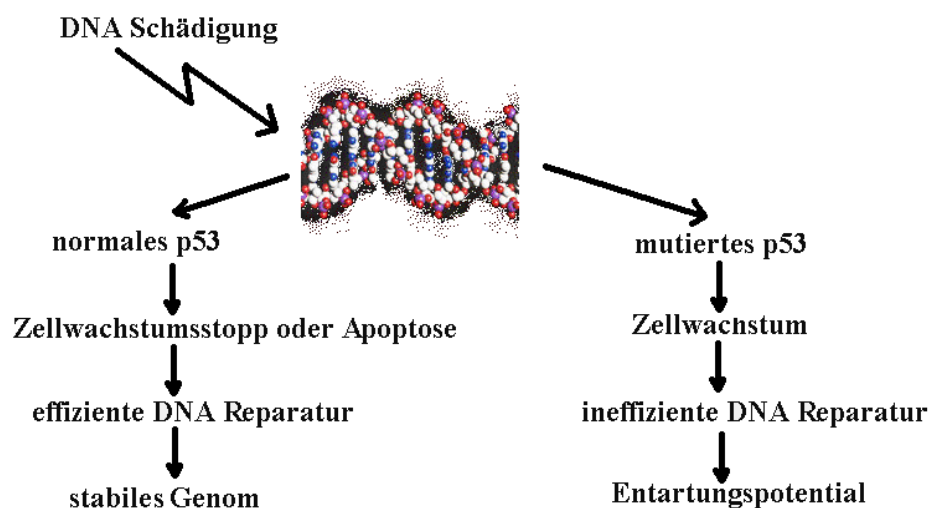


Abbildung 2: Aktivierung von normalem bzw. mutiertem p53 Gen und Apoptose<sup>5</sup>

Eine Mutation in den Reparaturgenen kann zu einer Vermehrung von geschädigten Zellen und somit zu einem malignen Tumorleiden führen.

Untersuchungen des p53 Gens bei Mammakarzinompatientinnen zeigen, dass eine Mutationsrate von 20-40% gefunden werden kann<sup>56</sup>. Liegt eine Veränderung des P53 Proteins vor, so ist der Abbau dieses Proteins oder die Interaktion mit der DNA gestört. Die Halbwertszeit des Proteins verlängert sich über die normalen 20 Minuten hinaus und das Protein reichert sich in der Zelle an<sup>12;22;23;46;60</sup>. Durch den verlangsamten Abbau erhöht sich die Konzentration von P53 Protein in der Zelle. Dies, wie Calabretta et. al. berichtet, ist unter anderem Auslöser für ein exponentielles Zellwachstum<sup>14</sup>.

Eine Analyse von Karzinomengewebe in unterschiedlichen Organen, z.B. beim Kolonkarzinom, Lungenkarzinom, der Leukämie und dem Mammakarzinom, ergab, dass in diesen Karzinomen verschiedene Varianten des p53 Gens vorliegen<sup>7;24;41;47;71;72</sup>.

Einen guten Überblick über die unterschiedlichen Mutationsstellen zeigt Abbildung 3. Hier wird das P53 Protein mit einem DNA-Strang dargestellt. Die Stellen der häufigsten Mutationen sind mit Rot gekennzeichnet.

**Kommentar [FE2]:** Abbildung Doppelpunkt

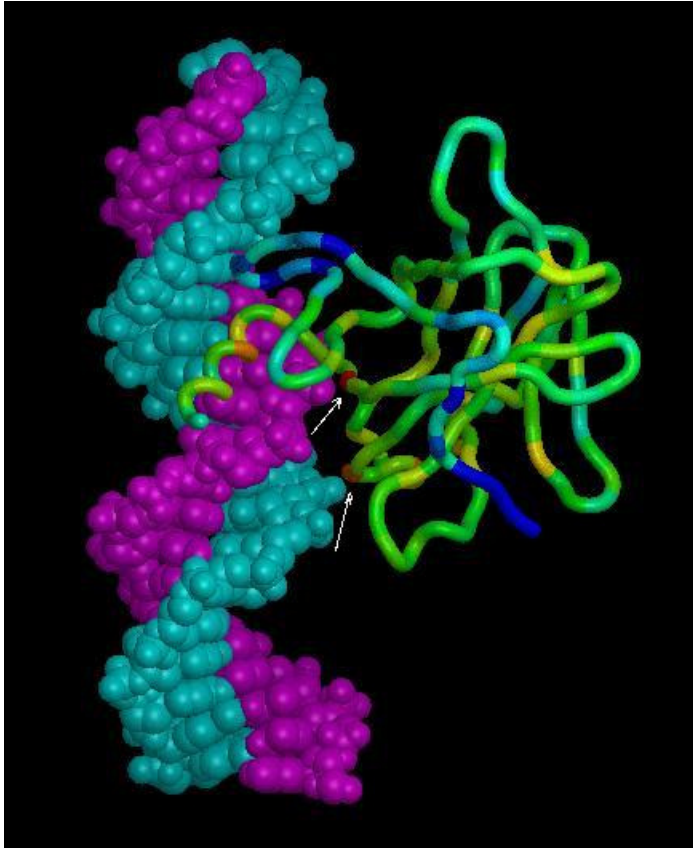


Abbildung 3: Die Struktur des Proteins P53

in der DNA Bindung<sup>19</sup>;

Das p53 Molekül ist farblich nach der Häufigkeit der beschriebenen Mutationen unterlegt (Blau: selten; Rot: häufig). Die beiden Pfeile zeigen auf die Stellen der häufigsten Genmutationen bei Tumoren.

Eine geschädigte Zelle kann auf mehreren Ebenen und unter Einbeziehung verschiedenster Gene oder Proteine repariert werden. Einen vereinfachten Überblick über die von p53 Gen beeinflussbaren Möglichkeiten soll Abbildung 4 vermitteln.

**Kommentar [FE3]:** Abbildung doppelpunkt

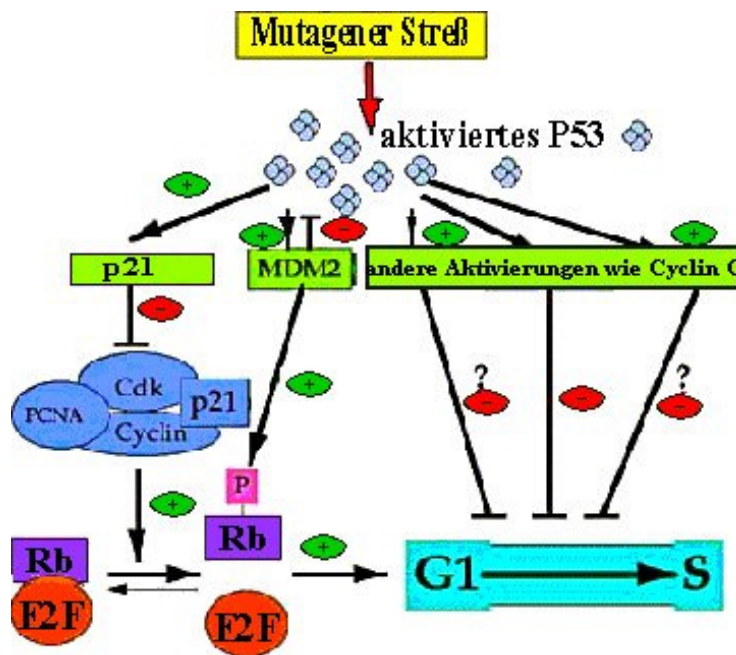


Abbildung 4: Die von p53 abhängigen Pathways zur Zellregulation (modifiziert nach Soehnle et al<sup>68</sup>).  
Erläuterung siehe Text.

Die Zellstörung (Genotoxischer Mutagener Stress) ist der Ausgangspunkt für die p53 Aktivierung. Diese wiederum stimuliert weitere Gene wie z.B. p21, MDM2 usw. Eine Veränderung des Genoms oder Proteins kann unterschiedlichste Auswirkungen auf die Kontrollmechanismen haben.

Neben dem P53 Protein sind an der direkten Zellzykluskontrolle noch weitere Proteine beteiligt: Cycline; Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) und CDK-Inhibitoren (CDKI). P53 Gen interagiert neben MDM2 und Gadd 45 und auch mit p21, einem 'Cyclin abhängigen Kinase Inhibitor' (CDKI). Eine Aktivierung des p53 Gens führt auch zu einer Aktivierung und Transkription des p21 Gen. (siehe Abbildung 4)

**Kommentar [FE4]:** Abbildung Doppelpunkt

Im Zellzyklus wird das Voranschreiten aus der G1-Phase in die S-Phase u.a. durch die CDK und deren Wirkung auf die Phosphorylierung von E2F (Transkriptionsfaktor) bestimmt.

Ist die CDK ungehemmt, so führt dies zum Voranschreiten des Zellzykluses aus der G1- in die S-Phase. P21 wiederum, als CDKI, verlangsamt, bzw. stoppt den Zellzyklus in der G1-Phase<sup>38</sup>.

Das Transkriptionsprodukt des p21 Gen, das P21 Protein, hat ebenfalls Funktionen bei der ‚Genreparatur‘ im Verlauf der Zellteilung; darüber hinaus aber auch bei der Angiogenese<sup>74</sup>.

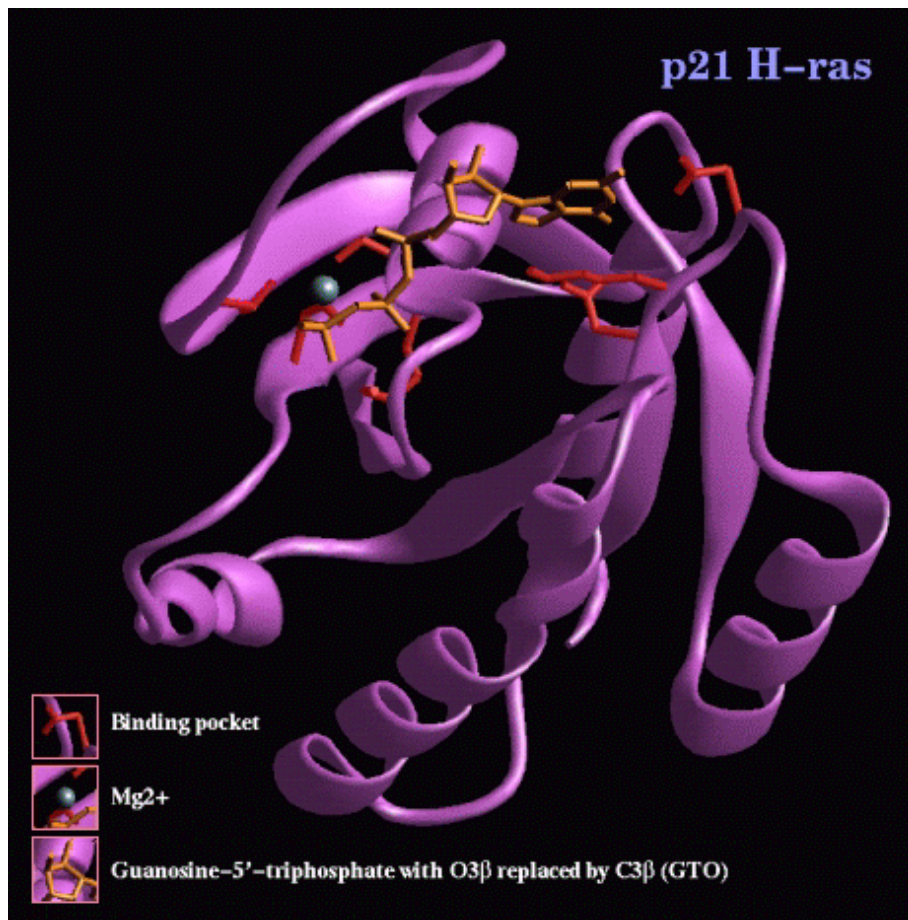


Abbildung 5: Molekülstruktur des P21 Proteins mit Darstellung der DNA-Bindungsstelle<sup>68</sup>

Durch Blockade der Phosphorylierung der Cyclin abhängigen Kinase bewirkt das P21 Protein auch eine Hemmung der Apoptose über mehrere Zellgenerationen hinweg<sup>4;44</sup>.

Bei verändertem P21 Protein, kann das Protein nicht durch das CASP3 Enzym gespalten werden.

Diese „Spaltung“ ist jedoch notwendig, damit die P21 Proteine aus dem Zellkern ins Zytoplasma austreten können, und dadurch die nukleare CDK aktivieren.

Polymorphismen im p21 Gen oder dem CASP3 Gen unterdrücken somit die Apoptose der Zelle. Durch das fehlende Eintreten der Apoptose können sich aber Zellen erfolgreich teilen, die wegen eines schweren DNA Schadens entweder repariert werden müssten oder aber absterben würden<sup>43</sup>. Bisher wurde im Zusammenhang mit Mammakarzinomen kaum über Polymorphismen des p21 Gens berichtet<sup>28;32;33</sup>.

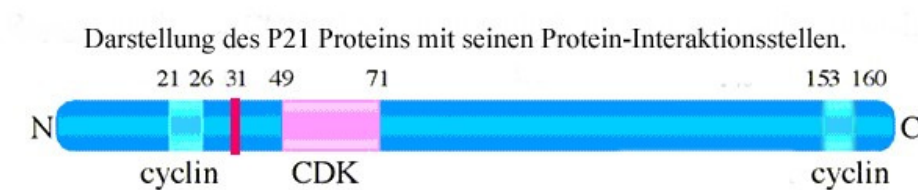


Abbildung 6: Das P21 Protein mit zwei seiner interaktiven Stellen<sup>36</sup>. An Codon 31 ist der untersuchte SNP lokalisiert

Wie schon erwähnt, wird durch Veränderung des p21 Gens der normale Reparaturmechanismus der Zelle geschwächt. Die Zelle kann nach Durchlaufen des p53 ‚Checkpoints‘ in der G1-Phase ungehindert Transkriptionsfaktoren der Familie E2F synthetisieren, obwohl die DNA Schäden nicht behoben sind.

Durch E2F werden die mRNAs der Proteine aktiviert, die wiederum für eine DNA-Synthese notwendig sind. Die Kontrolle über die Expression von E2F obliegt einigen Tumorsuppressorgen wie dem Retinoblastomgen (Rb-Gen, einem Inhibitor von E2F) und dem Onkogen Cyclin D1.

Diese Aktivierung ist der Beginn der S-Phase im Zellzyklus. In den etwa 8 Stunden dieser Phase läuft die DNA- und Histon-Synthese, einschließlich der Bildung des Centromers ab.

In der nachfolgenden G2-Phase werden die für die Mitose notwendigen Proteine synthetisiert. Auch kontrolliert das Zellsystem, ob die gesamte DNA korrekt repliziert wurde. Dieser Vorgang dauert in der humanen Zelle bis zu 12 Stunden.

Im Falle einer Unregelmäßigkeit verharrt die Zelle in der G2 Phase und tritt nicht in die Mitose-Phase über. Durch das Vorhandensein eines diploiden Chromosomensatzes führt nicht jede Veränderung des Erbgutes zu einer Schädigung oder zu einer Fehlfunktion der Zelle. Bei der Vererbung eines Polymorphismus, welcher die Funktionsweise beeinträchtigt, kann das parallele Gen (das Allel) das Defizit ausgleichen und die korrekte Wirkungsweise sicherstellen.

Erst beim Auftreten einer weiteren spontanen Veränderung dieses zweiten Allels, kommt es zu einem Ausfall oder zu einer Fehlfunktion der betroffenen Zelle.

Die in der vorliegenden Studie betrachtete Variante des p21 Gens ist der Single Nukleotide Polymorphism (SNP) S31R. Diese Veränderung der Gensequenz von AGC (Serotonin) zu AGA (Arginin) ist nach Lukas et al. mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für Brustkrebs assoziiert<sup>45</sup>. Neben den weiteren bekannten Varianten sind für diese Stelle auch Zusammenhänge mit einer Lungenkarzinomkrankung beschrieben<sup>67</sup>.

Für das p53 Gen sind 18 Zelllinienpolymorphismen bekannt. Für viele wurde ein Zusammenhang zu einer oder mehreren malignen Erkrankungen angegeben. Der Austausch von CGC (Arginin) zu CCC (Prolin) am Codon 72, das SNP R72P, wurde 1991 von Olschwang et al. erstmalig im Zusammenhang mit einer Kolonkarzinomkrankung beschrieben<sup>53</sup>.

2003 konnte von Dumont et al gezeigt werden, dass in Zelllinien mit homozygoten arg72 im Vergleich zu homozygoten pro72 oder

der heterozygoten Form, die Apoptose signifikant häufiger ausgelöst wurde<sup>25</sup>. Der Grund hierfür wird in einer besseren Bindungsfähigkeit zu den Mitochondrien vermutet. Für den p53 arg72pro Polymorphismus sind Zusammenhänge mit Lungen-, Zervix- und Mammakarzinomen beschrieben worden<sup>3;31;67</sup>.

Mit der vorliegenden Arbeit soll die folgende Frage beantwortet werden:

**Besteht eine Korrelation zwischen  
der p53 Gen Variante R72P/rs1042522 und  
der p21 Gen Variante S31R/ss4388499 und  
einer Mammakarzinom Erkrankung?**

Diese Frage wurde anhand einer Fallkontroll-Studie untersucht.

Die nachfolgenden weiteren Fragen wurden gestellt um eine Antwort auf die Bedeutung der Genmutation p53 (SNP R72P) und der Genmutation p21 (SNP S31R) beim Mammakarzinom zu bekommen.

## **1.1 Fragestellungen**

1. Gibt es Unterschiede zwischen dem Patientinnenkollektiv und dem Kontrollkollektiv hinsichtlich der Varianten S31R des p21 Gens und R72P des p53 Gens?
2. Gibt es Unterschiede zwischen der Erkrankungsdauer und der Auftretenshäufigkeit der Varianten R72P des p53 Gens und S31P des p21 Gens?
3. Gibt es Unterschiede zwischen der Tumorklassifikation (TNM-System) und der Auftretenshäufigkeit der Varianten R72P des p53 Gens und S31P des p21 Gens?

## **2 Material und Methode**

### **2.1 Art der Studie**

Es handelt sich um eine Fallkontrollstudie, der die Auswertung von 814 Fragebögen und von den zugehörigen Blutproben zugrunde liegen.

Patientinnen, die in dem Zeitraum von Mai 2000 bis November 2001 an der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Universität München - Innenstadt zur allgemeinen gynäkologischen Vorsorge, zur Brustkrebsvorsorge, zur Nachsorge nach histologisch gesichertem Brustkrebs oder zur Behandlung eines extern diagnostizierten Brusttumors kamen, wurden auf eine Studienteilnahme angesprochen.

Bei Interesse wurden von den Patientinnen Fragebögen ausgefüllt und das schriftliche Einverständnis gegeben.

Unter Zuhilfenahme des Tumorpasses und ggf. der Patientenakte wurde der Fragebogen für die statistische Bearbeitung ergänzt und wurde der Patientin 2x3ml venöses Blut in ein EDTA-Röhrchen (Primavette-S, Kabe Labortechnik) entnommen.

### **2.2 Datenbank und Definitionen**

Alle Daten wurden in einer Datenbank mit Microsoft Access 2000 erfasst.

Um die Datenerhebung zu erleichtern und um eine einheitliche Nomenklatur zu gewährleisten war das Eingabeformular in Haupt- und Untertabellen gegliedert.

Freitextfelder ermöglichten das Erfassen qualitativer Aussagen, wie z.B. histologische Klassifikation und Hormonsubstitution.

Bei Merkmalen, bei denen keine quantitativen Angaben gemacht werden mussten, wurden ‚Checkboxes‘ (Ja-Nein-Felder) in die

Tabelle integriert, z.B. um ‚Postmenopausal‘ oder ‚belastete Familienanamnese‘ zu erfassen.

Durch die Verwendung von Checkboxen und Freitextfeldern minimalisierten sich Eingabefehler wie auch der Eingabeaufwand.

Bei der Frage nach der genetischen Abstammung wurde entsprechend dem Patientinnenklientel eine Auswahl zwischen ‚Deutsch‘, ‚Türkisch‘, ‚Jugoslawisch‘ oder ‚sonstige‘ vom Eingabeformular angeboten.

## **2.3 Merkmalskatalog**

Im Folgenden werden die Daten näher erläutert, die erhoben wurden um den Merkmalskatalog zu erstellen:

Allgemeine Patientendaten (2.3.1) und die genetischen Abstammung der Eltern, der Postmenopausenstatus (2.3.2) und die Hormon- bzw. kompetitive Antagonisteneinnahme („Tamoxifen“) (2.3.3) wurden erfragt.

Des weiteren wurden Informationen bzgl. der familiären und der eigenen Malignombelastung erhoben, und ggf. nach den Daten des Tumors (2.3.4), etwa die der Erstdiagnose des Tumorleidens, der Klassifizierung und der Histologie, gefragt (7. Datenerhebungsbogen).

### **2.3.1 Allgemeine Patientendaten**

Das Geburtsdatum und die Initialen der Patientin wurde zur Kennzeichnung, aber auch zur Anonymisierung der Erhebungsbögen verwendet.

### **2.3.2 Alters- und Hormonstatus**

Aufgrund des Fallkontrollstudiendesigns wurden vor allem gesunde Patientinnen angesprochen, die der Altersverteilung der Karzinomgruppe entsprachen. Der Postmenopausenstatus wurde anamnestisch erhoben. Als postmenopausal wurde eine Patientin

bezeichnet, wenn ihre letzte Periode länger als 12 Monate zurücklag<sup>63</sup>.

Eine Hormontherapie (HRT) kann die Postmenopause durch induzierte Periodenblutungen maskieren. Andererseits wurde in der Karzinomgruppe die Hormonproduktion des Eierstocks u. U. durch eine Adnektomie, eine kompetitive Östrogenantagonisteneinnahme (z.B. Tamoxifen) oder durch eine Chemotherapie frühzeitig eingeschränkt oder beendet.

Da die Menopause durch Ovariectomie oder Hormoneinnahme beeinflusst wird, oder durch eine Hysterektomie kaschiert werden kann, wurde folgende Festlegung getroffen:

Wenn die Menopause bei Frauen ab dem 50. Lebensjahr nicht eindeutig festzulegen war, wurden sie als postmenopausal eingestuft, da 83% aller Teilnehmerinnen über 50 Jahre der Kontrollgruppe ohne Hysterektomie (HE) und ohne HRT angegeben hatten, in der Postmenopause zu sein.

### **2.3.3 Hormontherapie**

In diesem Feld wurde eine aktuelle Hormonersatztherapie und eine kompetitive Östrogenantagonisteneinnahme oder eine endokrine Tumorthherapie mit dem Generikum- oder Wirkstoffnamen erfasst.

### **2.3.4 Tumordaten**

Durch die Anamnese wurden Patientinnen mit maligner Zweiterkrankungen von der Studie ausgeschlossen.

#### **2.3.4.1 TNM Klassifikation**

Falls die Patientin an Brustkrebs erkrankt, bzw. die Erstdiagnose Mammakarzinom gestellt worden war, wurden weitere Daten bzgl. des Tumors (Tumor, Lymphknoten und Metastasierung: TNM) und der Nachsorge erhoben.

Das TNM System wurde 1981 von der WHO zur Tumorklassifikation eingeführt<sup>77</sup>. In den letzten Jahren wurde diese Einteilung mehrfach überarbeitet und liegt nun in der zweiten Version von 1998 vor:

|           |                                                                                                     |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>pT</b> | <b>Primärtumor</b>                                                                                  |
| pTis      | Carcinoma in situ: duktales oder lobuläres<br>M. Paget der Mamille ohne nachweisbaren Tumor         |
| pT1       | Tumor ≤ 2cm                                                                                         |
| pT1a      | Tumor ≤ 0,5 cm in größter Ausdehnung                                                                |
| pT1b      | Tumor zwischen 0,5 cm und 1cm                                                                       |
| pT1c      | Tumor zwischen 1 cm und 2 cm                                                                        |
| pT2       | Tumor zwischen 2 cm und 5 cm                                                                        |
| pT3       | Tumor größer als 5 cm                                                                               |
| pT4       | Tumor jeder Grösse mit direkter Ausdehnung auf die Brustwand oder die Haut,                         |
| pT4a      | mit Ausdehnung auf die Brustwand, nicht aber M. Pectoralis major                                    |
| pT4b      | mit Ödem, Ulzeration der Brusthaut oder Satelittenmetastasen der Haut auf der selben Seite          |
| pT4c      | Kriterien 4a und 4b                                                                                 |
| pT4d      | Inflammatorisches Karzinom                                                                          |
| <b>pN</b> | <b>Regionäre Lymphknoten</b>                                                                        |
| pNx       | Keine Beurteilung der LK möglich                                                                    |
| pN0       | Keine regionären LK befallen                                                                        |
| pN1       | Metastasen in beweglichen ipsilateralen axillären LK                                                |
| pN1a      | Nur Mikrometastasen (keine größer als 0,2 cm)                                                       |
| pN1b      | Metastasen in beweglichen ipsilateralen LK größer als 0,2 cm                                        |
| pN1bii    | Metastasen in 1-3 LK, zwischen 0,2 cm und 2 cm                                                      |
| pN1biii   | Metastasen in 4 oder mehr LK zwischen 0,2 und 2 cm                                                  |
| pN1biv    | Ausdehnung der Metastasen über die Lymphknotenkapsel aber kleiner als 2 cm                          |
| pN2       | Metastasen in ipsilateralen axillären LK, untereinander verbacken oder an andere Strukturen fixiert |
| pN3       | Metastasen in ipsilateralen LK entlang der A. mammaria interna                                      |
| <b>M</b>  | <b>Fernmetastasen</b>                                                                               |
| Mx        | Das Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden                                        |
| M0        | Keine Fernmetastasen                                                                                |
| M1        | Fernmetastasen                                                                                      |

Tabelle 1. Internationale TNM Klassifikation<sup>78</sup>

Im Falle eines invasiven Karzinoms, neben einem Carcinoma in situ (CIS) wurde nur der invasive Karzinomanteil und nicht das begleitende CIS vermerkt.

War bei der Erstdiagnose oder bei einem Rezidiv eine Lymphknoten (LK)-Metastase oder eine Organmetastase bekannt, so wurde dies zur effektiveren Datenverarbeitung zusätzlich in der Datenbank auf einem Ja/Nein Feld eingegeben.

### 2.3.4.2 Histologie

Nach der WHO Klassifikation ergibt sich für die histologische Tumorklassifikation nachfolgendes Schema:

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Nicht invasive Mammakarzinome</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| <ul style="list-style-type: none"><li>- Carcinoma duktales in situ (DCIS)</li><li>- Carcinoma lobuläre in situ (LCIS)</li></ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| <b>Invasive Mammakarzinome</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| <ul style="list-style-type: none"><li>- Invasives duktales Karzinom</li><li>- Invasives duktales Karzinom mit dominierender intraduktaler Komponente</li><li>- Invasives lobuläres Karzinom</li><li>- Muzinöses Karzinom</li><li>- Medulläres Karzinom mit Varianten:<ul style="list-style-type: none"><li>o Papilläres</li><li>o Tubuläres</li><li>o Adenoid-zystisches</li><li>o Sekretorisches</li><li>o Apokrines</li></ul></li><li>- Karzinom mit Metaplasie:<ul style="list-style-type: none"><li>o Lipid-sezernierendes</li><li>o Kleinzelliges</li><li>o Siegelringzell</li></ul></li><li>- Morbus Paget:<br/>intradermale Tumorzellmanifestation bei intraduktalem Karzinom</li></ul> |

Tabelle 2. Histologische Tumoreinteilung nach WHO<sup>77</sup>

Die histologische Klassifikation, das TNM und das Grading wurden aus den Krankenakten, der histologischen Diagnose, aus Arztbriefen oder Tumorpässen übernommen. Dabei war es ohne Belang, ob die Patientin unter Behandlung war oder sich in der Nachsorge befand. Die Diagnose wurde mit dem histologischen Nachweis gesichert und der zeitliche Beginn mit der Diagnosestellung erfasst. Dieser Zeitpunkt konnte auch, da es sich um eine retrospektive Studie handelt, Jahre zurückliegen.

### 2.3.4.3 Grading

Beim Zellgrading handelt es sich um eine Punktbewertung der Zelldifferenzierung erstmals von Bloom und Richards 1957 vorgestellt und u.a. von Elston und Ellis modifiziert<sup>11;30</sup>. Mammakarzinome werden danach in 3 „Grading Gruppen“ eingeteilt. In mehreren Studien wurde ein Zusammenhang zwischen Prognose und Chemosensibilität und dem histologischen

Grading festgestellt. Daher wird das Grading eines Tumors als Entscheidungshilfe für die weitere Therapie verwendet<sup>1;2;17;34</sup>.

|                                                                                                                                                                         |                                 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| <b>Tubuläre Differenzierung</b><br>Gut (meist reife Tubuli), >75%<br>Mäßig (unreife Tubuli), 10-75%<br>Gering oder fehlend, < 10%                                       | 1 Punkt<br>2 Punkte<br>3 Punkte |
| <b>Zellkernpolymorphie</b><br>Gering (überwiegend isomorphe Kerne)<br>Mäßig (mittelgradige Form- und Größenvariation)<br>Stark (hochgradige Form- und Größenvariation)  | 1 Punkt<br>2 Punkte<br>3 Punkte |
| <b>Mitoseanzahl</b><br>Anzahl der Mitosen in 10 HPF bei 400facher Vergrößerung<br><10 Mitosen<br>10-20 Mitosen<br>> 20 Mitosen                                          | 1 Punkt<br>2 Punkte<br>3 Punkte |
| <b>Bewertung</b><br>3-5 Punkte = gut differenziertes Karzinom, G1<br>6-7 Punkte = mäßig differenziertes Karzinom, G2<br>8-9 Punkte = wenig differenziertes Karzinom, G3 |                                 |

Tabelle 3. Internationale Klassifikation des Tumorzellgradings nach Elston und Ellis<sup>11;30</sup>

## 2.3.5 Die Analyse der Gene p53 und p21

### 2.3.5.1 Analysemethode

Nach der Blutabnahme wurden die Proben kurz geschüttelt um eine gleichmässige Vermengung mit dem Antikoagulantien zu sichern. Das abgenommene Blut wurde mit einer fortlaufenden Nummer gekennzeichnet, welche auf dem Einwilligungs- und Anamnesebogen vermerkt wurde. Innerhalb von 12h wurden die Proben auf -73°C gekühlt und bis zum Abtransport bei dieser Temperatur belassen. Zum Transport in das Analyselabor wurden die Proben auf Trockeneis von 78,5°C gelagert. Der Transport wurde von Worldcourier innerhalb von 48h vollzogen.

**Kommentar [FE5]:** Kein FEDEX Transport, Schreibweise laut Abholpapiere

Nach der Ankunft im Labor von Sequenom, San Diego, USA wurden die Proben auf Vollzähligkeit überprüft, die Proben anhand der Nummerierung mit den elektronisch übermittelten Anamnesedaten abgeglichen und für die Analyse auf Raumtemperatur erwärmt.

Die Proben wurden auf den Genort S31R des p21 Gens und auf den Genort R72P von p53 Gen untersucht und per Genchip die entsprechenden Abschnitte analysiert. Die Genanalyse selbst wurde mit einem sogenannten Genchip der Firma Sequenom, San Diego, USA, vorgenommen.

## 2.3.6 Material und Methode

### 2.3.6.1 Primer Design

Die Spectrodesigner Software (<http://www.sequenom.com/>) wurde verwendet um die PCR Primer zu designen, die den SNP flankieren und Produkte von 80-120bp Länge erzeugen. Die PCR Primer wurden so gewählt, dass sie mindestens 10bp vom SNP entfernt waren und bestimmte Kompositionskriterien erfüllten: G+C 40-70%, Mischung aus allen 4 Basen, Verteilung der Basen im Primer (maximal vier Wiederholungen derselben Base

hintereinander erlaubt). Die erstrebte Schmelztemperatur lag bei 60°C.

Der Extensionsprimer wurde so gewählt, dass er genau neben den SNP zum Liegen kam und die Extension über dem SNP vernünftige Abbruchprodukte ermöglicht. Die erstrebte Schmelztemperatur war 53°C. Alle Primer wurden darauf überprüft, dass sie nur einmal im Genom binden und nicht miteinander interagieren. Der PCR Primer, der den Strang komplementär zum Extensionsprimer erzeugt, wurde zusätzlich mit einer Universalsequenz versehen, die später den Einbau eines Biotinmoleküls ermöglichte.

#### **2.3.6.2 DNA Quantifizierung**

Genomische DNA Konzentrationen wurden mit Hilfe von Picogreen von Invitrogen (Carlsbad, USA) anhand des Herstellerprotokolls bestimmt. Zur Messung der Fluoreszenz wurde ein Ascent Fluoreszenzmesser verwendet (Aktivierung mit 485nm, Abstrahlung 538nm). Die DNA Proben wurden auf 5ng/µl gebracht, wovon 5 µl für die PCR verwendet wurden.

#### **2.3.6.3 PCR Protokoll**

Die PCR wurde unter standardisierten Bedingungen durchgeführt. Das Gesamtvolumen betrug 50µl, darin enthalten waren 25ng genomischer DNA, 1 Einheit der Taq-Polymerase (Hotstar Qiagen, Chatsworth), 200µmol von jedem dNTP, 25pmol des genspezifischen PCR Primers 1, 2pmol des genspezifischen PCR Primers 2 mit dem Universalsequenz und 10pmol des biotinylierten Universalsequenz Primers. Der PCR Primer 2 erzeugte den zum MassEXTEND Primer komplementären DNA Strang. Die Temperaturbedingungen waren wie folgt: eine anfängliche Denaturierung bei 95°C für 15 Minuten, gefolgt von 45 Zyklen bei 95°C für 20s, 56°C für 30s, und 72°C für 20s und abschließend 1 Zyklus bei 72°C für 3min.

### 2.3.6.4 Vorbereitung der Einzelstrang DNA für die MassEXTEND Reaktion

Die PCR Produkte wurden über den Biotinrest an streptavidin-beschichteten paramagnetischen Micropartikeln, so genannten Beads (Dyna, Oslo), immobilisiert. Danach wurde der Doppelstrang unter Verwendung von 50µl von 0,1M NaOH bei Raumtemperatur denaturiert. Nach Entfernung der NaOH Lösung und Neutralisation mit 10mM TrisHCl Lösung wurden die Beads mit den einzelsträngigen PCR Produkten für die MassEXTEND Reaktion verwendet.

### 2.3.6.5 Primer Extension Protokoll

MassEXTEND Reaktionen wurden mit Hilfe eines genspezifischen Extensionsprimers und einem SNP-spezifischen Nukleotid-Terminationsmix durchgeführt. Dieser Terminationsmix ermöglicht die Verlängerung der Primers oder den Abbruch des Stranges, je nach Nukleotid an der SNP-Stelle. Das Reaktionsvolumen war 15µl und enthielt 1 Einheit Thermosequenzase (Amersham, Pharmacia), 50µmol des entsprechenden Terminationsmixes und 10pmol des testspezifischen MassEXTEND Primers. Die Extensionsreaktion wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: eine initiale Denaturierung bei 80°C für 30s gefolgt von 3 Zyklen bei 45°C für 15 s und 72°C für 1 min.

Die Extensionsprodukte wurden mit Ammoniumhydroxyd solubilisiert. 15nl jeder Probe wurden dann mit einer piezoelektrischen Pipettiervorrichtung auf einen SpectoCHIP aufgetragen.

|                  | p21                  | p53                |
|------------------|----------------------|--------------------|
| Primer 1         | gtccgtcagaacccatgcgg | aagaccaggtccagatg  |
| Primer 2         | ctccagtgggtgcggtgac  | gcggtgtaggagctgctg |
| Extensionsprimer | cagcgagcagctgag      | gccagaggctgctccc   |
| Terminationsmix  | ddC ddG ddT dA       | ddA ddC ddT dG     |

Tabelle 4. Primer und Terminationsmixübersicht

### 2.3.6.6 MALDI-TOF Massenspektrometrie

Nachdem die Produkte mit der Matrix (3-hydroxy-picolinic Säure) auf dem 384-well Chip homogene Kristalle geformt hatten, wurde der Chip in einem MassARRAY Massenspektrometer (MS) (Bruker-Sequenom, San Diego, USA) vermessen. Hierzu wurden die Kristalle mit einem 337nm Laserimpuls beschossen. Dabei wurden die Extensionprodukte aus der Matrix gelöst, ionisiert und durch ein elektrisches Feld im Massenspektrometer beschleunigt. Die Geschwindigkeit war umgekehrt proportional zum Masse-Ladung Quotienten und je grösser die Masse (je länger die Produkte), desto länger war die Flugzeit (MALDI-TOF: Matrix-assisted Laser Desorption Ionization/Time-of-flight). Diese Massenspektren wurden digitalisiert und mit einer Software (SpectroTYPER) analysiert, die auf Algorithmen zur Baselinekorrektur, Peakidentifikation und Peakflächenkalkulation basiert. Zur Analyse der DNA der einzelnen Patientinnen wurde die selbe Methodik verwendet, jedoch nur eine DNA Menge von 2,5ng pro Patientin.

Die Nukleotidzusammensetzung des unmutierten p53 Gens ist unter <http://www.pubmed.com/><sup>52</sup> veröffentlicht und in folgender Tabelle auszugsweise wiedergegeben. Die in dieser Studie untersuchte Punktmutation am Nukleotid 72 wurde rot gekennzeichnet.

|             |             |            |             |
|-------------|-------------|------------|-------------|
| 5'-         |             |            |             |
| TGGAGGGCTG  | GGGACCTGGA  | GGGCTGGGGG | GCTGGGGGGC  |
| TGAGGACCTG  | GTCCTCTGACT | GCTCTTTTC  | ACCCATCTAC  |
| AGTCCCCCTT  | GCCGTCCCAA  | GCAATGGATG | ATTTGATGCT  |
| GTCCCCGGAC  | GATATTGAAC  | AATGGTTCAC | TGAAGACCCA  |
| GGTCCAGATG  | AAGCTCCCAG  | AATGCCAGAG | GCTGCTCCCC  |
| <b>C/G</b>  |             |            |             |
| CGTGGCCCCCT | GCACCAGCAG  | CTCCTACACC | GGCGGCCCCCT |
| GCACCAGCCC  | CCTCCTGGCC  | CCTGTCATCT | TCTGTCCCTT  |
| CCCAGAAAAC  | CTACCAGGGC  | AGCTACGGTT | TCCGTCTGGG  |
| CTTCTTGCAT  | TCTGGGACAG  | CCAAGTCTGT | GACTTGACACG |
| GTCAGTTGCC  | CTGAGGGGCT  | GGCTTCCATG | AGACTTCAAT  |

Tabelle 5. Auszug aus der p53 DNA Sequenz<sup>52</sup>

Hierbei stehen die angegebenen Buchstaben für den Anfangsbuchstaben des Nukleotides (Adenin, Guanin, Thymin und Cytosin). Drei Nukleotide codieren für eine Aminosäure im

Protein, bzw. für Start- oder Stop-Sequenzen innerhalb des Genoms.

Beim Menschen kommen jedoch nur 20 Aminosäuren vor. Die meisten Aminosäuren werden von mehreren Nukleotidkombinationen codiert. Dies erklärt, weshalb unterschiedliche genetische Codes zu denselben, funktionstüchtigen Proteinen führen können.

Die Häufigkeit derartiger ‚Schwankungen‘ werden für das p53 Gen in untenstehender Tabelle als sog. Allelhäufigkeit angegeben:

|                                             |       |
|---------------------------------------------|-------|
| Hardy-Weinberg Wahrscheinlichkeit:          | 0.855 |
| Geschätzte durchschnittliche Heterogenität: | 0.494 |

Diese Zahlen wurden von Thorisson und Nickerson anhand einer Analyse von 283 Proben auf <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> veröffentlicht.

Die geschätzte durchschnittliche Heterogenität gibt den Grad der Übereinstimmung der beiden Gene in einem humanen diploiden Chromosomensatz an.

Für die Position 72 ist die Verteilung für Cytosin und Guanin wie folgt:

|   |       |
|---|-------|
| C | 0.457 |
| G | 0.543 |

Dies bewirkt im Protein einen Austausch der Aminosäure Arginin zu Prolin<sup>70</sup>.

Das unmutierte p21 Gen ist wie folgt beschrieben:

|            |            |            |
|------------|------------|------------|
| 5'-        |            |            |
| GGCCTCCTGT | GGGAAGGAAG | CAGGAAGACC |
| AGCTGGAAGG | AGTGAGAGAG | ACCCTCTGGT |
| AGGAAGACGT | CACCTGAGGT | GACACAGCAA |
| AGCCCGGCCA | GGTAACATAG | TGTCTAATCT |
| CCGCCGTGAC | CAGGGCCTTC | CTTGTATCTC |
| TGCTGCAGGC | GCCATGTCAG | AACCGGCTGG |
| GGATGTCCGT | CAGAACCCAT | GCGGCAGCAA |
| GGCCTGCCGC | CGCCTCTTCG | GCCCAGTGGA |
| CAGCGAGCAG | CTGAG C/A  |            |
| CGCGACTGTG | ATGCGCTAAT | GGCGGGCTGC |
| ATCCAGGAGG | CCCGTGAGCG | ATGGAAGTTC |
| GACTTTGTCA | CCGAGACACC | ACTGGAGGGT |
| GACTTCGCCT | GGGAGCGTGT | GCGGGGCCTT |
| GGCCTGCCCA | AGCTCTACCT | TCCCACGGGG |
| CCCCGGCGAG | GCCGGGATGA | GTTGGGAGGA |
| GGCAGGCGGC | CTGGCACCTC | ACCTGCTCTG |
| CTGCAGGGGA | CAGCAGAGGA | AGACCATGTG |
| GACCTGTCAC | TGTCT      |            |

Tabelle 6. Auszug aus der Sequenz des p21 Gens<sup>52</sup>

In der Nukleotidsequenz des Genes p21 werden zum einen eine Mutation von Cytosin nach Thymin in der 3' untranslated Region, 20bp vor einem Stop Codon beschrieben, sowie ein Ersatz des Cytosin (C) durch Adenin (A) im Codon 31.

Die Verteilung dieser beiden Allele wird angegeben mit:

|   |       |
|---|-------|
| A | 0.248 |
| C | 0.752 |

Die Änderung im Codon führt zu einem Austausch der Aminosäure Seronin durch Arginin im Protein.

Diese Punktmutation wurde in unserer Studie genauer untersucht und die betreffende Stelle in der Nukleotidsequenz mit rot markiert.

In Analogie wurde über einen Zusammenhang zwischen der Variante an der Position 94 von Adenin zu Thyminidin und Brustkrebs berichtet<sup>36</sup>.

Insgesamt gilt für das p21 Gen die untenstehende Verteilung (Probenanzahl n=568):

|                                             |       |
|---------------------------------------------|-------|
| Hardy-Weinberg Wahrscheinlichkeit:          | 0.979 |
| Geschätzte durchschnittliche Heterogenität: | 0.450 |

Zur Veranschaulichung des räumlichen Aufbaus, der durch die beiden Gene codierten Proteine, sind die Strukturen in Abbildung 3 und Abbildung 5 dargestellt.

**Kommentar [FE6]:** Doppelpunkt

## **2.3.7 Studienprozess am Patienten und Studienkriterien**

### **2.3.7.1 Aufklärung und Einverständnis**

In einem ausführlichen Gespräch wurde den Patientinnen das Ziel der vorliegenden Studie und der Wirkmechanismus der zu untersuchenden Gene erklärt.

Durch das Unterschreiben der Zustimmungserklärung bestätigte die Patientin die Aufklärung verstanden zu haben und erteilte ihr Einverständnis für das von der Ethikkommission geprüfte und genehmigte Studienprotokoll.

### **2.3.7.2 Blutentnahme**

Es wurde 2 x 3 ml EDTA Blut entnommen. Die Proben wurden mit der Studiennummer der Patientin versehen und am selben Tag bei -70°C bis zum Abtransport eingefroren.

Die gesammelten Proben wurden per Kurier in Trockeneis nach San Diego zur Genanalyse an die Firma Sequenom versandt und die zugehörigen Patientendaten wurden elektronisch verschlüsselt per Email an das Labor übermittelt. Nach dem Eintreffen der Proben wurden diese auf Vollständigkeit kontrolliert, den klinischen Daten zugeordnet und die Analyse durchgeführt.

### **2.3.7.3 Studienkriterien**

Die Kriterien zum Einschluß in die Studie waren eine Erkrankung an Brustkrebs und das Fehlen eines Zweitmalignoms für die Karzinomgruppe, bzw. das Fehlen irgendeiner malignen Erkrankung bei den Patientinnen der Kontrollgruppe.

Zum Zwecke der besseren Vergleichbarkeit wurden Matched Pairs mit den Kriterien der selben Abstammung und einem Altersunterschied von max. +/- 3Jahren gebildet.

Bei Abschluss der Rekrutierung waren in der Karzinomgruppe 427 Patientinnen und in der Kontrollgruppe 387 Patientinnen. Aufgrund von fehlenden Angaben in der Anamnese, nicht ausreichender Probenmenge, sowie fehlendem Matched Pair Partner oder bekannter belastender Familienanamnese wurden 275 Proben je Gruppe versandt und analysiert.

Nach Erhalt der Analyseergebnisse konnten 247 Matched Pairs mit vollständigen Anamnese- und Analysedatensätzen gebildet werden. Die statistische Auswertung der Analyseergebnisse erfolgte unter Verwendung der Software SPSS 11.0 (Version 2001) von SPSS Inc.

### 3 Ergebnisse

Die vorliegende Studie rekrutierte von Mai 2000 bis November 2001 Mammakarzinom- und Kontrollpatientinnen.

Insgesamt beantworteten 427 Patientinnen mit einem histologisch gesicherten Mammakarzinom und 387 Patientinnen ohne eine Karzinomerkrankung den Fragebogen. Bei jeweils 275 Patientinnen jeder Gruppe wurden die genetischen Untersuchungen durchgeführt. Wir erhielten hierbei insgesamt von 512 Patientinnen (259 der Karzinom-; 253 der Kontrollgruppe) ein auswertbares Ergebnis an den beiden Gen Loci.

#### 3.1 Abstammung

Um genetische Faktoren ausschließen zu können, die auf ethnische Unterschieden beruhen, war nach der Abstammung der Eltern gefragt worden. Die meisten Patientinnen waren deutscher Abstammung wie der Tabelle 7 zu entnehmen ist.

Aufgrund der fehlenden Matched Pairs oder der geringen Fallzahl wurden Patientinnen anderer Abstammung von der Auswertung ausgeschlossen, so dass die vorliegende Arbeit jeweils 275 deutsch-stämmige Patientendaten in der Karzinom- und der Kontrollgruppe untersuchte und verglich.

| <b>Abstammung</b>         | Karzinomgruppe | Kontrollgruppe |
|---------------------------|----------------|----------------|
| Spanisch/Spanisch         | 1              | 0              |
| Griechisch/Griechisch     | 1              | 3              |
| Deutsch/Deutsch           | 391            | 336            |
| Holländisch/Holländisch   | 1              | 0              |
| Sonstige/Sonstige         | 9              | 14             |
| Türkisch/Türkisch         | 3              | 6              |
| Jugoslawisch/Jugoslawisch | 19             | 26             |
| Tschechisch/Tschechisch   | 0              | 2              |
| <b>Summe</b>              | 427            | 387            |

Tabelle 7. Aufteilung der Patientinnen nach familiärer Abstammung

### 3.2 Familienanamnese

Alle Studienteilnehmerinnen wurden bzgl. Tumorerkrankungen bei blutsverwandten Angehörigen bis zum 2. Verwandschaftsgrad befragt.

| Familiäre Belastung mit | Karzinomgruppe | Kontrollgruppe |
|-------------------------|----------------|----------------|
| Mammakarzinom           | 62 (14,52%)    | 38 (9,82%)     |
| Sonstige Karzinome      | 156 (36,53%)   | 129 (33,33%)   |

Tabelle 8. Familienanamnese maligner Erkrankungen

Wie zu erwarten – siehe Tabelle 8 – war die Anzahl mit einer familiären Belastung für maligne Erkrankungen in der Gruppe der Karzinompatientinnen (51,05%) im Vergleich zur Kontrollgruppe (43,15%) größer. Dieser Unterschied war noch eindeutiger, betrachtete man nur die familiäre Mammakarzinombelastung (14,52% versus 9,82%).

### 3.3 Alter und Erkrankungsdauer der Patientinnen im Gesamtkollektiv

Das Durchschnittsalter der Kontrollgruppe war mit 55,25 Jahren (min. 19 Jahre, max. 87 Jahre; Fallzahl n=275) vergleichbar mit den 59,44 Jahren (min. 22 Jahre, max. 87 Jahre; Fallzahl n=275) der Karzinompatientinnen.

Die durchschnittliche Erkrankungsdauer gerechnet ab dem Stellen der Erstdiagnose Mammakarzinom betrug 47,16 Monate. (min. 0 Monate, max. 301 Monate).

Bei Betrachtung der Patientinnen bei denen Lymphknotenmetastasen (Nodal positiv) bekannt waren, ergab sich ein Durchschnittsalter von 59 Jahren (min. 27 Jahre, max. 87 Jahre) und eine mittlere Erkrankungsdauer von 41,03 Monaten (min. 0 Monate, max. 300 Monate). Für Nodal negative Patientinnen errechnete sich das Durchschnittsalter mit 60,40 Jahren (min. 22 Jahre, max. 84 Jahre)

und die Erkrankungsdauer mit 53,65 Monate (min. 0 Monate, max. 301 Monate).

### 3.4 Postmenopausenstatus und Hormontherapie

Von den befragten Patientinnen gaben in der Kontrollgruppe 175 (63,6%) und in der Karzinomgruppe 226 Patientinnen (82,2%) an, postmenopausal zu sein.

Eine Hormonersatztherapie erhielten in der Kontrollgruppe von 80 (29,1%) Patientinnen. Während in der Karzinomgruppe nur 17 (6,2%) Patientinnen Hormone substituierten.

Eine Östrogenantagonisteneinnahme (z.B. Tamoxifen, Aromatasehemmer) wurden in der Karzinomgruppe von 54 (19,6%) Patientinnen eingenommen. Keine der Patientinnen aus der Kontrollgruppe gab eine Einnahme von Östrogenantagonisten an.

| Menopausenstatus                            | Karzinomgruppe | Kontrollgruppe |
|---------------------------------------------|----------------|----------------|
| Prämenopausal                               | 49 (17,8%)     | 100 (36,4%)    |
| Postmenopausal                              | 226 (82,2%)    | 175 (63,3%)    |
| Hormontherapie                              | 17             | 100            |
| Östrogenantagonisteneinnahme                | 60             | 0              |
| <b>Menopausenstatus<br/>(Matched Pairs)</b> |                |                |
| Prämenopausal                               | 42 (15,3%)     | 84 (30,5%)     |
| Postmenopausal                              | 205 (74,6%)    | 163 (59,3%)    |
| Gesamt (275)                                | Karzinomgruppe | Kontrollgruppe |
| Hormontherapie                              | 17             | 80             |
| Östrogenantagonisteneinnahme                | 54             | 0              |

Tabelle 9. Menopausenstatus und Hormontherapie bei Karzinomerkrankung und in der Kontrollgruppe

### 3.5 Tumordaten

#### 3.5.1 Allgemeine klinische und biochemische Angaben zur Karzinomgruppe

In der untenstehenden Tabelle 10 sind die Basisdaten der Patientinnen und ihres Mamma-Karzinoms zusammengefaßt.

|                                          |     |
|------------------------------------------|-----|
| <b>Karzinomgruppe</b>                    | 275 |
| <b>Alter</b>                             |     |
| ≤ 40                                     | 10  |
| > 40                                     | 265 |
| <b>Durchschnittsalter Karzinomgruppe</b> |     |
| < 59,44                                  | 132 |
| ≥ 59,44                                  | 143 |
| <b>Lymphknotenbeteiligung</b>            |     |
| LK +                                     | 101 |
| LK -                                     | 174 |
| <b>Histologisches Grading</b>            |     |
| Gut/mittelmässig differenziert           | 210 |
| Schlecht differenziert                   | 45  |
| <b>Tumorgroße</b>                        |     |
| ≤ 2cm                                    | 192 |
| > 2cm                                    | 71  |

Tabelle 10. Allgemeine klinische und biochemische Angaben der Karzinomgruppe

Die Patientinnen waren durchschnittlich 59,4 Jahre alt. Die Mehrheit hatte einen, gut bis mittelmäßig differenzierten, bis 2 cm großen Tumor ohne Lymphknotenbefall.

### 3.5.2 TNM Stadium

Die Tabelle 11 zeigt die Zusammenstellung der TNM Klassifikation aller eingesendeten 275 Patientinnen:

| <b>pT</b>    | <b>Anzahl</b> | <b>Anteil (%)</b> |
|--------------|---------------|-------------------|
| pTis         | 8             | 2,9               |
| pT1          | 19            | 6,9               |
| pT1a         | 18            | 6,6               |
| pT1b         | 61            | 22,1              |
| pT1c         | 96            | 34,8              |
| pT2          | 65            | 23,6              |
| pT2b         | 2             | 0,8               |
| pT3          | 2             | 0,8               |
| pT4          | 1             | 0,4               |
| pT4 b        | 3             | 1,1               |
| <b>Summe</b> | <b>275</b>    | <b>(100)</b>      |
| <b>pN</b>    | <b>Anzahl</b> | <b>Anteil (%)</b> |
| pN0          | 174           | 63,3              |
| pN1          | 11            | 4                 |
| pN1a         | 4             | 1,5               |
| pN1b         | 7             | 2,5               |
| pN1bi        | 17            | 6,2               |
| pN1bii       | 5             | 1,8               |
| pN1biii      | 38            | 13,8              |
| pN1biv       | 9             | 3,3               |
| pN2          | 8             | 2,9               |
| pNx          | 2             | 0,7               |
| <b>Summe</b> | <b>275</b>    | <b>(100)</b>      |
| <b>M</b>     | <b>Anzahl</b> | <b>Anteil (%)</b> |
| M0           | 255           | 92,7              |
| M1           | 18            | 6,7               |
| M2           | 1             | 0,3               |
| Mx           | 1             | 0,3               |
| <b>Summe</b> | <b>275</b>    | <b>(100)</b>      |

Tabelle 11. Verteilung des TNM Stadiums der Mammakarzinome in der vorliegenden Studie

#### 3.5.2.1 Tumorgröße

73,4% der Mammakarzinome (pTis bis pT1c) hatten zum Zeitpunkt der Diagnose eine Größe bis 2 cm erreicht.

Insgesamt errechnete sich eine mittlere Tumorgröße von 2,4 cm.

#### 3.5.2.2 Lymphknotenmetastasen

174 der 275 Karzinompatientinnen (63,3%) hatten keine Lymphknotenmetastase. Bei 101 der an einem Mammakarzinom

Erkrankten (36,7%) war ein Befall eines oder mehrerer Lymphknoten angegeben worden. Der häufigste Befund: ‚pN1biii‘ entspricht Metastasen in 4 oder mehr LK zwischen 0,2 und 2 cm.

### 3.5.2.3 Organmetastasen

Bei 20 (7,3%) Patientinnen waren Organmetastasen diagnostiziert worden.

| Organsystem             | Anzahl | Anteil (%) |
|-------------------------|--------|------------|
| Knochenmetastasen       | 11     | 55         |
| Lebermetastasen         | 3      | 15         |
| Lunge                   | 2      | 10         |
| ZNS                     | 1      | 5          |
| Abdomen                 | 1      | 5          |
| Hautmetastasen          | 1      | 5          |
| Mediastinale Metastasen | 1      | 5          |
| <b>Summe</b>            | 20     | 100        |

Tabelle 12. Organmetastasenverteilung

Dabei hatten 4 (1,45%) Patientinnen mehr als ein befallenes Organsystem. Am häufigsten fanden sich Knochen- (55%), Leber- (15%) und Lungenmetastasen (10%).

Diese Ausbreitung entspricht dem bekannten Metastasierungsmuster des Mammakarzinoms.

### 3.5.3 Histologie

Die Anzahl der Carcinoma in situ (CIS) ist mit insgesamt 11 Fällen sehr niedrig.

Wie eingangs schon erwähnt, wurde das CIS nur dokumentiert, wenn kein invasives Karzinom in der Histologie angegeben worden war.

Bei den feingeweblichen Befunden innerhalb der Karzinomgruppe ergab sich folgende Aufteilung:

| <b>Histologie</b> | <b>Anzahl</b> | <b>Prozentanteil</b> |
|-------------------|---------------|----------------------|
| Adeno Karzinom    | 2             | 0,73                 |
| Carcinoma in Situ | 2             | 0,73                 |
| DCIS              | 8             | 2,90                 |
| LCIS              | 1             | 0,37                 |
| Gallert           | 1             | 0,37                 |
| Inflammatorisch   | 2             | 0,73                 |
| Papillär          | 5             | 1,81                 |
| Duktal            | 124           | 45,1                 |
| Ductulo-lobulär   | 9             | 3,27                 |
| Komodo            | 2             | 0,73                 |
| Lobuläre          | 68            | 24,70                |
| M. Paget          | 1             | 0,37                 |
| Meduläre          | 6             | 2,18                 |
| Muzinöse          | 4             | 1,46                 |
| Szirrhös          | 15            | 5,45                 |
| Szirrhös-duktal   | 19            | 6,90                 |
| Tubuläre          | 6             | 2,19                 |
| <b>Summe</b>      | <b>275</b>    | <b>(100)</b>         |

Tabelle 13. Histologische Verteilung der Mammakarzinome

Wie anhand der Gegenüberstellung der Zahlen aus dem „Manual des Tumorzentrums München (TZM) mit Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge für Mammakarzinome“<sup>62</sup> (Tabelle 14) zu entnehmen ist, ist die Anzahl der ‚seltenen‘ histologischen Subtypen relativ hoch im Vergleich zum ‚normalen‘ duktalem Mammakarzinom.

So sind in den Studiendaten jeweils 3 Patientinnen mit einem histologisch gesicherten Morbus Paget und einem inflammatorischen Mammakarzinom erfasst.

| <b>Histologischer Typ</b> | <b>Häufigkeit laut TzM</b> | <b>Anzahl im Kollektiv ohne M. Paget und CIS</b> |
|---------------------------|----------------------------|--------------------------------------------------|
| Duktales Karzinom         | 65-80%                     | 169 (65%)                                        |
| Lobuläres Karzinom        | 6-15%                      | 68 (26,2%)                                       |
| Meduläres Karzinom        | 3%                         | 6 (2,3%)                                         |
| Tubuläres Karzinom        | 1-15%                      | 6 (2,3%)                                         |
| Muzinöses Karzinom        | 1-2%                       | 4 (1,5%)                                         |
| Papilläres Karzinom       | 1-7%                       | 5 (1,9%)                                         |
| M. Paget/inflamm          |                            | 3                                                |
| Carcinoma in situ         |                            | 11                                               |
| <b>Summe</b>              |                            | <b>275</b>                                       |

Tabelle 14. Häufigkeiten der histologischen Diagnose<sup>62</sup>

### 3.5.4 Grading

Bei den 275 eingesandten Tumoren ist eine Anhäufung von G2 Tumoren zu Lasten der als G3 bewerteten zu erkennen. Die Studienzahlen werden in Tabelle 15 mit den Daten aus dem Tumorzentrum München dargelegt<sup>62</sup>.

| <b>Grading</b>  | <b>Anzahl</b> | <b>Tumorzentrum München</b> |
|-----------------|---------------|-----------------------------|
| G1              | 31 (11,27%)   | 8,5%                        |
| G2              | 179 (65%)     | 55,4%                       |
| G3              | 45 (16,36%)   | 36,1%                       |
| Nicht angegeben | 20 (7,27%)    |                             |

Tabelle 15. Tumorigrading

### 3.6 Genanalyse

#### 3.6.1 Klinische und biochemische Angaben der Kontroll- und Karzinomgruppe

Das Ziel der Analyse war die Überprüfung eines Zusammenhangs zwischen den beiden Genen p53 und p21 mit den beiden Varianten R72P (Exon 4) und S31R (Exon 2) und einer Mammakarzinomerkrankung.

|                                                       |          | Karzinomgruppe               | Kontrollgruppe               |
|-------------------------------------------------------|----------|------------------------------|------------------------------|
| <b>Altersrange Matched Pairs</b> (Durchschnittsalter) |          | 22-87 (59,26) Jahre<br>n=275 | 23-87 (58,36) Jahre<br>n=275 |
| <b>p53</b>                                            |          | Anzahl (Prozent)             | Anzahl (Prozent)             |
| P53<br>R72P                                           | CC       | 17 (6,18%)                   | 14 (5,09%)                   |
|                                                       | CG       | 108 (39,27%)                 | 103 (37,46%)                 |
|                                                       | GG       | 138 (50,18%)                 | 137 (49,82%)                 |
|                                                       | Fehlende | 12 (4,36%)                   | 21 (7,36%)                   |
| <b>p21</b>                                            |          |                              |                              |
| P21<br>S31R                                           | CA       | 45 (16,36%)                  | 28 (10,18%)                  |
|                                                       | CC       | 228 (82,91%)                 | 244 (88,73%)                 |
|                                                       | Fehlende | 2 (0,73%)                    | 2 (0,73%)                    |

Tabelle 16. Klinische und biochemische Angaben der Kontroll- und Karzinomgruppe

In obiger Tabelle sind das Alter der Jüngsten und Ältesten Patientin, Durchschnittsalter, Menopausenstatus und die analysierten Allelformen (CC, CG und GG bzw. CA und CC) zum besseren Vergleich gegenübergestellt.

Um die Mutationsangaben zu überprüfen wurde in einem nächsten Schritt eine Gegenprobe zu den bekannten Häufigkeitsangaben gemacht. (siehe 3.6.2)

#### 3.6.2 Gegenkontrolle

Um systematische Fehler auszuschließen wurden die aufgetretenen Genotypen mit der Hardy Weinberg Gleichung in der Kontrollgruppe verglichen.

Die Angaben hierzu sind in untenstehender Tabelle 17 zusammengestellt:

|     | <b>A. freq</b> | <b>D</b>     | $\chi^2$ | <b>P-Wert</b> |
|-----|----------------|--------------|----------|---------------|
| p21 | 0.9486166      | -0.002640254 | 0.742309 | 0.3889222     |
| p53 | 0.7371542      | -0.009799403 | 0.647144 | 0.4211356     |

Tabelle 17. Gegenkontrolle der Genotypen

Daraus zeigt sich, dass das Studienkollektiv keine signifikante Abweichung zu anderen Untersuchungen ergab<sup>52</sup>.

Zudem zeigt die Tabelle die beobachtete relative Allelehäufigkeit (A.freq) für jedes der beiden analysierten SNPs (R72P und S31R).

### 3.6.3 Analyseergebnisse

Die 550 eingesandten und analysierten Blutproben ergaben, aufgeteilt in die beiden Gruppen, die in Tabelle 18 aufgeführten Ergebnisse.

Insgesamt waren in der Karzinomgruppe 256 Proben und in der Kontrollgruppe 253 Proben für beide Genloci auswertbar.

Die Häufigkeit der Genotypen und die Ergebnisse bzgl. der Hypothese sind in Tabelle 18 aufgeführt.

Bei der p21 Genvariante (CA) ist ein signifikanter Zusammenhang zur Erkrankung an einem Mammakarzinom feststellbar.

In beiden Gruppen waren die Fehlquoten zwischen 1-8% pro Analysegruppe.

In der folgenden Aufstellung aller eingesandten Proben, wurden die auswertbaren Ergebnisse mit einem  $\chi^2$ -Test auf Signifikanz getestet. Die Ergebnisse sind ebenfalls aus Tabelle 18 zu entnehmen.

|                        | Karzinomgruppe | Kontrollgruppe | Test Statistik                         |
|------------------------|----------------|----------------|----------------------------------------|
| <b>p21 (CC)</b>        | 228 (83,5%)    | 244 (89,7%)    | $\chi^2_1=4,499$<br><b>P=0,03391</b>   |
|                        |                |                | Fisher exakt Test:<br><b>P=0,04366</b> |
| <b>p53 (CC)</b>        | 17 (6,3%)      | 14 (5,5%)      | $\chi^2_2=0,11$<br>P=0,94502           |
| (CG)                   | 108 (41,1%)    | 103 (40,5%)    | nicht signifikant                      |
| (GG)                   | 138 (52,6%)    | 137 (54%)      |                                        |
|                        |                |                |                                        |
| <b>p21:p53 (CC:GG)</b> | 115 (44,9%)    | 121 (48,2%)    | nicht signifikant                      |
| (CC:CG)                | 91 (35,5%)     | 92 (36,6%)     |                                        |
| (CC:CC)                | 12 (4,7%)      | 12 (4,8%)      | nicht signifikant                      |
| (CA:CC)                | 5 (2%)         | 3 (1,1%)       | $\chi^2_5=4,5$<br>P=0,48022            |
| (CA:CG)                | 15 (6,2%)      | 10 (4%)        | nicht signifikant                      |
| (CA:GG)                | 23 (9%)        | 13 (5,2%)      | nicht signifikant                      |

Tabelle 18. Häufigkeit der einzelnen Mutationen und  $\chi^2$ -Testung gegenüber dem gesunden Kontrollkollektiv

Um eine Verbindung zwischen den Genotypen der einzelnen SNPs und dem Mammakarzinom zu untersuchen wurde ein einfacher  $\chi^2$ -Test durchgeführt.

Unter Verwendung eines normalen Signifikanzlevels von  $\alpha= 0.05$  ergab sich eine statistische Signifikanz für das untersuchte p21 wild type (CC) Allel und einer Erkrankung am Mammakarzinom (Tabelle 18).

Hierbei zeigten die Karzinomfälle eine erhöhte Anzahl von CA Genotypen im Vergleich zu den Kontrollen. Zur Sicherung dieser Aussage wurde ein ‚Fischer-Exakt-Test‘ durchgeführt, welcher bessere Ergebnisse bei niedrigen Fallzahlen zeigt. Dieser Test bestätigte die Signifikanz (P=0,04366).

Zusätzlich zur einzelnen Signifikanztestung wurde auch die Kombination der beiden SNPs getestet, um mögliche interaktive Effekte aufzuzeigen. Diese Kombination zeigte keine Signifikanz im durchgeführten  $\chi^2$ -Test. Dies wurde auch mit einem ‚Fischer exakt Test‘ und über ein modelliertes general linear Model untersucht, die den  $\chi^2$ -Test bestätigten.

Die Ergebnisse sind detailliert in der Tabelle 18 aufgeführt. Es lässt sich somit erkennen, dass nur bei den CC Allelen des p21 Gens ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe besteht.

Das p53 Gen oder auch die Kombination beider Genorte lässt keine Rückschlüsse auf ein erhöhtes Erkrankungsrisiko für Brustkrebs erkennen.

#### **3.6.4 Erkrankungsdauer und Polymorphismus**

Die Ergebnisse wurden anhand der Patientendaten darüber hinaus nach dem Erkrankungsalter aufgeschlüsselt.

Hiermit sollte eine Aussage getroffen werden, ob Patientinnen mit einer langen oder kurzen Diagnosedauer eine erhöhte Rate an Varianten an den entsprechenden Allelen aufwiesen.

| Erkrankungsdauer<br>in Monaten | Anzahl der<br>Karzinome/<br>Kontrollen | p21<br>(CA)                       | (CC)  | p53<br>(CG)                       | (CC) | (GG)  | p21:p53<br>(CA:CC/CG)            |
|--------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------|-------|-----------------------------------|------|-------|----------------------------------|
| <b>≥61</b>                     | 73/73                                  | 10/7                              | 63/65 | 32/27                             | 8/3  | 30/40 | 6/5                              |
| Test Statistik                 |                                        | $\chi^2_1=0,55379$<br>$P=0,45677$ |       | $\chi^2_1=2,85714$<br>$P=0,09097$ |      |       | nicht signifikant                |
| <b>49-60</b>                   | 10/10                                  | 1/1                               | 9/9   | 3/6                               | 0/0  | 7/1   | 0/0                              |
| Test Statistik                 |                                        | nicht<br>signifikant              |       | nicht signifikant                 |      |       | nicht signifikant.               |
| <b>37-48</b>                   | 20/20                                  | 3/1                               | 16/18 | 9/10                              | 0/0  | 11/10 | 1/1                              |
| Test Statistik                 |                                        | $\chi^2_1=1,1765$<br>$P=0,29043$  |       | nicht signifikant                 |      |       | nicht signifikant                |
| <b>25-36</b>                   | 22/22                                  | 4/1                               | 18/21 | 6/8                               | 1/1  | 14/10 | 1/1                              |
| Test Statistik                 |                                        | $\chi^2_1=2,03077$<br>$P=0,15414$ |       | nicht signifikant                 |      |       | nicht signifikant                |
| <b>13-24</b>                   | 39/39                                  | 6/4                               | 32/35 | 20/15                             | 2/0  | 15/22 | 3/1                              |
| Test Statistik                 |                                        | $\chi^2_1=0,52143$<br>$P=0,47023$ |       | $\chi^2_1=0,81873$<br>$P=0,36556$ |      |       | nicht signifikant                |
| <b>≤12</b>                     | 81/81                                  | 18/11                             | 63/70 | 33/28                             | 5/6  | 42/41 | 9/3                              |
| Test Statistik                 |                                        | $\chi^2_1=2,05808$<br>$P=0,15140$ |       | $\chi^2_1=0,07306$<br>$P=0,78694$ |      |       | $\chi^2_1=3,24000$<br>$P=0,0716$ |

Tabelle 19. Aufschlüsselung nach Erkrankungsdauer der Karzinomgruppe und Varianten der gesammelten matched pair Daten.

In obiger Tabelle werden die Varianten der Karzinom- und Kontrollproben entsprechend der Erkrankungsdauer der Patientin aufgelistet. Zur Testung wurden die beiden Patientengruppen über einen  $\chi^2$ -Test geprüft. Die Ergebnisse finden sich in der unmittelbar anschliessenden Spalte. Zur Erläuterung wird p53 (GG) gegen p53 Gen (nicht GG) bei einer Erkrankungsdauer von weniger als 12 Monaten getestet. Der  $\chi^2$ -Test ergibt ein  $\chi^2=0,07306$  und  $P=0,78694$  und somit keinen signifikanten Unterschied.

Es ist festzustellen, dass in keiner der Untergruppen ein signifikanter Zusammenhang zwischen den Varianten und der Erkrankungsdauer zu finden ist.

### **3.6.5 Alter und Polymorphismus**

#### **3.6.5.1 Alter und Polymorphismus: Gesamtkollektiv**

Um Einflüsse des Alters auf den Polymorphismus zu überprüfen, wurden die Patientinnen anhand ihres Alters in Subgruppen eingeteilt. Diese Subgruppen wurden hinsichtlich eines Zusammenhanges zwischen dem Lebensalter und der Varianten geprüft. Die erhöhte Anzahl der Subgruppe der 50-59 und 60-69 jährigen entspricht der typischen Altersverteilung des Mammakarzinoms.

Es konnte kein Zusammenhang zwischen den untersuchten Allelen in den Alterssubgruppen und einer Erkrankung an einem Mammakarzinom gefunden werden.

### 3.6.5.2 Alter und Polymorphismus: Matched Pairs

| Alter in Jahren | Durchschnitts-<br>alter Karzinome/<br>Kontrolle | Erkrankungs-<br>dauer<br>in Monaten | Anzahl der<br>Karzinome/<br>Kontrolle | p21<br>(CA)                       | (CC)  | p53<br>(CG) | (GG)                              | (CC) | p21:p53<br>(CA:CC/CG) |
|-----------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|-------|-------------|-----------------------------------|------|-----------------------|
| ≤ 39            | 33,80/35,50                                     | 11,5                                | 10/10                                 | 1/0                               | 9/10  | 1/2         | 9/5                               | 0/1  | 0/0                   |
| Test Statistik  |                                                 |                                     |                                       | $\chi^2_1=1,05263$<br>$P=0,30490$ |       |             | nicht signifikant                 |      |                       |
| 40 - 49         | 45,43/43,70                                     | 38,6                                | 30/30                                 | 6/1                               | 24/28 | 11/12       | 15/15                             | 3/0  | 0/1                   |
| Test Statistik  |                                                 |                                     |                                       | $\chi^2_1=2,4454$<br>$P=0,11808$  |       |             | nicht signifikant                 |      |                       |
| 50 - 59         | 54,84/52,84                                     | 42,21                               | 74/74                                 | 13/6                              | 60/67 | 25/39       | 40/25                             | 5/0  | 6/1                   |
| Test Statistik  |                                                 |                                     |                                       | $\chi^2_1=2,96477$<br>$P=0,08510$ |       |             | $\chi^2_1=3,74873$<br>$P=0,05285$ |      |                       |
| 60 - 69         | 63,34/62,96                                     | 49,47                               | 92/92                                 | 17/10                             | 74/82 | 42/41       | 41/44                             | 7/5  | 9/6                   |
| Test Statistik  |                                                 |                                     |                                       | $\chi^2_1=2,21967$<br>$P=0,13626$ |       |             | $\chi^2_1=0,65325$<br>$P=0,41895$ |      |                       |
| 70 - 79         | 72,94/73,00                                     | 63,97                               | 35/35                                 | 4/7                               | 31/28 | 23/13       | 11/19                             | 1/3  | 3/3                   |
| Test Statistik  |                                                 |                                     |                                       | $\chi^2_1=0,97072$<br>$P=0,32450$ |       |             | nicht signifikant                 |      |                       |
| ≥ 80            | 82,83/82,00                                     | 5,369                               | 6/6                                   | 2/1                               | 4/5   | 1/3         | 5/2                               | 0/1  | 1/1                   |
| Test Statistik  |                                                 |                                     |                                       | $\chi^2_1=0,44444$<br>$P=0,50499$ |       |             | $\chi^2_1=0,11583$<br>$P=0,73360$ |      |                       |

Tabelle 20. Aufschlüsselung der 247 Matched Pair

Datensätze mit vollständigem Ergebnis

Zur besseren Übereinstimmung der klinischen Daten, wurde im  
folgenden das Patientenklintel

sowohl je Alterstufe ( $\leq 39$ , 40-49, 50-59, 60-69, 70-79,  $\geq 80$ ) als auch mit der Matched Pair Probe verglichen.

Als Nullhypothese für die Analyse wurde angenommen, dass jüngere Patientinnen häufiger die untersuchten Mutationen aufweisen. Bei der Analyse der Matched Pairs in der entsprechenden Altersstufe konnte keine signifikante Abhängigkeit der Varianten in Abhängigkeit des Alters im Vergleich der Karzinomgruppe gegenüber der Kontrollgruppe nachgewiesen werden.

### **3.6.6 TNM und Polymorphismus**

#### **3.6.6.1 Tumorgröße**

Um einen Zusammenhang zwischen der Tumorgröße nach dem TNM System und dem untersuchten Polymorphismus zu erkennen, ist Tabelle 21 geeignet. Hierin wurden die Proben nach dem TNM System und den einzelnen Varianten aufgelistet. So waren insgesamt 96 Tumore als pT1c erfasst worden. Diese teilten sich an der Aminosäureposition 72 des Genes p53 wie folgt auf: CC:4/CG:36/GG:51.

Für die Aminosäureposition 36 im p21 Gen waren 81 mit CC und 15 mit CA bestimmt worden. Fünf der Tumore waren von der Konstellation p53:p21 (CC/CG:CA).

Aus der Gesamtübersicht lässt sich entnehmen, dass die meisten Tumore im Stadium pT1b, pT1c und pT2 erfaßt wurden. In der pT2 Tumorgruppe finden sich 8 Fälle mit der Allelkombination p53:p21 (CC/CG:CA).

| TNM   | Anzahl | p53<br>(CC)/(GG)/(CG) | p21<br>(CC)/(CA) | p53:p21<br>(CC/CG):(CA) |
|-------|--------|-----------------------|------------------|-------------------------|
| pT1   | 19     | 3/11/4                | 17/2             | 1                       |
| pT1a  | 18     | 0/6/11                | 14/2             | 2                       |
| pT1b  | 61     | 5/31/23               | 53/8             | 3                       |
| pT1c  | 96     | 4/51/36               | 81/15            | 5                       |
| pT2   | 65     | 2/33/28               | 49/16            | 8                       |
| pT2b  | 2      | 0/0/2                 | 2/0              | 0                       |
| pT3   | 2      | 1/0/0                 | 1/1              | 0                       |
| pT4   | 1      | 0/1/0                 | 1/0              | 0                       |
| pT4b  | 3      | 1/1/1                 | 3/0              | 0                       |
| Summe | 267    | 16/134/105            | 221/44           | 19                      |

Tabelle 21. Tumorgroße und Polymorphismus

Um auszuschliessen, dass Malignome mit einem günstigeren Verlauf nicht überrepräsentiert sind, wurde eine Untergruppe mit einer Erkrankungsdauer  $\leq 6$  Monate erstellt.

Hier zeigte sich in der Gruppe der pT1b, pT1c und pT2 Tumoren 7 Fälle mit der Allelkombination p53:p21 (CC/CG:CA). Insgesamt entsprach die Verteilung dem Gesamtkollektiv.

| TNM  | Anzahl | p53<br>(CC)/(GG)/(CG) | p21<br>(CC)/(CA) | p53:p21<br>(CC/CG):(CA) |
|------|--------|-----------------------|------------------|-------------------------|
| pT1  | 6      | 1/4/0                 | 5/1              | 1                       |
| pT1a | 3      | 0/2/1                 | 2/1              | 0                       |
| pT1b | 27     | 3/14/9                | 22/5             | 3                       |
| pT1c | 26     | 1/12/12               | 20/6             | 2                       |
| pT2  | 22     | 0/13/9                | 15/7             | 2                       |
| pT2b | 1      | 0/0/1                 | 1/0              | 0                       |
| pT3  | 1      | 1/0/0                 | 1/0              | 0                       |
| pT4  | 0      | 0                     | 0                | 0                       |
| pT4b | 1      | 0/1/0                 | 1/0              | 0                       |
|      | 87     | 6/46/32               | 67/20            | 8                       |

Tabelle 22. Tumorgroße und Polymorphismus und  
Erkrankungsdauer  $\leq 6$  Monate

In beiden Gruppen fand sich keine statistische Signifikanz zwischen der Häufigkeit der Genallele und Tumorgroße.

### **3.6.6.2 Lymphknotenstatus**

Zum Nachweis einer möglichen Korrelation mit dem Lymphknotenstatus wurden die Tumore nach dem TNM System aufgegliedert und auf Polymorphismen untersucht. Bei der Analyse mit den Matched Pair Proben ergab sich, in der Gruppe ohne befallene Lymphknoten mit insgesamt 69 Proben ein nichtsignifikanter p-Wert von  $p=0,06312$  bei einem  $\chi^2=3,45338$  für die Analyse des p53 SNPs. In allen anderen Subgruppen waren die p-Werte grösser.

|                     | <b>p53</b><br>(CC)            | (CG/GG) | <b>p21</b><br>(CC)            | (CA) | <b>p53:p21</b><br>(CC/CG:CA)  |
|---------------------|-------------------------------|---------|-------------------------------|------|-------------------------------|
| <b>Keine Angabe</b> | 12                            |         | 2                             |      |                               |
| <b>pN0</b>          | 11                            | 69/83   | 148                           | 22   | 11                            |
| Test Statistik      | $\chi^2=0,16321$<br>P=0,68622 |         | $\chi^2=3,45338$<br>P=0,06312 |      | $\chi^2=0,21343$<br>P=1,54799 |
| <b>pN1</b>          | 3                             | 1/6     | 9                             | 2    | 1                             |
| Test Statistik      | $\chi^2=2,40646$<br>P=0,12084 |         | nicht signifikant             |      | nicht signifikant             |
| <b>pN1a</b>         | 0                             | 1/3     | 3                             | 1    | 0                             |
| Test Statistik      | $\chi^2=0,00150$<br>P=0,96914 |         | nicht signifikant             |      |                               |
| <b>pN1b</b>         | 0                             | 3/4     | 5                             | 2    | 1                             |
| Test Statistik      | nicht signifikant             |         | $\chi^2=0,12761$<br>P=0,72092 |      | nicht signifikant             |
| <b>pN1bi</b>        | 0                             | 5/13    | 12                            | 6    | 1                             |
| Test Statistik      | $\chi^2=0,47789$<br>P=0,48938 |         | $\chi^2=2,77196$<br>P=0,09593 |      | nicht signifikant             |
| <b>pN1bii</b>       | 0                             | 1/4     | 4                             | 1    | 0                             |
| Test Statistik      | $\chi^2=0,15304$<br>P=0,69565 |         | nicht signifikant             |      |                               |
| <b>pN1biii</b>      | 3                             | 20/15   | 31                            | 8    | 4                             |
| Test Statistik      | $\chi^2=3,08154$<br>P=0,07919 |         | $\chi^2=0,24945$<br>P=0,61746 |      | $\chi^2=0,39542$<br>P=0,72222 |
| <b>pN1biv</b>       | 0                             | 4/4     | 8                             | 1    | 1                             |
| Test Statistik      | $\chi^2=0,09834$<br>P=0,75383 |         | nicht signifikant             |      | $\chi^2=1,40834$<br>P=0,23533 |
| <b>pN2</b>          | 0                             | 4/4     | 6                             | 2    | 1                             |
| Test Statistik      | $\chi^2=0,09834$<br>P=0,75383 |         | $\chi^2=0,03075$<br>P=0,86079 |      | nicht signifikant             |
| <b>Summe</b>        | 17                            | 108/138 | 228                           | 45   | 12                            |

Tabelle 23. Beziehung zwischen LK Metastasen und Genotyp

### 3.6.6.3 Metastasen

| Organsystem             | Anzahl | p53<br>(CC/GG/CG) | p21<br>(CC/CA) | p53:p21<br>(CC/CG:CA) |
|-------------------------|--------|-------------------|----------------|-----------------------|
| Knochenmetastasen       | 11     | 1/5/5             | 6/4            | 3                     |
| Lebermetastasen         | 3      | 1/0/2             | 3/0            | 0                     |
| Lunge                   | 2      | 1/0/1             | 0/2            | 1                     |
| ZNS                     | 1      | 0/1/0             | 1/0            | 0                     |
| Abdomen                 | 1      | 0/0/1             | 1/0            | 0                     |
| Hautmetastasen          | 1      | 0/1/0             | 1/0            | 0                     |
| Mediastinale Metastasen | 1      | 0/1/0             | 1/0            | 0                     |
| Summe                   | 20     | 3/8/9             | 13/6           | 4                     |

Tabelle 24. Metastasen und Polymorphismen

Die 20 Fälle, bei denen Metastasen angegeben wurden, zeigten in der Analyse obige Aufschlüsselung. Hierbei ergaben die statistischen Tests ( $\chi^2$  und Fischer exakt Test) weder für Metastasen gesamt, noch für die einzelnen Lokalisationen eine Signifikanz.

### 3.6.6.4 Grading

Zur Überprüfung eines Zusammenhanges zwischen Tumorgrading und den Varianten, wurden diese anhand des histologischen Gradings aufgeschlüsselt.

In der statistischen Analyse waren die p-Werte zwischen  $P=0,21721$  und  $P=0,87035$  gelegen. Die Verteilung der CG/CC:CA Varianten war in der G1 und G2 Gruppe vergleichbar niedrig. (G1: 3,2% und G2: 7,1%).

Einzig in der G3 Gruppe war die Variantenkombination (CG/CC:CA) mit 13,3% höher.

| Anzahl           | p53<br>(CC/GG/CG)              | p21<br>(CC/CA)                | p53:p21<br>(CG/CC:CA)         |
|------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| <b>G1 Tumore</b> |                                |                               |                               |
| 32               | 0/16/13                        | 29/3                          | 1                             |
| Test Statistik   | $\chi^2=0,092222$<br>P=0,76137 | $\chi^2=1,00994$<br>P=0,31492 | $\chi^2=1,07205$<br>P=0,30048 |
| <b>G2 Tumore</b> |                                |                               |                               |
| 183              | 12/90/71                       | 149/28                        | 13                            |
| Test Statistik   | $\chi^2=0,03506$<br>P=0,85146  | $\chi^2=0,04487$<br>P=0,83225 | $\chi^2=1,00994$<br>P=0,31492 |
| <b>G3 Tumore</b> |                                |                               |                               |
| 45               | 3/20/19                        | 35/10                         | 6                             |
| Test Statistik   | $\chi^2=0,02664$<br>P=0,87035  | $\chi^2=1,52274$<br>P=0,21721 | $\chi^2=0,48521$<br>P=0,48713 |

Tabelle 25. Polymorphismus und Grading

### 3.7 Hormontherapie und Polymorphismus

|                       | Anzahl | p53<br>(CC/GG/CG) | p21<br>(CC/CA) | p53:p21<br>(CG/CC:CA) |
|-----------------------|--------|-------------------|----------------|-----------------------|
| <b>Karzinomgruppe</b> |        |                   |                |                       |
| Hormontherapie        | 17     | 3/11/3            | 14/3           | 1                     |
| Antihormone           | 54     | 2/31/21           | 45/9           | 3                     |
| <b>Kontrollgruppe</b> |        |                   |                |                       |
| Hormontherapie        | 80     | 3/41/33           | 72/8           | 1                     |
| Antihormone           | 0      |                   |                |                       |

Tabelle 26. HRT und Polymorphismus

Bei der Analyse der Daten der Patientinnen, welche Hormone eingenommen hatten, zeigte sich ein Unterschied zwischen der Karzinomgruppe und der Kontrollgruppe.

So war bei den 80 Patientinnen der Kontrollgruppe, welche eine Hormontherapie (HRT) angegeben hatten, bei nur einer Probe die Varianten CG/CC:CA als Analyseergebnis festgestellt worden. Im Gegensatz dazu ergab sich bei einer Grösse von n=17 ebenfalls eine Patientin mit der CG/CC:CA Variante in der Karzinomgruppe. Dies entspricht einem Verhältnis von 1,25% zu 5,88%.

Aufgrund der geringen Probenanzahl ist die statistische Analyse jedoch nicht aussagekräftig.

## 4 Diskussion

Bei dieser Studie handelt es sich um eine Fallkontrollstudie.

Diese gezielte Studienform kann die gestellten Fragen am schnellsten, kostengünstig und wirtschaftlich beantworten und es ist ein entsprechend gewichtetes und aussagekräftiges Ergebnis zu erwarten.

Die Rekrutierung der Patientinnen erfolgte im Rahmen der senologischen Sprechstunde der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Universität München - Innenstadt.

In der Karzinomgruppe finden sich überproportional Patientinnen, welche am Beginn ihrer Versorgung/Behandlung stehen oder die bereits in der Nachsorge sind. Daher sind möglicherweise besonders schnellwachsende oder frühzeitig metastasierende Tumore oder bereits sehr ausgedehnte Tumore im Studienkollektiv unterrepräsentiert.

Um unsere Daten zu untermauern und diesen möglichen Effekt zu minimieren, wurde eine Untergruppe mit einer Erkrankungsdauer von 6 Monaten oder weniger gebildet. Da die Überlebenszeit nach Diagnosestellung innerhalb der ersten 6 Monate je nach Tumorstadium zwischen 100% und 97% liegt<sup>62</sup>, wurden die entsprechenden Patientinnen getrennt betrachtet.

Zur Überprüfung wurde eine Subgruppe mit einer Erkrankungsdauer von bis zu 6 Monaten gebildet und analysiert. Die Untersuchung gerade der Patientinnen bis 6 Monate nach Erstdiagnose und auch der bereits seit längerem in Nachsorge befindlichen Patienten zeigte keinen Unterschied im Ergebnis der Studie.

Wie Studien zeigten, hat die Abstammung der Patientinnen ebenfalls einen Einfluß auf die Genanalyse.

Jeder Patientin mit einem Karzinom wurde eine Patientin aus der Kontrollgruppe zugeordnet, ethnologisch und dem Alter ( $\pm 3$  Jahre) entsprechend. So wurde erreicht, dass die Karzinom- und die Kontrollgruppe, mit jeweils 275 Patientinnen; in entsprechendem Alter und von homogener deutscher Abstammung, sehr gut vergleichbar waren. Die darüber hinaus gesammelten Proben von anderen Ethnien wurden aufgrund der kleinen Zahl ausgeschlossen. Die Patientinnen der Kontrollgruppe waren 58,36 Jahre (min 23 Jahre und max. 87 Jahre), die Patientinnen mit einer Karzinomerkkrankung im Schnitt 59,26 Jahre alt (min 22 Jahre max 87 Jahre).

Die Proben wurden, um mögliche Einflüsse des Ersterkrankungsalters auszuschließen, nach Altersgruppen ( $\leq 39$  Jahre, 40-49, 50-59, 60-69, 70-79 und  $\geq 80$  Jahre) analysiert und mit den entsprechenden Matched Pair Kontrollpatientinnen verglichen. Es fand sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen Kombination der p21:p53 Gene mit den Varianten CA:CC/CG und einem Mammakarzinom im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch die Analyse der einzelnen Alterssubgruppen ergab keine Hinweise auf eine erhöhtes Auftreten dieser Genkombination.

Bei der Familienanamnese gaben im Gesamtkollektiv der Karzinomgruppe 62 von 427 Patientinnen (14,52 %) und in der Kontrollgruppe 38 von 387 Probandinnen (9,8%) einen Brustkrebsfall in der Familie an.

Um einen Einfluß durch genetisch vererbte Mammakarzinome auf die Fragestellung unserer Arbeit auszuschließen, wurden Patientinnen mit einer positiven Familienanamnese nicht in der Kontrollgruppe aufgenommen.

Da Polymorphismen angeboren, zu Beginn der Brusterkrankung als lokaler Auslöser entstanden oder sich erst nach der Karzinogenese in der Brust gebildet haben könnten, wurde die Erkrankungsdauer zur weiteren Fehlerminimierung eruiert.

Es ergab sich eine Häufung der im Blut nachweisbaren, genauer untersuchten Polymorphismen in der Gruppe „bis zu einem Jahr Erkrankungsdauer“ (9 von insgesamt 81 Patientinnen;  $\chi^2_1=3,24000$   $P=0,0716$ ); auch in der Gruppe „über 5 Jahren Erkrankungsdauer“ (6 von insgesamt 73 Patientinnen) fand sich eine geringe Häufung, die jedoch aufgrund der kleinen Fallzahl als nicht repräsentativ und somit als nicht aussagekräftig anzusehen ist.

In den anderen Gruppen waren keine Häufung von p21:p53 (CA:CC/CG) Anordnungen nachweisbar, wobei ein Fallzahlbias nicht auszuschließen ist.

Wir sind der Meinung, dass die oben genannte Häufung von Patientinnen mit einer Erkrankungsdauer unter einem Jahr, an der Versorgungsstruktur der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Universität München - Innenstadt liegt. Da die Klinik neben der Primärdiagnose auch die Primärtherapie im Sinne von chirurgischer, und/oder chemo- und/oder radiotherapeutischer Intervention anbietet, findet sich hier möglicherweise eine Häufung von Patientinnen, welche sich in der Frühphase der Primärtherapie befinden.

Die jährliche Nachsorge der Patientinnen wird meist von den niedergelassenen Frauenärzten oder den Hausärzten übernommen, so dass sich Patientinnen in einem späteren Erkrankungs-/Nachsorgestadium nicht in größerer Zahl zur Rekrutierung vorlagen.

In mehreren Studien konnte ein Zusammenhang zwischen mutiertem p53 Gen und der TNM-Klassifikation aufgezeigt werden<sup>15;20</sup>.

Silva et al. berichten über einen signifikanten Zusammenhang zwischen Mammakarzinompatientinnen mit und ohne P53 Protein Veränderungen im Plasma im Vergleich zur Lymphknoten-

Beteiligung, dem Proliferationsindex und dem Tumorzellwachstum<sup>66</sup>.

Die Tumorgröße, welche mit der TNM Klassifikation erhoben worden war, wurde in der vorliegenden Studie auf eine Korrelation der Variante des p53 Gen und des p21 Gen untersucht. Es zeigte sich in unserer Studie kein Zusammenhang mit den untersuchten Genpolymorphismen oder Allelen und der Tumorgröße.

Zur Überprüfung eines möglichen Zusammenhangs zwischen einem aggressiven, frühzeitig metastasierenden Tumor und einer Variante im p53 Gen oder dem Gen p21 zu überprüfen, wurden entsprechende Subgruppen gebildet. Der Lymphknotenstatus und die Tumorgröße von Karzinome bzw. Carzinoma in situ mit dem mutierten Allel( $pTNM_{min}=pTis$  und  $pTNM_{max}=pT2\ N1$ ) wurde mit den Daten der restlichen Karzinomgruppe verglichen ( $pTNM_{min}=pTis$  und  $pTNM_{max}=pT4b(m)\ pN=2$ ). Es fanden sich auch in diesem Vergleich keine Hinweise auf überdurchschnittlich große Tumore oder einen verstärkten Befall der LK in der Mutationsgruppe. Auch zeigte sich kein Zusammenhang zwischen der Tumorgröße und den jeweils untersuchten Mutationen an den Genen p53 und p21. Anhand unserer Daten konnten wir auch keine Relation zwischen der untersuchten Variante und einem erhöhten Lymphknotenbefall aufzeigen. Eine Ursache könnte die zu geringe Probenanzahl sein ( $n=99$  Fälle). Möglicherweise sind die unterschiedlichen Aussagen auch systembedingt:

In unserer Studie wurde nicht die Konzentration der Proteine im Plasma untersucht, sondern Allelpolymorphismen, welche zu einer Proteinveränderung führen können. In den Vergleichsstudien wurden jedoch mehrere Genvarianten<sup>15</sup> zusammen bzw. Subgruppen von Patientinnen analysiert<sup>66</sup>.

Die DNA-Analyse via Genchip liefert hierzu wesentlich genauere und detailliertere Ergebnisse, da durch diese Technik die direkte Analyse der Nukleotidanordnung ermöglicht wird.

Im Münchner Tumorregister<sup>62</sup> wird eine kürzere Überlebenszeit für Patientinnen mit Lymphknotenbefall bei Erstdiagnose angegeben. In unserem Studienkollektiv unterschied sich das Durchschnittsalter der LK-negativen (60,4 Jahre) zu LK-positiven Patientinnen (59 Jahre) nicht signifikant. Durch den größeren Anteil an Patientinnen mit abgeschlossener Therapie könnten in unserer Studie Karzinompatientinnen mit aggressiveren Tumoren unterrepräsentiert sein und unser Ergebnis in seiner Aussagekraft beeinträchtigen.

Daher analysierten wir die Daten der Patientinnen mit einer Erkrankungsdauer von 6 Monaten oder weniger in Abhängigkeit des Lymphknotenstatus.

In dieser Subgruppe fanden sich 67 Patientinnen, von denen 45 (67,2%) Lymphknoten-negativ waren. Der Anteil an Lymphknoten-positiven Mammakarzinomen (bei Erstdiagnose oder innerhalb der ersten 6 Monate nach Therapiebeginn festgestellt) in unserer Studie weicht unwesentlich von den Zahlen des Tumorregisters München (63,4% LK-negativ bei Erstdiagnose) ab. In dieser repräsentativen Untergruppe fanden wir keinerlei Hinweise auf eine Korrelation zwischen einer Variante im p53 Gen oder im p21 Gen zur Lymphknotenmetastasierung.

Da die Verteilung der Metastasen mit den in der Literatur angegebenen Orten und Häufigkeiten übereinstimmt, sehen wir darin einen weiteren Hinweis für die Normalverteilung unseres Patientengutes.

Es wurde trotz der niedrigen Fallzahl an Metastasen eine Aufschlüsselung nach den analysierten Allelen vorgenommen. (Tabelle 24).

Auch bei den Patientinnen mit Metastasen konnte keinerlei Häufung einer untersuchten Allelvariante nachgewiesen werden.

Die histologische Verteilung und deren Häufigkeitsangaben entsprechen den Angaben des Münchener Tumormanuals.

Das Tumorgrading zeigt jedoch in den von uns analysierten Daten im Vergleich zum Münchener Tumormanuals eine Abweichung und eine Übergewichtung bei G2 Tumoren zu Lasten der G3 Tumoren (Tabelle 15).

Da die Fallzahlen für die einzelnen Subgruppen teilweise sehr gering waren, kann nicht von einer mächtigen Analyse gesprochen werden. Andererseits ist in der uns bekannten Literatur auch kein derartiger Zusammenhang zwischen einer Genanalyse von p53 und p21 und dem histologischen Grading bekannt.

Somit muß festgehalten werden, dass sich anhand der vorliegenden Studienpopulation kein Zusammenhang zwischen der Klassifikation im TNM System und den analysierten SNPs der p53 und p21 Gene oder der Kombination der beiden SNPs bei einer Brustkrebserkrankung ergibt.

Das Ziel der Studie ist einen Zusammenhang zwischen den Polymorphismen R72P (Arginin-Prolin an Aminosäureposition 72) im Exon 4 des p53 Gens und S31R (Serin-Arginin an Aminosäureposition 31) im Exon 2 des p21 Gens mit der Grunderkrankung Mammakarzinom zu untersuchen.

Für die R72P Variante ist in der Literatur ein Zusammenhang mit Brustkrebs beschrieben<sup>26</sup>.

Da Polymorphismen im p53 und p21 Gen in mehreren Studien als mögliche Ursache für die Zellentartung in Verbindung gebracht wurden, stellt sich nun die Frage, ob ein Polymorphismus an einem bestimmten Genlocus oder die Kombination mehrere Polymorphismen in einem Gen oder Genen die Entartung fördern oder verursachen können. Hierzu wurden in dieser Studie die Varianten R72P in p53 und S31R in p21 auf deren Zusammenhang mit Mammakarzinomkrankung untersucht. Nach der spektroskopischen Analyse der Proben nach dem oben beschriebenen Protokoll ergaben sich die genannten Ergebnisse.

Um systematische Fehler auszuschließen wurden die aufgetretenen Genotypen mit der Hardy-Weinberg Gleichung in der Kontrollgruppe verglichen. Die Angaben hierzu sind Tabelle 17 zu entnehmen. Daraus zeigt sich, dass es im Kollektiv keine signifikante Abweichung zu den unter 2.3.6.6 angegebenen Verteilungen gab. Zudem zeigt die Tabelle die beobachtete relative Allele-Häufigkeit. (A.freq) für jeden SNP. Die Ergebnisse unserer Gruppen sind hierzu kongruent. Die zitierten amerikanischen Studien berichten von verschiedenen Allelfrequenzen in Abhängigkeit der ethnischen Abstammung<sup>58</sup>.

Unsere Daten ergaben eine Frequenz von 7% des Prolin-Allels für den p53 R72P Polymorphismus und von 16% des Arginin-Allels für den p21 S31R Polymorphismus in der Kontrollgruppe.

#### **4.1 S31R Variante im p21 Gen**

Der p21 Gen Polymorphismus im Codon 31 wurde 1994 von Chedid et al.<sup>18</sup> mit einer Häufigkeit von 14% erstmalig beschrieben und von anderen Arbeitsgruppen bestätigt. Die in unserer Studie erhobene Häufigkeit von 16% untermauert ebenfalls die von Chedid et al. gemachten Angaben. Übereinstimmend dazu ergaben unsere Daten einen signifikanten Unterschied zwischen Karzinom- und Kontrollgruppe bzgl. dieser Variante ( $\chi^2_1 = 4,499$ ;  $P = 0,03391$ ). Hieraus errechnet sich eine Odds Ratio für das erhöhte Risiko für Trägerinnen des CA Genotyps im Vergleich zum CC Genotyp von 1.74 (95% confidence ratio = ]1.00–3.05])

Studien, welche in jüngster Zeit publiziert wurden, deuten zudem auf einen Einfluß bzgl. der S31R Variante und der Prognose bei anderen Karzinomen (Prostata, Brust und Zervix) hin<sup>6;35;39;79</sup>.

Eine derartige Abhängigkeit zwischen Brustkrebs und SNP S31R ist noch nicht vollständig erklärt<sup>16;67</sup>.

Unsere Ergebnisse deuten auf einen Zusammenhang zwischen der Erkrankung Mammakarzinom und dieser Variante hin, wie dies

auch von Powell et al.<sup>58</sup> und Keshava et.al.<sup>39</sup> für Australier bzw. Amerikaner europäischer, afrikanischer und lateinamerikanischer Abstammung beschrieben wurde.

Um unsere Daten auf dieses neue Ergebnis hin zu überprüfen, führten wir einen ‚Fischer exakt Test‘ durch, welcher bessere Ergebnisse bei niedrigen Fallzahlen ergibt. Auch dieser Test ( $P=0,04366$ ) bestätigte die Aussage, dass Varianten im p21 Gen mit einem erhöhten Risiko für eine Mammakarzinomkrankung einhergeht.

Der Vergleich der Studien zeigt, dass die Karzinomfallzahlen der Studien (Powell  $n=351$ , Keshava  $n=160$  und in der vorliegenden Studie  $n=275$ ) sich nur unwesentlich unterscheiden.

Das Auftreten des Polymorphismus ist in unserem Kollektiv mit 16% geringfügig höher verglichen mit den 12% in der genannten amerikanischen Studie von Keshava und identisch zu den 16% der australischen Studie von Powell et al.<sup>58</sup>.

In der Studie von Powell wurde keine Kontrollgruppe analysiert, stattdessen wurden die Ergebnisse von 6 vorhergehenden Studien als Referenz verwendet ( $n=1525$ ). Als Ergebnis wird unter anderem über einen Hinweis auf einen Zusammenhang zu kleineren Tumorgrößen und eine Verbindung zu negativen Progesteronhormonrezeptoren für den SNP S31R berichtet.

In der Vergleichsstudie von Keshava wurden Amerikanerinnen europäischer ( $n=187$ ), afrikanischer ( $n=65$ ) und lateinamerikanischer ( $n=75$ ) Abstammung als Kontrollgruppen verwendet. Bei den afrikanischen und lateinamerikanischen Subgruppen berichtet die Gruppe über einen signifikanten Zusammenhang bzgl. des p21 Polymorphismus und der Grunderkrankung. Sie selbst weisen jedoch kritisch auf die kleine Fallzahl hin.

Durch unsere Daten kann ein Zusammenhang für Patientinnen deutscher Abstammung zwischen dem p21 Polymorphismus und

einer Brustkrebserkrankung ebenfalls nicht zweifelsfrei belegt werden, auch wenn es starke Hinweise gibt.

Eine Studie von Rundle et. al.<sup>60</sup>, welche das Genprodukt analysieren, berichtet über Zusammenhänge zwischen der Serumkonzentration von P21 Protein und dem Erkrankungsverlauf.

Die Daten bzgl. P21 Proteinmessung sind aufgrund der verwendeten Analysetechnik (Western-Blot), niedrigen Fallzahlen ( $n_{\text{Fall}}=34$ ;  $n_{\text{Kontrolle}}=60$ ) und fehlenden übereinstimmenden Folgestudien jedoch ebenfalls kritisch zu betrachten.

Weitere prospektive Studien mit größeren Fallzahlen sind hier von Nöten, um eine sicherere Aussage treffen zu können.

## **4.2 Mutation am p53 Gen**

Das wesentlich genauer untersuchte und in seiner Wirkungsweise bekanntere p53 Gen wurde in unserer Studie an der Stelle R72P auf Polymorphismen untersucht.

Von den über 120 publizierten Studien berichten nur wenige von einer Assoziation mit Brustkrebs<sup>21;57;60;64;67;73;75;76</sup>.

Mutiertes Protein P53 wurde von Zhi-Ming Shao et. al.<sup>64</sup> als Tumormarker vorgeschlagen. In dieser Studie wurde ein Zusammenhang zwischen der Höhe von P53 Protein im Plasma und einer Brustkrebserkrankung festgestellt; auch wurde eine Assoziation zwischen verändertem P53 Protein und der Prognose postuliert.

Für die häufig beschriebenen Varianten des p53 Gens sind ebenfalls bereits Zusammenhänge mit malignen Erkrankungen beschrieben<sup>61;67</sup>.

Eine Variante an der Stelle R72P wird in der Literatur<sup>60</sup> jedoch kontrovers diskutiert. Auf Grund dieser Variante wird eine Funktionseinschränkung des Proteins vermutet.

Auch gibt es Hinweise auf eine Korrelation zum histologischen Grading, sowie zum erhöhten Erkrankungsrisiko für Brustkrebs<sup>8;13;67</sup>.

In unserer Studie hatten 14 der 275 Patientinnen (6,18%) in der Kontrollgruppe eine Variante am p53 Gen (R72P). In der Karzinomgruppe waren es 17 Patientinnen.

Die statistische Analyse mit dem  $\chi^2$ -Test ergab keinen Zusammenhang zwischen diesem Polymorphismus und der Erkrankungsdauer, dem Rezidiv, der Tumorgröße oder dem histologischen Grading. Die ermittelte Häufigkeit dieser Variante (6,18%) liegt in unserer Studie unter dem Anteil der von anderen Studien für mutiertes p53 Gen (11–55%) angegeben wurde<sup>29</sup>.

Da in unserer Studie nur einer der vielen Polymorphismen betrachtet wurde, deuten unsere Ergebnisse darauf hin, daß es neben der Variante R72P noch weitere Veränderungen des p53 Gen geben muß, die Einfluß auf eine Brustkrebserkrankung haben.

#### **4.3 Kombination der Varianten am p21 und p 53 Gen**

Da in Folge einer p53 Aktivierung auch das p21 Gen aktiviert wird, wurde in wenigen Studien bereits eine Kombination beiden veränderten Gene auf mögliche Folgen bei unterschiedlichen Karzinomen untersucht<sup>49;51</sup>.

Die Kombination der Variante S31R von p21 wurde mit verändertem p53 von Channa Keshava et. al.<sup>39</sup> auf ein erhöhtes Risiko bzw. schlechteres Outcome im Hinblick auf die Überlebensrate oder die Rezidivhäufigkeit bei Mammakarzinom untersucht.

Die Autoren kommen in ihrer Publikation zu der Erkenntnis, dass Kaukasiern ( $n_{Ca}=93$ ;  $n_{Co}=183$ ) durch der S31R Polymorphismus zusammen mit verändertem p53 ein erhöhtes Karzinomrisiko haben. Bei den Untergruppen mit Amerikanern afrikanischer und lateinamerikanischer Herkunft konnte dies nicht gezeigt werden.

Unsere Zahlen bestätigen dieses Risiko für Patientinnen europäischen Ursprungs (Kaukasier) im speziellen Fall der p53 Variante an R72P nicht. ( $\chi^2_{25} = 4,5$ ;  $P = 0,48022$ )

Die Analyseergebnisse der oben genannten Studie beruhen auf einer PCR-Analyse der Proben DNA. Diese Methode war die Grundlage für die Entwicklung der Genchips. Als Erklärung kann die gleichzeitige Untersuchung von mehreren p53 Polymorphismen in der Studie von Keshava gegeben werden. Weitere Analysen von einzelnen Polymorphismuskombinationen der beiden Gene sollten deutliche Korrelationen zeigen.

Jüngste Studien haben den Verdacht geäußert, dass mit einer langjährigen Hormonersatztherapie sich das Erkrankungsrisiko für Brustkrebs erhöht<sup>9</sup>.

Aus Tabelle 9 ist ersichtlich, dass 49,1% (80 von 163) der gepaarten Patientinnen der Kontrollgruppe eine Hormonersatztherapie verschrieben bekamen. 8,3% (17 von 205) der Karzinompatientinnen gaben die Einnahme einer HRT trotz der den Patientinnen bekannten Kontraindikation an. Eine Untersuchung bzgl. HRT und Polymorphismus zeigte keine Unterschiede im Vergleich zur übrigen Kontrollgruppe.

## 5 Zusammenfassung

In einer klinisch-epidemiologischen Fallkontrollstudie wurden insgesamt 550 periphere Blutproben von Patientinnen auf die Häufigkeit der Variante R72P im p53 Gen und S31R im p21 Gen untersucht. Nachdem die 275 Fallkontrollpaare mittels MALDI-TOF Massenspektroskopie analysiert wurden, lagen 247 Fallkontrollen mit vollständigen Datensätzen vor.

Die Verteilung des p53 SNPs zeigte weder in der gepaarten noch in der Analyse der gesamten Daten einen signifikanten Unterschied zwischen der Kontroll- und der Karzinomgruppe. Somit scheint die Variante R72P alleine keinen Einfluß auf das Risiko einer Brustkrebserkrankung zu haben.

Die in der Literatur für mutiertes p53 angegebenen Daten konnten wir durch unsere Zahlen nicht bestätigen. Die vorliegende Studie beschränkt sich jedoch auf die Untersuchung eines Polymorphismus eines einzigen Nukleotids, während sich die Angaben in der Literatur auf Mutationen im gesamten p53 Gen beziehen.

Unsere Daten bzgl. des p21 Gen unterstützen den derzeitigen Stand der Literatur, dass ein Zusammenhang zwischen dem S31R Polymorphismus und dem Brustkrebsrisiko unter Verwendung eines normalen Signifikanzniveaus von  $\alpha \leq 0.05$  (Fisher exact Test  $P=0,04366$ ; Odds Ratio 1,74; 95% confidence ratio = ]1.00-3.05]) besteht.

Theorien über einen Zusammenhang zwischen den Genvarianten der beiden Gene p53 und p21 und einer Interaktion dieser Varianten bei der Brustkrebsgenese konnten unsere Daten nicht bestätigen.

Die in der Studie untersuchte genomische DNA aus dem peripheren Blut zeigte auch keine Zusammenhänge zwischen den Varianten der Genloci und der TNM-Klassifikation oder Tumorgrading.

Die Korrelation des untersuchten Polymorphismus im p21 Gen mit Brustkrebsrisiko ist relativ schwach. Zur klinischen Anwendung z.B. als Prognosemarker für das Risiko an Brustkrebs zu erkranken scheint diese Variante allein nicht geeignet zu sein.

## 6 Abkürzungen

|                    |                                                                    |
|--------------------|--------------------------------------------------------------------|
| SNP                | Single Nukleotide Polymorphism                                     |
| R72P               | Aminosäureaustausch an Stelle 72 von Arginin (R) zu Prolin (P)     |
| S31R               | Aminosäureaustausch an Stelle 31 von Seronin (S) zu Arginin (R)    |
| BRCA               | BReast CAncer                                                      |
| BRCAT1             | BReast CAncer 11-22 Translocation Associated                       |
| BWSCR1A            | SLC22A1C (Solute Carrier Family 22 Member 1-Like)                  |
| RNA                | RiboNucleicAcid                                                    |
| mRNA               | messenger RiboNucleicAcid                                          |
| DNA                | DeoxyriboNucleicAcid                                               |
| TSP                | Tumor Suppressor Gen                                               |
| TAQ                | recombinante DNA Polymerase                                        |
| dNTP               | Nukleotide                                                         |
| PCR                | Polymerase Chain Reaktion                                          |
| PCR-Primer         | PCR-Startsequenz                                                   |
| MDM2               | Mouse Double Minute 2                                              |
| MALDI-TOF          | Matrix-assisted Laser Desorption Ionization/Time-of-flight         |
| CDK                | Cyclin Dependent Kinase                                            |
| CDKI               | Cyclin Dependent Kinase Inhibitor                                  |
| CASP3              | Critical Assessment of techniques for protein Structure Prediction |
| Rb-Gen             | Retinoblastom Gen                                                  |
| E2F                | Transkriptionsfaktor                                               |
| LMU                | Ludwig Maximilians Universität                                     |
| HRT                | Hormon Replacement Therapie                                        |
| HE                 | Hysterektomie                                                      |
| TNM-Klassifikation | Tumor Nodi Metastasen – Klassifikation                             |
| WHO                | World Health Organisation                                          |
| D oder L-CIS       | Duktales oder Lobuläres Carcinoma in Situ                          |
| Ca                 | Karzinom                                                           |

|           |                                    |
|-----------|------------------------------------|
| C         | Cytosin                            |
| T         | Thymin                             |
| A         | Adenin                             |
| G         | Guanin                             |
| U         | Uracil                             |
| Arg       | Arginin                            |
| Ser       | Serin                              |
| Pro       | Prolin                             |
| EDTA-Blut | Ethylene Diamine Tetra Acetic-Blut |

## 7 Datenerhebungsbogen

Erhebungsdatum: \_\_\_\_\_ Studiennummer: \_\_\_\_\_

Initialen: \_\_\_\_\_ Geburtsdatum: \_\_\_\_\_

Patientinnen Nummer: \_\_\_\_\_

Nationalität der Eltern

Vater: \_\_\_\_\_

Mutter: \_\_\_\_\_

Letzte Periode länger als 12 Monate zurückliegend?

☐ Nein,

☐ Ja, ggf. mit folgenden Hormonen substituiert \_\_\_\_\_

☐ Möglich (Z.n. Operation, ....)

Sind Familienmitglieder an einer bösartigen Erkrankung  
erkrankt/verstorben?

Wer/Welche? \_\_\_\_\_

Eigene Erkrankung: \_\_\_\_\_

Diagnosedatum: \_\_\_\_\_

Primärtumor: \_\_\_\_\_ pT \_\_\_\_\_ pN \_\_\_\_\_ pM \_\_\_\_\_

Histologischer Typ \_\_\_\_\_ G \_\_\_\_\_

☐ Lymphknotenmetastasen

☐ Organmetastasen, welche: \_\_\_\_\_

Therapie:

☐ Operation

☐ Chemotherapie

☐ Bestrahlung

☐ Östrogenantagonisten

## **8 Abbildungsverzeichniss**

|                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 1:Zellzyklusphase.....                                                            | 7  |
| Abbildung 2:Aktivierung von normalem bzw. mutiertem<br>p53 Gen und Apoptose.....            | 8  |
| Abbildung 3:Die Struktur des Proteins P53<br>in der DNA Bindung.....                        | 10 |
| Abbildung 4:p53 abhängigen Pathways zur Zellregulation.....                                 | 11 |
| Abbildung 5:Molekülstruktur des P21 Proteins mit Darstellung<br>der DNA-Bindungsstelle..... | 12 |
| Abbildung 6:Das P21 Protein mit zwei seiner interaktiven<br>Stellen.....                    | 13 |

## 9 Tabellenverzeichnis

|             |                                                                                                                 |    |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabelle 1.  | Internationale TNM Klassifikation <sup>47</sup> .....                                                           | 20 |
| Tabelle 2.  | Histologische Tumoreinteilung nach der WHO <sup>46</sup> ..                                                     | 21 |
| Tabelle 3.  | Internationale Klassifikation des Tumorzellgradings nach Elston und Ellis <sup>49</sup> .....                   | 22 |
| Tabelle 4.  | Primer und Terminationsmixübersicht .....                                                                       | 25 |
| Tabelle 5.  | Auszug aus der DNA Codierung von p53 Gen <sup>54</sup> ...                                                      | 26 |
| Tabelle 6.  | Auszug aus der Sequenz von p21 Gen <sup>54</sup> .....                                                          | 28 |
| Tabelle 7.  | Aufteilung der Patientinnen nach familiärer Abstammung .....                                                    | 31 |
| Tabelle 8.  | Familienanamnese maligner Erkrankungen .....                                                                    | 32 |
| Tabelle 9.  | Menopausenstatus und Hormontherapie bei Karzinomerkkrankung und in der Kontrollgruppe...                        | 33 |
| Tabelle 10. | Allgemeine klinische und biochemische Angaben der Karzinomgruppe .....                                          | 34 |
| Tabelle 11. | Verteilung des TNM Stadiums der Mammakarzinome in der vorliegenden Studie .....                                 | 35 |
| Tabelle 12. | Organmetastasenverteilung .....                                                                                 | 36 |
| Tabelle 13. | Histologische Verteilung der Mammakarzinome ..                                                                  | 37 |
| Tabelle 14. | Häufigkeiten der histologischen Diagnose <sup>2</sup> .....                                                     | 38 |
| Tabelle 15. | Tumorgrading .....                                                                                              | 38 |
| Tabelle 16. | Klinische und biochemische Angaben der Kontroll- und Karzinomgruppe .....                                       | 39 |
| Tabelle 17. | Gegenkontrolle der Genotypen .....                                                                              | 40 |
| Tabelle 18. | Häufigkeit der einzelnen Mutationen und $\chi^2$ -Testung gegenüber dem gesunden Kontrollkollektiv .....        | 41 |
| Tabelle 19. | Aufschlüsselung nach Erkrankungsdauer der Karzinomgruppe und Varianten der gesammelten matched pair Daten ..... | 43 |
| Tabelle 20. | Aufschlüsselung der 247 Matched Pair Datensätze mit vollständigem Ergebniss .....                               | 45 |
| Tabelle 21. | Tumorgröße und Polymorphismus .....                                                                             | 47 |
| Tabelle 22. | Tumorgröße und Polymorphismus und Erkrankungsdauer $\leq 6$ Monate .....                                        | 47 |
| Tabelle 23. | Beziehung zwischen LK Metastasen und Genotyp                                                                    | 49 |
| Tabelle 24. | Metastasen und Polymorphismen .....                                                                             | 50 |
| Tabelle 25. | Polymorphismus und Grading .....                                                                                | 51 |
| Tabelle 26. | HRT und Polymorphismus .....                                                                                    | 51 |

## 10 Literaturverzeichnis

1. Aktualisierten Therapieempfehlungen zur Therapie primärer Mammakarzinome - St. Gallen 2003. *GynSpectrum* 2003;11.
2. Amat S, Penault-Llorca F, Cure H, Le Bouedec G, Achard JL, Van P, I *et al.* Scarff-Bloom-Richardson (SBR) grading: a pleiotropic marker of chemosensitivity in invasive ductal breast carcinomas treated by neoadjuvant chemotherapy *29. Int.J.Oncol.* 2002;20:791-6.
3. Andersson S, Rylander E, Strand A, Sallstrom J, Wilander E. The significance of p53 codon 72 polymorphism for the development of cervical adenocarcinomas. *Br.J.Cancer* 2001;85:1153-6.
4. Asada M, Yamada T, Ichijo H, Delia D, Miyazono K, Fukumuro K *et al.* Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) in monocytic differentiation *2. EMBO J.* 1999;18:1223-34.
5. AU-KBC. AU-KBC Research Centre. [www.au-kbc.org](http://www.au-kbc.org) 1-1-2001. 2001.  
Ref Type: Electronic Citation
6. Bahl R, Arora S, Nath N, Mathur M, Shukla NK, Ralhan R. Novel polymorphism in p21(waf1/cip1) cyclin dependent kinase inhibitor gene: association with human esophageal cancer. *Oncogene* 2000;19:323-8.
7. Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup JM *et al.* Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 1989;244:217-21.
8. Beck T, Weller EE, Weikel W, Brumm C, Wilkens C, Knapstein PG. Usefulness of immunohistochemical staining for p53 in the prognosis of breast carcinomas: correlations with established prognosis parameters and with the proliferation marker, MIB-1 *145. Gynecol.Oncol.* 1995;57:96-104.

9. Beral V. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study  
1. *Lancet* 2003;362:419-27.
10. Bishop JM. Viruses, genes, and cancer. II. Retroviruses and cancer genes.  
*Cancer* 1985;55:2329-33.
11. Bloom HJG, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer: A study of 1709 cases of which 359 have been followed for 15 years.  
*Brit J Cancer* 1957;11:353-77.
12. Brandt-Rauf PW. Oncogene proteins as biomarkers in the molecular epidemiology of occupational carcinogenesis. The example of the ras oncogene-encoded p21 protein.  
*Int.Arch.Occup.Environ.Health* 1991;63:1-8.
13. Bunting JS, Hemsted EH, Kremer JK. The pattern of spread and survival in 596 cases of breast cancer related to clinical staging and histological grade 313. *Clin.Radiol.* 1976;27:9-15.
14. Calabretta B, Kaczmarek L, Selleri L, Torelli G, Ming PM, Ming SC *et al.* Growth-dependent expression of human Mr 53,000 tumor antigen messenger RNA in normal and neoplastic cells.  
*Cancer Res* 1986;46:5738-42.
15. Castells A, Puig P, Mora J, Boadas J, Boix L, Urgell E *et al.* K-ras mutations in DNA extracted from the plasma of patients with pancreatic carcinoma: diagnostic utility and prognostic significance.  
*J.Clin.Oncol.* 1999;17:578-84.
16. Centre de Ressources INFOBIOGEN.  
[www.infobiogen.fr](http://www.infobiogen.fr) . 2004.  
Ref Type: Electronic Citation
17. Charpin C, Bacquie N, Bouvier C, Devictor B, Boulat J, Andrac L *et al.* Comparison of the prognostic significance of current and modified histological grades in breast carcinomas  
136. *Anticancer Res.* 1995;15:2611-7.
18. Chedid M, Michieli P, Lengel C, Huppi K, Givol D. A single nucleotide substitution at codon 31 (Ser/Arg)

defines a polymorphism in a highly conserved region of the p53-inducible gene WAF1/CIP1.  
*Oncogene* 1994;9:3021-4.

19. Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations.  
*Science* 1994;265:346-55.
20. Crook T, Crossland S, Crompton MR, Osin P, Gusterson BA. p53 mutations in BRCA1-associated familial breast cancer  
1. *Lancet* 1997;350:638-9.
21. Cuny M, Kramar A, Courjal F, Johannsdottir V, Iacopetta B, Fontaine H *et al.* Relating genotype and phenotype in breast cancer: an analysis of the prognostic significance of amplification at eight different genes or loci and of p53 mutations.  
*Cancer Res.* 2000;60:1077-83.
22. De V, I, Marion MJ, Smith SJ, Carney WP, Brandt-Rauf PW. Mutant c-Ki-ras p21 protein in chemical carcinogenesis in humans exposed to vinyl chloride.  
*Cancer Causes Control* 1994;5:273-8.
23. Deppert W, Buschhausen-Denker G, Patschinsky T, Steinmeyer K. Cell cycle control of p53 in normal (3T3) and chemically transformed (Meth A) mouse cells. II. Requirement for cell cycle progression.  
*Oncogene* 1990;5:1701-6.
24. Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today.  
*J.Natl.Cancer Inst.* 1981;66:1191-308.
25. Dumont P, Leu J, Pietra A, George D, Murphy M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential.  
*Nat.Genet.* 2003;33:357-65.

26. Dunning AM, Healey CS, Pharoah PD, Teare MD, Ponder BA, Easton DF. A systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 1999;8:843-54.
27. Eisinger F, Sobol H, Serin D, Whorton JC. Hereditary breast cancer, circa 1750  
1. *Lancet* 1998;351:1366.
28. el Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM *et al.* WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression  
1. *Cell* 1993;75:817-25.
29. Elledge RM, Allred DC. Prognostic and predictive value of p53 and p21 in breast cancer.  
*Breast Cancer Res Treat.* 1998;52:79-98.
30. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: Experience from a large study with long-term follow-up.  
*Histopathology* 1991;19:403-10.
31. Fan R, Wu M, Miller D, Wain J, Kelsey K, Wienecke JK. The p53 codon 72 polymorphisms and lung cancer risk.  
*Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 2000;9:1037-42.
32. Field JK, Spandidos DA. The role of ras and myc oncogenes in human solid tumours and their relevance in diagnosis and prognosis (review)  
1. *Anticancer Res* 1990;10:1-22.
33. Gulbis B, Galand P. Immunodetection of the p21-ras products in human normal and preneoplastic tissues and solid tumors: a review  
1. *Hum.Pathol.* 1993;24:1271-85.
34. Gundersen S, Bohler P, Hannisdal E, Host H. [Tumor size and histological grading of stage 1 breast cancer. Prognostic and therapeutic significance]  
130. *Tidsskr.Nor Laegeforen.* 1996;116:222-5.
35. Hachiya T, Kuriaki Y, Ueoka Y, Nishida J, Kato K, Wake N. WAF1 genotype and endometrial cancer susceptibility.  
*Gynecol.Oncol.* 1999;72:187-92.

36. Javelaud D, Besançon F. CDKN1A (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A).  
*Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* 2001.
37. Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage.  
*Cancer Res* 1991;51:6304-11.
38. Kaul R, Mukherjee S, Ahmed F, Bhat MK, Chhipa R, Galande S *et al.* Direct interaction with and activation of p53 by SMAR1 retards cell-cycle progression at G2/M phase and delays tumor growth in mice 1. *Int.J.Cancer* 2003;103:606-15.
39. Keshava C, Frye BL, Wolff MS, McCanlies EC, Weston A. Waf-1 (p21) and p53 polymorphisms in breast cancer.  
*Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 2002;11:127-30.
40. Kuerbitz SJ, Plunkett BS, Walsh WV, Kastan MB. Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation.  
*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1992;89:7491-5.
41. Lavigueur A, Maltby V, Mock D, Rossant J, Pawson T, Bernstein A. High incidence of lung, bone, and lymphoid tumors in transgenic mice overexpressing mutant alleles of the p53 oncogene.  
*Mol.Cell Biol.* 1989;9:3982-91.
42. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene.  
*Nature* 1991;351:453-6.
43. Levkau B, Koyama H, Raines EW, Clurman BE, Herren B, Orth K *et al.* Cleavage of p21Cip1/Waf1 and p27Kip1 mediates apoptosis in endothelial cells through activation of Cdk2: role of a caspase cascade.  
*Mol.Cell* 1998;1:553-63.

44. Li Y, Dowbenko D, Lasky LA. AKT/PKB phosphorylation of p21Cip/WAF1 enhances protein stability of p21Cip/WAF1 and promotes cell survival 1. *J.Biol.Chem.* 2002;277:11352-61.
45. Lukas J, Groshen S, Saffari B, Niu N, Reles A, Wen WH *et al.* WAF1/Cip1 gene polymorphism and expression in carcinomas of the breast, ovary, and endometrium. *Am.J.Pathol.* 1997;150:167-75.
46. Luo JC, Neugut AI, Garbowski G, Forde KA, Treat M, Smith S *et al.* Expression of p21 *ras*-related protein in the plasma and tissue of patients with adenomas and carcinomas of the colon. *Biomarkers* 1996;1:29-33.
47. Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF, Jr., Nelson CE, Kim DH *et al.* Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 1990;250:1233-8.
48. Mercer WE, Avignolo C, Baserga R. Role of the p53 protein in cell proliferation as studied by microinjection of monoclonal antibodies. *Mol.Cell Biol.* 1984;4:276-81.
49. Milner BJ, Hosking L, Sun S, Haites NE, Foulkes WD. Polymorphisms in P21CIP1/WAF1 are not correlated with TP53 status in sporadic ovarian tumours. *Eur.J Cancer* 1996;32A:2360-3.
50. Milner J, McCormick F. Lymphocyte stimulation: concanavalin A induces the expression of a 53K protein. *Cell Biol.Int.Rep.* 1980;4:663-7.
51. Mousses S, Ozcelik H, Lee PD, Malkin D, Bull SB, Andrulis IL. Two variants of the CIP1/WAF1 gene occur together and are associated with human cancer. *Hum.Mol.Genet.* 1995;4:1089-92.

52. NCBI and National Center for Biotechnology Information. NCBI. [www.pubmed.com](http://www.pubmed.com) . 2004.  
Ref Type: Electronic Citation
53. Olschwang S, Laurent-Puig P, Vassal A, Salomon R-J, Thomas G. Characterization of a frequent polymorphism in the coding sequence of the Tp53 gene in colonic cancer patients and a control population. *Hum.Genet.* 1991;86:369-70.
54. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM TM. MIM Number: 114480. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> . 6-4-1986.  
Ref Type: Electronic Citation
55. Oren M. Relationship of p53 to the control of apoptotic cell death. *Semin.Cancer Biol.* 1994;5:221-7.
56. Osin PP, Lakhani SR. The pathology of familial breast cancer: Immunohistochemistry and molecular analysis. *Breast Cancer Res* 1999;1:36-40.
57. Pharoah PD, Day NE, Caldas C. Somatic mutations in the p53 gene and prognosis in breast cancer: a meta-analysis. *Br.J.Cancer* 1999;80:1968-73.
58. Powell BL, van Staveren IL, Roosken P, Grieu F, Berns EM, Iacopetta B. Associations between common polymorphisms in TP53 and p21WAF1/Cip1 and phenotypic features of breast cancer. *Carcinogenesis* 2002;23:311-5.
59. Reich NC, Levine AJ. Growth regulation of a cellular tumour antigen, p53, in nontransformed cells. *Nature* 1984;308:199-201.
60. Rundle A, Tang D, Brandt-Rauf P, Zhou J, Kelly A, Schnabel F *et al.* Association between the ras p21 oncoprotein in blood samples and breast cancer. *Cancer Lett.* 2002;185:71-8.

61. Saitoh S, Cunningham J, De Vries EM, McGovern RM, Schroeder JJ, Hartmann A *et al.* p53 gene mutations in breast cancers in midwestern US women: null as well as missense-type mutations are associated with poor prognosis.  
*Oncogene* 1994;9:2869-75.
  
62. Sauer HJ. Manual, Empfehlung zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge Mammakarzinome.  
Muenchen: Tumorzentrum München, 2003.
  
63. Schwerk C. Endokrinologie. In Goerke K, Steller J, Valet A, eds.  
*Klinikleitfaden Gynäkologie Geburtshilfe*, pp 545-58.  
München: Urban & Fischer, 2000.
  
64. Shao ZM, Wu J, Shen ZZ, Nguyen M. p53 mutation in plasma DNA and its prognostic value in breast cancer patients  
1. *Clin.Cancer Res* 2001;7:2222-7.
  
65. Shohat O, Greenberg M, Reisman D, Oren M, Rotter V. Inhibition of cell growth mediated by plasmids encoding p53 anti-sense.  
*Oncogene* 1987;1:277-83.
  
66. Silva JM, Dominguez G, Garcia JM, Gonzalez R, Villanueva MJ, Navarro F *et al.* Presence of tumor DNA in plasma of breast cancer patients: clinicopathological correlations.  
*Cancer Res* 1999;59:3251-6.
  
67. Sjalander A, Birgander R, Hallmans G, Cajander S, Lenner P, Athlin L *et al.* p53 polymorphisms and haplotypes in breast cancer.  
*Carcinogenesis* 1996;17:1313-6.
  
68. Soehnge H, A.Ouhtit, H.N.Ananthaswamy. Mechanisms of induction of skin cancer by UV radiation.  
*Frontiers in Bioscience* 1997;2:538-51.

69. Steinmeyer K, Maacke H, Deppert W. Cell cycle control by p53 in normal (3T3) and chemically transformed (Meth A) mouse cells. I. Regulation of p53 expression.  
*Oncogene* 1990;5:1691-9.
  
70. Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F *et al.* Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer.  
*Nature* 1998;393:229-34.
  
71. Takahashi T, Nau MM, Chiba I, Birrer MJ, Rosenberg RK, Vinocour M *et al.* p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer.  
*Science* 1989;246:491-4.
  
72. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M *et al.* Genetic alterations during colorectal-tumor development.  
*N.Engl.J.Med.* 1988;319:525-32.
  
73. Wang-Gohrke S, Rebbeck TR, Besenfelder W, Kreienberg R, Runnebaum IB. p53 germline polymorphisms are associated with an increased risk for breast cancer in German women.  
*Anticancer Res* 1998;18:2095-9.
  
74. Weiss RH, Marshall D, Howard L, Corbacho AM, Cheung AT, Sawai ET. Suppression of breast cancer growth and angiogenesis by an antisense oligodeoxynucleotide to p21(Waf1/Cip1).  
*Cancer Lett.* 2003;189:39-48.
  
75. Weston A, Pan CF, Ksieski HB, Wallenstein S, Berkowitz GS, Tartter PI *et al.* p53 haplotype determination in breast cancer.  
*Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 1997;6:105-12.
  
76. Weston A, Wolff MS, Morabia A. True extended haplotypes of p53: indicators of breast cancer risk.  
*Cancer Genet.Cytogenet.* 1998;102:153-4.

- 77. WHO. The world Health Organization Histological Typing of Breast Tumors--Second Edition. Geneve. *Am.J Clin.Pathol.* 1981;78:806-16.**
- 78. Wittekind Ch, Wagner G. TNM-Klassifikation maligner Tumoren. Springer Verlag, 1998.**
- 79. Yair D, Ben Baruch G, Chetrit A, Friedman T, Hirsh YG, Gotlieb WH *et al.* p53 and WAF1 polymorphisms in Jewish-Israeli women with epithelial ovarian cancer and its association with BRCA mutations. *BJOG.* 2000;107:849-54.**

# Lebenslauf

## Ausbildung:

|                                    |                                                                                                                |
|------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| November 2005                      | Facharzt für Gynäkologie und Geburtshilfe                                                                      |
| März 2002                          | Vollapprobation                                                                                                |
| Juni 2000                          | Teilapprobation                                                                                                |
| Juli 1999 – Mai 2000:<br>Chirurgie | PJ und anschliessend Vollapprobation<br>Colombo/Sri Lanka<br>Chirurgische Klinik der LMU<br>Innenstadt/München |
| Innere Medizin<br>Gynäkologie      | ETH Zürich/Schweiz<br>RPA Hospital Sydney/Australien<br>1. Universitätsfrauenklinik<br>Maistrasse/München      |
| Oktober 1993 – Juni 1999:          | Alma Mater Universität, Leipzig und<br>Ludwig Maximilians Universität,<br>München                              |

## Schulbildung

September 1983 – Mai 1992  
Robert-Koch Gymnasium, Deggendorf, Germany  
Abitur in Mathematik, Physik, Geschichte und Englisch

## Bundeswehr

Oktober 1992 bis September 1993

## **Danksagung**

An meine Frau, Eltern und Kindern für die Geduld und Liebe die Sie mir täglich entgegenbringen.

Meinen Geschwistern für ihre aufmunternden Kommentare.

An meinen Doktorvater Herrn PD Dr. med. J. Rehbock, der mit konstruktiver Kritik und kritischen Fragen diese Arbeit ermöglichte.