

**Einfluss des Cytochroms P 450 2E1  
G-71T Polymorphismus auf das individuelle Brustkrebsrisiko  
im Zusammenhang mit den Risikofaktoren HRT und Rauchen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

vorgelegt von  
Sandra Natalie Gschwendtner  
München  
2005

Angefertigt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Y. Ko
2. Gutachter: PD Dr. med. N. Novak

Tag der mündlichen Prüfung: 04.10.2005

Aus der Medizinischen Universitäts-Poliklinik  
Direktor: Prof. Dr. med. H. Vetter

Meiner Familie



<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>Seite</b>
<b>Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen</b>	7
<b>Tabellen-und Abbildungsverzeichnis</b>	9
<b>1. Einleitung</b>	10
1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms	10
1.1.1 Regionaler Vergleich	10
1.2 Risikofaktoren allgemein	11
1.2.1 Risikofaktor HRT und Brustkrebs	15
1.2.2 Risikofaktor Rauchen und Brustkrebs	16
1.3 Kanzerogenese des Mammakarzinoms	17
1.3.1 Onkogene und Tumorsuppressorgene	19
1.3.2 Formale Pathogenese und pathohistologische Klassifikation	21
1.3.3 Wachstum und Metastasierung	24
1.3.4 Prognose	25
1.4 Fremdstoffmetabolismus	26
1.5 Cytochrom P450- Enzymsystem	29
1.6 Cytochrom P4502E1	32
1.7 Zielsetzung der Arbeit	35
<b>2. Material und Methoden</b>	37
2.1 Studiengruppe	37
2.2 Interviewdesign	38
2.3 Probenmaterial	39
2.4 DNA-Extraktion	39
2.5 Quantifizierung und Verdünnung	40
2.6 PCR	41
2.7 Real-time PCR	42
2.8 Mutationsanalyse und Sondenspezifität	45

2.9	Statistische Methoden	46
<b>1.</b>	<b>Ergebnisse</b>	47
3.1	Genotypverteilung und Brustkrebsrisiko der CYP2E1 Polymorphismen C-1053T und G-71T	47
3.2	Genotypverteilung und Brustkrebsrisiko des CYP2E1 Polymorphismus G-71T in Abhängigkeit vom Raucherstatus	50
3.3	Genotypverteilung und Brustkrebsrisiko des CYP2E1 Polymorphismus G-71T in Abhängigkeit vom HRT-Gebrauch	52
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	55
4.1	Verteilung des CYP2E1 G-71T Polymorphismus unter Patientinnen und Kontrollen und Brustkrebsrisiko	55
4.2	Bedeutung der Risikofaktoren Estrogene sowie HRT und CYP2E1 G-71T	58
4.3	Bedeutung des Risikofaktors Rauchen und CYP2E1 G-71T	62
4.4	Analyse des Studienaufbaus der Genica-Brustkrebs-Studie	64
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	67
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	69

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

μl	Mikroliter
μg	Mikrogramm
BMI	body mass index
Bp	Basenpaare
BRCA 1-Gen	Brustkrebsgen 1
BRCA 2-Gen	Brustkrebsgen 2
C	Celsius
ca.	circa
CI	Konfidenzintervall
cm	Centimeter
COR	crude odds ratio
DCIS	duktales Carcinoma in situ
DMBA	Dimethylbenzanthracen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosid-Triphosphat
ER	Estrogenrezeptoren
FME	fremdstoffmetabolisierendes Enzym
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
g	Gramm
h	Stunde
HRT	Hormonersatztherapie
ISCO	internationale Standardklassifikation der Berufe
LC	Light-Cycler
LCIS	lobuläres Carcinoma in situ
LFS	Li-Fraumeni-Syndrom
LOH	loss of heterozygosity
min	Minuten
ml	Milliliter
mRNA	messenger-RNA
NCBI	National Center for Biotechnology Information

ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OR	Odds Ratio
PCR	Polymerase Chain Reaktion
PFME	polymorphes fremdstoffmetabolisierendes Enzym
pm	pikomolar
RBC	rote Blutkörperchen (red blood cells)
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive oxygen species
RT	Raumtemperatur
SNP	Singlenukleotidpolymorphismus
TDLE	terminal duktulo-lobuläre Einheit
Tm	Schmelzwert
UV	ultraviolett
WHO	world health organisation



## Tabellen-und Abbildungsverzeichnis:

<b>Tab.1:</b>	Modifizierte Klassifikation nicht invasiver und invasiver Mammakarzinome	23
<b>Tab.2:</b>	Häufigkeiten der Genotypen (in %) des PstI/RsaI-u.DraI-Polymorphismus des CYP2E1 in unterschiedlichen ethnischen Gruppen modifiziert nach Stephans et al., 1994	34
<b>Tab.3 a)u.b):</b>	PCR-Primer und Hybridisierungsproben für CYP2E1-Polymorphismen	43/44
<b>Tab.4:</b>	PCR-Temperaturprofil	45
<b>Tab.5:</b>	Genotypverteilung und Brustkrebsrisiko der CYP2E1 Polymorphismen C-1053T und G-71T	49
<b>Tab.6:</b>	Brustkrebsrisiko in Abhängigkeit vom Raucherstatus	50
<b>Tab.7:</b>	Genotypverteilung in Abhängigkeit vom Raucherstatus	51
<b>Tab.8:</b>	Brustkrebsrisiko in Abhängigkeit vom HRT-Gebrauch	52
<b>Tab.9:</b>	Genotypverteilung in Abhängigkeit von der HRT-Einnahme	53
<b>Tab.10:</b>	Genotypverteilung des CYP2E1 G-71T Polymorphismus unter den Kontrollen	55
<b>Tab.11:</b>	Genotypverteilung des CYP2E1 G-71T von 99 anonymen Individuen aus der <i>SNP500Database</i>	56
<b>Abb.1:</b>	Die Eigenschaften maligner Tumorzellen	24
<b>Abb.2:</b>	Grundkonzept der Interaktion von Exposition genetisch determinierten Polymorphismen der FME und toxischen Effekten (schematisch) (Thier et al., 1999)	27
<b>Abb.3:</b>	(Koolmann,1998)	28
<b>Abb.4:</b>	Cytochrommechanismus (Berg et al., 2003)	31
<b>Abb.5:</b>	A: schematische Darstellung eines FaktorV PCR-Fragmentes B: Schmelzkurvenanalyse von verschiedenen Genotypen der analysierten Sequenz	42

# 1. Einleitung

## 1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms

Krebserkrankungen sind in den Industrienationen nach den Herz-Kreislaufkrankungen eine der Haupttodesursachen. Die Zahl der Neuerkrankungen an Krebs in Deutschland wird im Jahre 1998 auf insgesamt 347.500 Fälle geschätzt, von denen ca. 168.500 auf Männer und 179.000 auf Frauen entfallen. In Deutschland erkranken jährlich über 46.000 Frauen an Brustkrebs, davon etwa 19.000 im Alter unter 60 Jahren (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland 2002). Damit ist das Mammakarzinom eines der häufigsten Krebsleiden der Frau (Schmidt-Matthiesen et al., 2000; Vetter, 2001). Die Inzidenz ist seit Jahren leicht steigend und wird bundesweit auf 89 Fälle/100.000 weibliche Einwohner (altersstandardisierte Rate nach Europastandard) geschätzt. Die Erkrankung ist für knapp 26 Prozent aller Krebsneuerkrankungen bei Frauen und für mehr als ein Drittel (36 Prozent) der Neuerkrankungen bei Frauen unter 60 Jahren verantwortlich. Das mittlere Erkrankungsrisiko liegt bei 63 Jahren. Die Mortalität wird bundesweit auf 30,2 Todesfälle/1000.000 weibliche Einwohner (altersstandardisierte Rate nach Europastandard) geschätzt. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate beträgt im Mittel 73 % (Arbeitsgemeinschaft bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2002).

### 1.1.1 Regionaler Vergleich

Brustkrebs ist der vorherrschende Krebs unter Frauen in industrialisierten Ländern (McPherson et al., 2000), und weltweit die häufigste Ursache für Krebstodesfälle unter Frauen (Murray and Lopez, 1997). Im Jahr 1990 war er für 300.000 Todesfälle verantwortlich, von denen 174.100 in Industrienationen und 139.500 in Entwicklungsländern auftraten (Pisani et al., 1999). International betrachtet liegt das Risiko für 50jährige Frauen, innerhalb der nächsten 20 Jahre an Brustkrebs zu erkranken für Kaukasierinnen bei 6,6%, für Afroamerikanerinnen bei 5%, für Asiatinnen und Bewohnerinnen der pazifischen Inseln bei 3,9% und für Hispanierinnen bei 3,7% (Morris et al., 2001). Im europäischen Vergleich liegen die Erkrankungsraten für Deutschland im unteren Drittel. In den Niederlanden, Dänemark, Schweden und Finnland ist die

Erkrankungswahrscheinlichkeit deutlich höher, in südeuropäischen Ländern wie Spanien, Griechenland und Portugal deutlich niedriger (Arbeitsgemeinschaft bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2002).

Vergleicht man innerhalb Deutschlands die einzelnen Bundesländer miteinander, so ist insgesamt die Inzidenz des Mammakarzinoms in den Jahren 1996-1998 in den östlichen Bundesländern Brandenburg und Sachsen (74,3% und 76,2% nach altersstandardisierter Rate) unter derjenigen in den westlichen Regionen Saarland und Münster (96,7% und 85,6% nach altersstandardisierter Rate) (Arbeitsgemeinschaft bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland).

In Japan zeigte sich eine Steigerung der Brustkrebsrate von 35,5% zwischen 1960 und 1980 (Kurihara, 1984) und in Singapur wurde ein jährlicher Anstieg von ca. 3,6% zwischen 1968 und 1992 beobachtet (Seow, 1996). Brustkrebs ist verantwortlich für ein Drittel der Krebsdiagnosen und 15 % der Todesfälle durch Krebs unter den Amerikanerinnen. Damit steht er in der Inzidenz an der obersten Position, bezüglich der Mortalität jedoch an zweiter Stelle (Greenlee et al., 2002). Das Lebenszeitrisiko der Brustkrebsdiagnose liegt für U.S.-Amerikanerinnen bei 12,8 %, das Sterblichkeitsrisiko bei 3,3 % (Ries et al., 2000). Die Mortalität ist in den Vereinigten Staaten, Großbritannien und mehreren anderen Ländern während der 90er Jahre stark gesunken (Coleman et al., 2000, Peto et al., 2000).

Dieser Trend ist wahrscheinlich der verbesserten Diagnose und Therapie zu verdanken, und nicht Veränderungen der zugrunde liegenden Epidemiologie der Erkrankung.

## **1.2 Risikofaktoren allgemein**

Etablierte Risikofaktoren mit Bedeutung für das Brustkrebsrisiko sind vor allem Alter der Patientin, Familienveranlagung, frühe Menarche, späte Menopause, Alter bei Erstgeburt, nicht Stillen, benigne Brustpathologien und Hormonersatztherapie (HRT) (Whi, 2002; Clavel-Chapelon, 2002; Armstrong et al., 2000; Lichtenstein et al., 2000; Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2002). Zudem stellen veränderte Ernährung und Lebensgewohnheiten der modernen industriellen Gesellschaften wichtige Risikofaktoren für die Brustkrebsentwicklung dar (Lacey et al., 2002; Willett, 2001; Coffey, 2001; Leung, 2002). Mittlerweile gilt als gesichert, dass etliche Nahrungsbestandteile und Lebensgewohnheiten die

Kanzerogenese u.a. von gynäkologischen Tumoren beeinflussen (Willett, 2001; Trichopoulou, 2000). Ernährungsbedingte Faktoren werden für ca. 30% der Krebsarten in entwickelten Ländern verantwortlich gemacht (Key et al., 2002). In diesem Zusammenhang werden immer wieder die Inzidenzanstiege bei Japanerinnen, die in die USA emigriert sind, angeführt. Asiatische Frauen, die eine geringere Mammakarzinomrate in ihren Ländern haben, zeigten eine rapide Erhöhung der Brustkrebsinzidenz nach Immigration in die USA (Lacey et al., 2002; Deapen, 2002). So war die jährliche Inzidenz für Chinesinnen, die in Shanghai lebten halb so groß wie für Chinesinnen, die in Hawaii oder San Francisco lebten (Parkin et al., 1997). Bereits 10 Jahre nach Einwanderung erhöht sich die Inzidenz um 80%. Nachkommen von asiatischen Einwanderern weisen die gleiche Inzidenz auf wie weiße US-Amerikanerinnen. Das Brustkrebsrisiko unter Immigrantinnen nähert sich also dem der Ureinwohnerinnen an (Stanford et al., 1995). Auch bei Türkeninnen, die in Deutschland leben, konnte eine gesteigerte Mammakarzinominzidenz festgestellt werden, wobei sich die Sterblichkeitsrate fast verdoppelt hat (Zeeb et al., 2002). Diese Daten wie auch Untersuchungen an Zwillingen (Lichtenstein et al., 2000) unterstützen die Annahme, dass ernährungsbedingte Faktoren und Lebensgewohnheiten wesentlich größere Bedeutung in der Brustkrebsentstehung haben, als eine genetische Prädisposition. Ein erhöhtes Körpergewicht wurde mit ca. 5% aller Krebsarten in der Europäischen Union assoziiert - 3% bei Männern und 6% bei Frauen. Dies entspricht jährlich ca. 27.000 männlichen und 45.000 weiblichen Krebsfällen, einschließlich 12.800 Mammakarzinome (Bergstrom et al., 2001). Übergewichtigen Frauen wird ein höheres Brustkrebsrisiko zugesprochen, obwohl dies nicht gleichermaßen für jugendliche, prä- und postmenopausale Frauen gilt (Favero et al., 1998). In den letzten 100 Jahren ist das Durchschnittsalter der Menarche von 16 auf 13 Jahre in allen Industrienationen gesunken (Merzenich et al., 1993; Stoll, 1998). Hierfür mitverantwortlich ist der gute Ernährungszustand im Kindesalter als Folge einer fettreichen Ernährung mit mangelnder körperlicher Aktivität (Merzenich et al., 1993; Stoll, 1999). Zudem wird, im Zusammenhang mit dem BMI, eine erhöhte Konzentration von bioverfügbarem Estradiol beobachtet, die sowohl zu einer Zunahme des Brustkrebsrisikos wie auch des Endometriumkarzinoms führt (Favero et al., 1998; Clemons und Goss, 2001; Key et al., 2001).

Mehr als 20 Studien haben den Zusammenhang zwischen dem Verzehr von Fleisch- und Milchprodukten und Brustkrebsrisiko mit widersprüchlichen Ergebnissen untersucht. In einer Metaanalyse (Missmer et al., 2002) mit 351.041 Frauen, von denen 7.379 mit einem invasiven Mammakarzinom während eines 15-jährigen „Follow-up“ diagnostiziert wurden, zeigte sich

keine signifikante Korrelation zwischen Brustkrebs und dem Verzehr von Fleisch, entweder als rotes Fleisch (z.B. Rind, Schwein) oder als weißes Fleisch (z. B. Huhn, Ente), totalen Milchprodukten und Brustkrebsrisiko. Beim Braten jedoch steigt die Konzentration von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen deutlich an. So enthalten 200 g Steak 10 µg, 200 g Kochfleisch dagegen nur 0,006 µg Benzpyrene (El-Bayoumy, 1992). In der Iowa Women`s Health Study war das Erkrankungsrisiko für Frauen, die gut durchgegarnte Fleischzubereitungen vorzogen gegenüber dem Genuss von nur halbgaren Produkten signifikant erhöht (Zheng et al., 1998).

In einem retrospektiven Interview von 2.599 Patientinnen mit Brustkrebs und 2.588 Kontrollpatientinnen konnte eine erhöhte Kalorienzufuhr, vermehrte Aufnahme von gesättigten Fettsäuren, Zucker und Alkohol signifikant mit einer erhöhten Inzidenz von Brustkrebs korreliert werden (Favero et al., 1999). Im Gegensatz dazu können einfach und mehrfach ungesättigte Fettsäuren (hoher Gehalt im kaltgepressten Olivenöl und Keimöl) das Brustkrebsrisiko bis zu 30% vermindern (Favero et al., 1998). Laut der Nurses Health Study (Holmes et al., 1999; Holmes et al., 1999) , die in den USA 88.795 Frauen von 1980 bis 1994 beobachtete und einer ähnlichen Studie (Velie et al., 2000), welche regelmäßig 40.022 Frauen über ihre Ernährungsgewohnheiten mit Hilfe eines Fragebogens beobachtete stellten sich während der Beobachtungszeit 2.956 bzw. 996 Mammakarzinome ein. In beiden Studien mit mehr als 130.000 Frauen konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen Brustkrebs und Gesamtfettzufuhr, dem Verhältnis gesättigter zu ungesättigten Fettsäuren und der Herkunft der Fette nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse wurden durch eine Metaanalyse von acht prospektiven Studien bestätigt (Smith-Warner et al., 2001). In der gepoolten Datenbank traten insgesamt 7 329 Brustkrebsfälle unter 351 821 Frauen ein, wobei kein Zusammenhang zwischen tierischen und pflanzlichen Fettquellen und dem menopausalen Status beobachtet wurden.

Obwohl die positiven Wirkungen von Sojaprodukten auf die Entwicklung des Brustkrebses sowie anderer positiver Effekte (Osteoporoseprävention, Lipidstoffwechsel, kognitive Funktionen) noch nicht eindeutig geklärt sind (Messina et al., 2002), wurde eine Anreicherung der Ernährung mit Sojaprodukten, Getreide, Gemüse und Früchten empfohlen (NAMS, 2000). In der bislang größten Fall-Kontrollstudie über Alkoholkonsum mit 2.569 Brustkrebspatientinnen und 2.588 Kontrollpersonen, wurde eine deutliche Dosis-Wirkungs-Beziehung ermittelt (Ferraroni et al., 1998). Die multivariate OR war 1,21 für Alkoholkonsumenten von <5,87 g/Tag, bzw. 1,23; 1,19; 1,21 für Patientinnen mit einer Alkoholfuhr von 5,88-13,40; 13,41-24,55 und 24,56-27,60

g/Tag. Die multivariate OR stieg auf 1,41 bei einem Alkoholkonsum von mehr als 27,6 g/Tag an. Die Menge und Dauer des Alkoholkonsums war mit einem erhöhten Risiko der Entwicklung von Brustkrebs assoziiert. In einer Metaanalyse von sechs Studien mit 322 647 Frauen (darunter 4 335) Mammakarzinome) zeigte sich zwischen dem Brustkrebsrisiko und regelmäßiger Alkoholaufnahme ein linearer Zusammenhang (Smith-Warner et al., 1998). Eine neuere Metaanalyse (Anonymous, 2002) zeigte, dass nur ein kleiner Prozentsatz der Brustkrebsfälle alkoholbedingt oder nur durch einen erhöhten Alkoholkonsum (>50 g/Tag) bedingt ist (Rohan et al., 2000). Einzelne Unterschiede zwischen der Wirkung des Ethanols auf das Brustepithel könnten durch einen genetischen Polymorphismus bedingt sein. Ein Mangel an Genen für die Glutathion-S-Transferasen M1 und T1 sowie der Alkoholdehydrogenase II, die für den Ethanolstoffwechsel wichtig sind, war bei Brustkrebspatientinnen signifikant häufiger als bei gesunden Kontrollgruppen zu finden (Zheng et al., 2002; Park et al., 2000; Sturmer et al., 2002). Die präventive Wirkung physischer Aktivität und Gymnastik wird durch eine Stimulierung des Immunsystems und einer verminderten Östrogenproduktion während der Erholungsphase erklärt (Hardman, 2001). Eine retrospektive Befragung von 1.945 sportlich aktiven und 1.995 inaktiven Collegestudentinnen ergab nach durchschnittlich 16 Jahren eine Abnahme des Brustkrebsrisikos um 40% für die Sportlerinnen (Wyshak et Frisch, 2000). Dagegen scheint körperliche Aktivität in der Postmenopause das Brustkrebsrisiko nicht zu verändern. Die Iowa Women's Health Study konnte bei 37.105 postmenopausalen Frauen keine Reduktion des Brustkrebsrisikos durch physische Aktivität feststellen (Moore et al., 2000).

Eine Forschungsgruppe gab 2002 eine Übersicht der Ergebnisse aus 47 Studien in 30 Ländern über den Zusammenhang von Stillen und Brustkrebs. Diese ließ die Interpretation zu, dass Frauen besser gegen diesen Tumor geschützt sind, je länger sie im Laufe ihres Lebens gestillt haben. Die kurze Stillzeit, typisch für höher entwickelte Länder, trägt in diesen maßgeblich zur höheren Brustkrebsinzidenz bei. Auch hatten erkrankte Frauen im Schnitt weniger Geburten als die Kontrollen (2,2 gegenüber 2,6). Das relative Brustkrebsrisiko sank um 4,3 % für jede 12 Monate Stillzeit zusätzlich zu einer Verminderung von 7% für jede Geburt (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast cancer, 2002).

### 1.2.1 Risikofaktor HRT und Brustkrebs

Im Zentrum der Behandlung klimakterischer Beschwerden stehen alle Maßnahmen, welche möglichst gute Therapiechancen und die Aufrechterhaltung einer guten Lebensqualität ermöglichen. Das Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko an Brustkrebs sollte dabei entweder günstig oder zu mindest nicht negativ beeinflusst werden.

Zur Beurteilung eines möglichen Kausalzusammenhanges zwischen Hormontherapie und Inzidenz eines Mammakarzinoms stehen ca. 60 epidemiologische Studien zur Verfügung. Ungefähr je ein Drittel der Studien weisen auf ein erhöhtes, ein unverändertes oder auf ein erniedrigtes Risiko hin. Das relative Risiko dieser Studien liegt im Mittel bei 1.08 (95%-Vertrauensintervall: 0.96-1.7) (Dupont und Page, 1991; Steinberg et al., 1991). Ein relatives Risiko von 1.0 weist weder auf eine günstige noch auf eine ungünstige Beeinflussung hin (Alister, 2000). Unter diesem Gesichtspunkt sind die zwischen 1975 und 2000 publizierten relativen Risiken von 0.62- 1.95 für die Klinik wenig schlüssig (Birkhäuser, 1998). 1997 wurde eine Reanalyse von 51 früheren Studien (90% der weltweit verfügbaren epidemiologischen Daten) veröffentlicht. Sie umfasste 52.705 substituierte Frauen mit und 108.411 substituierte Frauen ohne Mammakarzinom. Diese Reanalyse weist eine signifikante Erhöhung der Inzidenz von Mammakarzinomen in Abhängigkeit von der Einnahmedauer von Östrogenen alleine oder in Kombination mit Gestagenen (nur eine kleine Anzahl der erfassten Frauen) auf (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast cancer, 1997). Das relative Risiko für jedes Substitutionjahr beträgt 1.023 (95% CI: 1.01-1.04). Das relative Risiko für eine Einnahmedauer von 5 oder mehr Jahren (durchschnittlich 11 Jahre) betrug 1.35 (95%CI: 1.21-1.49). Dieser Anstieg der Inzidenz war vergleichbar mit dem, der durch eine entsprechend spätere Menopause hervorgerufen wird. Die Studie der Women's Health Initiative fand eine etwas geringeren Anstieg der Inzidenz von invasiven Mammakarzinomen (relatives Risiko 1,26; CL: 1,00-1,59) unter Hormonsubstitution mit konjugierten equinen Estrogenen und Medroxyprogesteronacetat, die nach 5-jähriger Behandlung in Erscheinung trat (Writing Group for the Women's Initiative Investigators, 2002). Das Mammakarzinom-Risiko scheint demnach in direkter Beziehung zur Therapiedauer zu stehen, wobei eine Hormonsubstitution mit einer Dauer von weniger als 5 Jahren nicht mit einem klinisch erkennbaren Anstieg des Brustkrebs-Risikos verbunden ist (Birkhäuser, 2002). Der Zusammenhang zwischen Estrogenexposition und dem Auftreten von Mammakarzinomen bei Frauen ist nicht von der Hand zu weisen. Frühe Menarche, späte

Menopause und Adipositas in der Postmenopause (Estrogenproduktion im Fettgewebe) erhöhen signifikant das Mammakarzinomrisiko (Colditz, 1998; Jefcoate, 2000; Reid, 1996). Die beidseitige Ovariectomie vor dem 40. Lebensjahr reduziert das Mammakarzinomrisiko um fast 80% (Jefcoate, 2000). Frauen ohne funktionierende Ovarien haben ein ähnlich niedriges Mammakarzinomrisiko wie Männer. Unter diesem Aspekt kann auch spekuliert werden, dass das Versiegen der ovariellen Estrogenproduktion am Ende der reproduktiven Phase einer Frau (Menopause) einen sinnvollen Mechanismus der Evolution darstellt, durch den die Exposition gegenüber endogenen Karzinogenen minimiert wird (Emons, 2002). Die hohe Effektivität von Antiestrogenen wie Tamoxifen bzw. estrogenablativen Verfahren (Ovariectomie, GnRH-Analoga, Aromatasehemmer) in der adjuvanten und palliativen Therapie und insbesondere in der Prävention kontralateraler Mammakarzinome ist durch zahlreiche prospektiv randomisierte Studien belegt (ATAC, 2002; Santen, 2002). Dieser protektive Effekt wird auf die estrogenrezeptorvermittelte Proliferationshemmung des Tamoxifens zurückgeführt. Es konnte aber auch gezeigt werden, dass Tamoxifen eine Chinonreduktase stimuliert und damit die Bildung von genotoxischen Estrogenmetaboliten reduziert (Liehr, 2001). Denkbar wäre auch der präventive Einsatz von Aromatasehemmern, der die Entstehung von Estrogenen und seiner genotoxischen Metabolite insbesondere auch direkt im Mammagewebe verhindert. Es könnte spekuliert werden, dass die noch höhere Effektivität der Aromatasehemmer darauf zurückzuführen ist, dass sie die Estrogenproduktion komplett unterbinden und damit sowohl die mitogenen als auch die mutagenen Effekte dieses Steroids verhindern (Santen, 2002). Schließlich wäre zu prüfen, ob Estrogen-wirksame Substanzen synthetisiert oder in der Natur gefunden werden, die nicht in genotoxische Metaboliten umgewandelt werden können. Solche Substanzen könnten dann mit geringerem Risiko für die Estrogensubstitution eingesetzt werden (Emons, 2002).

### **1.2.2 Risikofaktor Rauchen und Brustkrebs**

In den meisten epidemiologischen Studien konnte kein Zusammenhang zwischen Tabakkonsum und Brustkrebsinzidenz gezeigt werden. In Schweden ließ sich zwischen 1960 und 1994 parallel zum Anstieg von Lungenkrebs in der weiblichen Bevölkerung auch eine lineare Zunahme an Brustkrebs, besonders bei prämenopausalen Frauen nachweisen (Manjer et Janzon, 1999). Die



karzinogene Wirkung des Rauchens wird primär von den Effekten der aromatischen Kohlenwasserstoffe im Tabak und genetischen Polymorphismen in der N-Acetyltransferase-2 erklärt (Krajinovic et al., 2001; Welp et al., 1998). In einigen Studien (Marcus et al., 2000; Lash et al., 1999) konnte ein Zusammenhang zwischen Rauchen und Brustkrebs hergestellt werden, wobei in anderen Untersuchungen Rauchen als präventiver Faktor gewertet wurde (Gammon et al., 1998; Ghadirian et al., 1998). Diese Risikoreduktion wurde mit einer antiöstrogenen Wirkung des Rauchens erklärt, obwohl Rauchen mit erhöhtem Auftreten von hormonrezeptor-negativen Tumoren assoziiert ist, und somit als ungünstiger Prognosefaktor zu werten ist (Manjer et al., 2001).

### **1.3 Kanzerogenese des Mammakarzinoms**

Die Ätiologie des Mammakarzinoms ist auch heute noch weitgehend unbekannt. Aus molekularbiologischer Sicht tragen genetische Veränderungen zur Entstehung von Brustkrebs bei. Er manifestiert sich während eines Lebens entweder sporadisch in somatischen Zellen (90%) oder liegt bereits genetisch in der Keimbahn vor. In beiden Fällen resultiert unkontrolliertes Zellwachstum, verursacht durch einen defekten Zellzyklus, der keinen programmierten Zelltod (Apoptose) mehr erlaubt (Wu, 1996). Auch Emerit (1994) geht davon aus, dass der Beginn von Brustkrebs eine Konsequenz von kumulativen Gendefekten ist, die genetische Veränderungen verursachen, die zur Aktivierung von Proto-Onkogenen und Deaktivierung von Suppressorgen führen. Dessen folgt die unkontrollierte Zellproliferation und/oder der aberrante programmierte Zelltod oder Apoptose. Auch die Rolle der ROS (reaktive oxygen species) wird mit der Krebsätiologie in Verbindung gebracht, da sie mitose-auslösend sind und damit zur Tumorpromotion fähig sind (Emerit, 1994). Die Entstehung maligner Tumoren verläuft „nach dem Mehrstufenkonzept der Kanzerogenese“ in drei Phasen (Shields und Harris, 1991). Das Modell beschreibt den schrittweisen Prozess der Transformation somatischer Zellen. Zunächst erfolgt die Tumoringitiation, indem kanzerogene Substanzen dosisabhängig durch direkte Wechselwirkung mit zellulärer DNA einen genetischen Schaden setzen. Solange dieser Schaden nicht auf die Tochterzellen übertragen ist, besteht die Möglichkeit der Reparatur durch zelluläre Enzyme. Transformierte Zellen können sich quasi unendlich oft teilen und schränken ihre Vermehrung nicht ein, wenn sie auf benachbarte Zellen stoßen, während normale Zellen einer „Kontakt-

Inhibitor“ unterworfen sind. In der Phase der Tumorpromotion erfolgt die Proliferation der initiierten Zellen und Bildung von Tumorzellen mit Kernatypie und Kernpolymorphismus, d.h. die Realisation der molekularen Veränderungen. Das Zusammenwirken verschiedener Karzinogene (Synkarzinogenese), die Einwirkung von Kokarzinogenen oder unspezifischen Faktoren kann diesen Prozess beschleunigen. Letztere werden daher als Tumorpromotoren bezeichnet. In der dritten Phase erfolgt die klinische Manifestation des Tumors. Es liegt eine präneoplastische Läsion vor. Die Konversion zum malignen Tumor erfordert weitere genetische Veränderungen wie die Aktivierung von Protoonkogenen oder die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen.

Schließlich erlangt der Tumor die Fähigkeit zur Metastasierung und zu invasivem Wachstum, was als Tumorprogression bezeichnet wird (Riede et al., 1995).

Im Rahmen der Erforschung von Gen-Umwelt-Interaktionen gewinnt die molekulare Epidemiologie zunehmend an Bedeutung. Gene, die für die Genese von Krebserkrankungen von Bedeutung sind, können prinzipiell in zwei Gruppen unterteilt werden. Einerseits gibt es klassische Krebsgene, die per se mit einem sehr hohen Krebsrisiko assoziiert sind. Das mutierte Gen wird innerhalb einer Familie weitergegeben. Etwa 5 % der Brusttumoren folgen einem Mendel'schen Erbgang, bei dem autosomal dominant vererbte Keimbahnmutationen im BRCA1-Gen für die Tumorentstehung verantwortlich sind. Hier kommt es zu familiär gehäuften Mammakarzinomen und die betroffenen Patientinnen fallen durch ein geringes Diagnosealter auf (Holland et al., 1997). Erbfaktoren werden in einem Viertel der Brustkrebsfälle beobachtet (Liechtenstein et al., 2000). Jedoch werden Keimbahnmutationen in so genannten „High-Penetrance“ Suszeptibilitätsgenen wie BRCA1 und BRCA2 nur für 5% aller Brustkrebsfälle verantwortlich gemacht (Easton et al., 1993, Oesterreich et al., 1999).

Auf der anderen Seite gibt es die Gruppe der „Suszeptibilitätsgene“, die beim Menschen vor allem durch die Gene des fremdstoffmetabolisierenden Enzymsystems repräsentiert werden. Im Vergleich zu den klassischen Krebsgenen beeinflussen sie das relative Krebsrisiko weitaus weniger, sind aber aufgrund der Häufigkeit der mutierten Allele von großer Bedeutung (Caporsia und Goldstein, 1995). Mit großer Wahrscheinlichkeit spielen dabei zumindest bei den Hormonrezeptor-positiven Frauen auch hormonelle Faktoren und endo- sowie parakrine Wachstumsfaktoren eine wachstumsfördernde Rolle (Eppenberger et al., 1997). Auf die estrogeninduzierte Tumorentwicklung wird im Kapitel 4.2 „Bedeutung der Risikofaktoren Estrogene und HRT und CYP2E1 G-71T“ eingegangen.

### 1.3.1 Onkogene und Tumorsuppressorgene

Onkogene liegen unter physiologischen Bedingungen in nicht transformierten Zellen als Proto-Onkogene oder c-Onkogene vor. Ihre Genprodukte haben unterschiedliche Funktionen, etwa die von Wachstumsfaktoren, G-Proteinen oder Tyrosin-Kinasen. Mutationen in Proto-Onkogenen sind dominant, so dass die Alteration eines Allels für die Aktivierung zum Onkogen ausreicht. Dadurch kann es durch eine Überexpression von Onkoproteinen zu unkontrollierten Wachstums- und Proliferationsvorgängen kommen. Die auch als Anti-Onkogene bezeichneten Tumorsuppressoren inhibieren solche Proliferation, indem sie beispielsweise den Zellzyklus-Prozess verzögern (Macdonald und Ford, 1997). Mit der Methode der somatischen Zellhybridisierung erkannte man bereits 1969, dass die Tumorgenität maligner Zellen durch Chromosomen aus nicht-neoplastischen Zellen unterdrückt werden kann. Die Tumorsuppressoren waren aber noch nicht identifiziert (Harris et al., 1969). Ein prominentes Beispiel ist das Rb-Protein, ein Transkriptionsfaktor, der die Expression von Genen für DNA-Replikationsvorgänge negativ reguliert. Der Ausfall („loss of Funktion“) des Rb-Proteins begünstigt demnach eine unregulierte DNA-Replikation. Das Protein p16<sup>ink4a</sup> ist ein Inhibitor von zyklinabhängigen Protein-Kinasen. Ein weiterer wichtiger Vertreter ist das Protein p53, das nach Schädigung des Genoms in Aktion tritt und als Transkriptionsfaktor u.a. das Gen eines Inhibitors für cyclinabhängige Kinasen aktiviert. Dieses Tumorsuppressorgen wurde 1979 von zwei unabhängigen Forschungsgruppen beschrieben (Lane und Crawford, 1979; Linzer und Levine, 1979). Der Name entstand aufgrund des Molekulargewichts von 53 kD. Finlay et al. (1989) konnten zeigen, dass das p53 Wildtypgen in der Lage ist, als Tumorsuppressorgen zu agieren: In der Zellkultur war es möglich, die Proliferation von transformierten Zellen zu blockieren sowie den malignen Phänotyp der Zellen umzukehren. So wird eine maligne Entartung von Zellen verhindert. P53 übernimmt eine Schlüsselfunktion in der schadensinduzierten Regulation der Zellproliferation (Checkpoint Control). Normalerweise hat es eine kurze Halbwertszeit des Überlebens ( je nach Zelltyp zwischen 20 Minuten und 2 Stunden) Der Grund dafür ist eine Wechselwirkung mit dem Protein Mdm2, das den Abbau von p53 über den Ubiquitinweg einleitet. In Zellen mit beschädigter DNA übertragen DNA-PK oder ATM- und Checkpoint-Kinasen Phosphat-Gruppen auf p53: es verliert den Kontakt mit Mdm2 und entgeht dem Abbauweg. Jedenfalls steigt unter diesen Bedingungen die Menge an p53 in den Zellkernen um ein Vielfaches an. Das Protein wirkt als Transkriptionsfaktor und aktiviert einige Dutzend Gene.

Darunter ist das Gen für das Protein p21<sup>Cip1</sup>, das verschiedene cyclinabhängige Proteinkinasen hemmt und den Zellzyklus in der G1-Phase anhält. Außerdem bindet es an den Prozessivitätsfaktor PCNA und unterbricht dadurch eine laufende DNA-Replikation. Die Zelle erhält eine Ruhephase, die sie für die Reparatur von DNA-Schäden nutzen kann. Reicht die Kapazität des Reparaturmechanismus nicht, löst p53 einen Mechanismus aus, der zum Absterben der Zelle führt (Apoptose), so dass der Organismus vor den Auswirkungen von Genomschäden geschützt wird. (Knippers, 2001). Wie wichtig das ist zeigt sich, wenn das Gen p53 durch Mutation verändert ist (TP53). Mutationen des p53 Gens und die konsekutive Akkumulation des mutierten p53-Proteins führen zum Funktionsverlust und damit zu einer erhöhten Transduktionswahrscheinlichkeit für die betroffene Zelle, unabhängig davon, ob es sich um somatische oder Keimbahnmutationen handelt (Friedrichs, 1994). Malkin et al. (1990) gelang der Beweis, dass ein seltenes familiäres Krebsyndrom in fast allen Fällen durch Keimbahnmutationen des p53 Gens der Familienmitglieder begründet ist. Einige hundert Familien auf der ganzen Welt sind von dieser raren genetischen Erkrankung betroffen, die als Li-Fraumeni-Syndrom (LFS) Eingang in die Literatur fand. Es handelt sich um ein dominant vererbtes familiäres Krebsyndrom, das für die betroffenen Familienmitglieder mit einem dramatisch erhöhten Risiko (in etwa 25% Mammakarzinome, aber auch Sarkome, Leukämien oder Hirntumore) an Krebs zu erkranken einhergeht. Relativ oft entwickeln sich diese Tumoren vor dem 30. Lebensjahr und treten bei einigen Patienten metachron auf. Trägerinnen eines mutanten p53 Gens sind somit sicher als Hoch-Risiko-Kandidatinnen für die Entwicklung eines Mammakarzinoms aufzufassen. Es handelt sich bei dieser Patientengruppe natürlich um ein sehr kleines Kollektiv, aber auch sporadische Mammakarzinome könnten durch den Verlust der p53-Funktion begünstigt werden (Friedrichs, 1994). Ein Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen erfolgt in der Regel erst, nachdem beide Allele von Mutationen betroffen sind; sie sind rezessiv wirksam. Die „Zwei-Schritt-Hypothese der Inaktivierung“ besagt, dass bei erblichen Tumoren die erste Mutation in der Keimbahn stattfindet, so dass alle Zellen des Organismus davon betroffen sind. Die zweite Mutation auf somatischer Ebene führt zum LOH (loss of heterozygosity) und damit zum Funktionsausfall des betroffenen Gens. Bei sporadischen Tumoren erfolgen beide Inaktivierungsschritte aus somatischer Ebene. Der Zeitraum zwischen beiden Mutationen kann sehr groß sein (Knudsen, 1971).

### 1.3.2 Formale Pathogenese und pathohistologische Klassifikation des Mammakarzinoms

Beim Mammakarzinom handelt es sich grundsätzlich um einen malignen epithelialen Tumor des Brustdrüsenparenchyms. Die Brustdrüse der Frau besteht aus Drüsenläppchen und einem Gangsystem. Das terminale Gangsegment mit dem Läppchen bezeichnet man als terminale duktulo-lobuläre Einheit (TDLE), welche ein Kompartiment stärkster proliferativer Aktivität darstellt und der Ausgangsort der überwiegenden Zahl der Karzinome ist (Bässler, 1997). Die Entstehung eines Karzinoms in den großen Ausführungsgängen ist vergleichsweise selten (Böcker et al., 2001). Die Begriffe duktales und lobuläres Karzinom bezeichneten einst getrennte anatomische Ursprungsorte (Ductus bzw. Lobulus); diese Begriffsbestimmung ist inzwischen als nicht mehr zeitgemäß aufzufassen (Lagios, 2000). In vielen, wenn nicht sogar in allen Fällen, hält sich das Mammakarzinom zunächst noch an die natürlichen Grenzen der Milchgänge oder der Läppchen. Diese Phase wird als präinvasive Phase des Mammakarzinoms (Carcinoma in situ, nicht invasive Karzinome) bezeichnet (Böcker et al., 2001). Diese nicht invasiven Karzinome werden vom gefäßführenden Fett- und Bindegewebe durch eine intakte Basalmembran (fakultativ durch Myoepithelzellen) abgegrenzt, wobei ihr Anteil zwischen 5-30% aller Mammakarzinome liegt. Nach der derzeit gültigen histologischen Klassifikation der WHO werden sowohl das duktales Carcinoma in situ (DCIS, 95%) als auch das lobuläre Carcinoma in situ (LCIS, 5%) zu den nicht invasiven Karzinomen gerechnet (WHO, 1981). Beide unterscheiden sich aber in ihrer biologischen Potenz. Beim LCIS handelt es sich um eine präkanzeröse Läsion, deren Prognose allerdings im Vergleich zum duktales Carcinoma in situ günstiger ist (Bässler, 1997). Im Gegensatz zum LCIS stellt das DCIS keine Präkanzerose, sondern ein malignes, intraduktales (nicht invasives) Karzinom, also das früheste Stadium dieser Erkrankung dar, das potentiell rezidivieren und invasiv transformieren kann (Bastert und Costa 1996). Die Eigenart dieser Karzinome, sich langsam in dem präformierten Gangsystem der Mamma auszubreiten, führt häufig zu einer Unterschätzung klinischer und mammographischer Symptome; nach biopsisch gesichertem intraduktales Karzinom entstehen invasive Karzinome in ca. 30% der Fälle (Fryberg und Blank, 1994). Intraduktales Karzinome sind prognostisch günstige Tumoren, bei denen die Überlebensrate 94-96% beträgt (Bässler, 1998). Invasive Mammakarzinome sind infiltrativ wachsende, maligne, epitheliale Tumoren, die ihren Ausgangspunkt von In-situ-Karzinomen nehmen. Die Typisierung von invasiven Karzinomen hat nachgewiesenermaßen prognostischen Wert (Sloane et al., 1997). Nach dem histologischen Aufbau lassen sich 90% der invasiven

Karzinome unterschiedlichen Wachstumsmustern zuordnen. Die derzeit gültige histologische Klassifikation invasiver Mammakarzinome (Rosen und Oberman, 1993), welche in der **Tabelle 1** abgebildet ist, stellt eine modifizierte Version der WHO-Klassifikation aus dem Jahre 1981 dar (WHO, 1981), die eine grundsätzliche Unterscheidung der Mammakarzinome entsprechend ihrer biologischen Verhaltensweise in invasive und nicht invasive Karzinome vorsieht. Innerhalb dieser beiden Gruppen unterscheidet man weiter entsprechend der pathogenetischen Topik in duktale und lobuläre Mammakarzinome sowie nach dem Differenzierungsgrad.

Grundlage dieser Klassifikation ist der histologische Phänotyp des Tumors, wobei pathogenetische Beziehungen keine Berücksichtigung finden. Bei der histologischen Typisierung ist im Falle einer Ausbildung mehrerer Tumorkomponenten diejenige mit dem prädominierenden Anteil in den Vordergrund zu stellen. Gegebenenfalls ist es auch möglich, die wichtigsten Komponenten gleichwertig in die Diagnose einzubeziehen. Letztendlich ist beim Mammakarzinom ein gleichförmiger, isolierter Tumortyp eher die Ausnahme.

**Tab.1: Modifizierte Klassifikation nicht invasiver und invasiver Mammakarzinome**

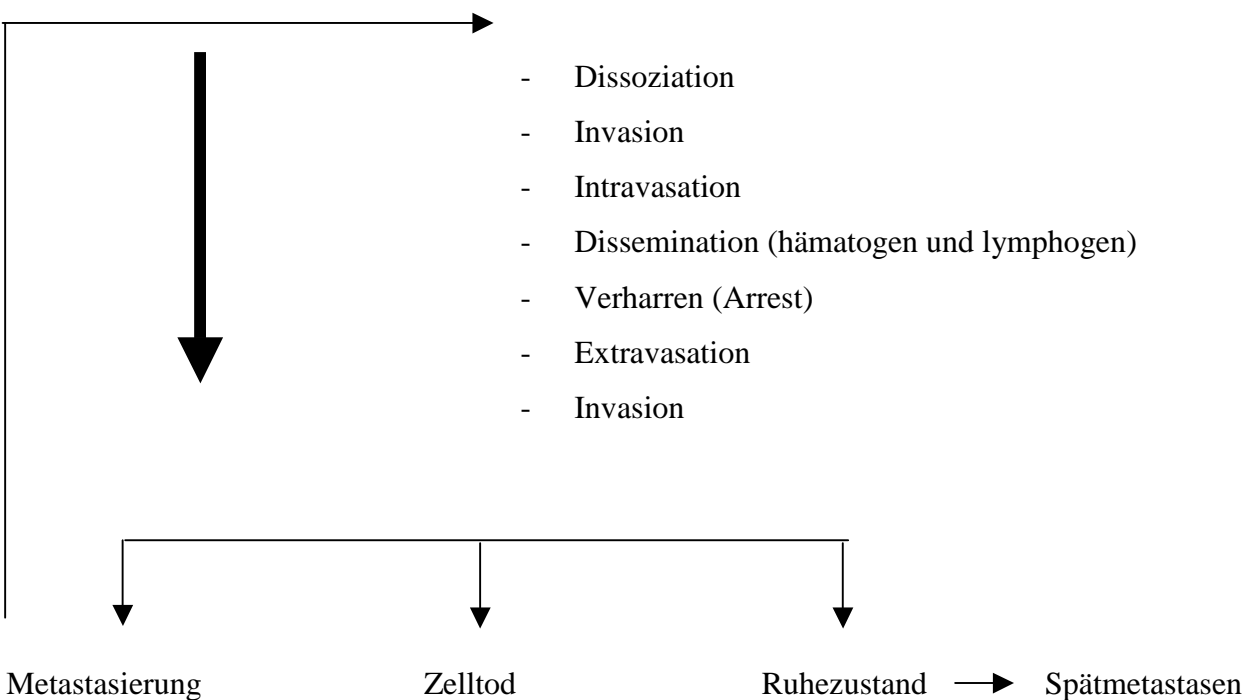
<b>Invasivität</b>	<b>Histologischer Phänotyp</b>
<b>Nicht invasiv</b>	Duktales Carcinoma in situ (intraduktales Karzinom)
	Duktales Carcinoma in situ mit Paget-Erkrankung der Mamille
	Lobuläres Carcinoma in situ
<b>Invasiv</b>	Invasives duktales Karzinom
	Invasives duktales Karzinom mit Paget-Erkrankung der Mamille
	Invasives duktales Karzinom mit prädomonierender intraduktaler Komponente
	Invasives lobuläres Karzinom
	Muzinöses Karzinom
	Medulläres Karzinom
	Papilläres Karzinom
	Tubuläres Karzinom
	Adenoid-zystisches Karzinom
	Sekretorisches (juveniles) Karzinom
	Apokrines Karzinom
	Karzinom mit Metaplasie
	Karzinom mit osteoklastischen Riesenzellen
	Zystisch-hypersekretorisches Karzinom mit Invasion
	Karzinom mit endokriner Differenzierung
	Glykogenreiches Karzinom
Lipidreiches (lipidbildenes) Karzinom	
Invasives kribiformes Karzinom	

### 1.3.3 Wachstum und Metastasierung

Vereinfacht lässt sich die Aggressivität eines Tumors und damit die Prognose der Tumorpantin auf zwei zentrale Eigenschaften der malignen Tumorzelle, welche in der **Abbildung 1** näher charakterisiert werden, zurückführen (Engers und Gabbert, 1998; Jänicke, 1998).

- **Wachstum:**
  - Differenzierungsblockade und unkontrollierte Expansion des Stammzellkompartiments
  - abnorme Proliferation
  - Dysregulation der Apoptose

- **Metastasierung:**



**Abb.1: Die Eigenschaften maligner Tumorzellen**

Von der Initiation der Karzinogenese bis zum Tod des Tumorträgers durch Metastasierung beansprucht das Mammakarzinom einen Zeitraum von 25-30 Jahren (Oeser, 1980). Dabei nimmt die klinisch apparente Phase etwa ein Drittel dieser Zeit ein, die mit einer Tumorgöße von 1 cm als diagnostischem Grenzwert beginnt. Bei einer Tumorverdopplungszeit von 100 Tagen benötigt



der Tumor zehn Jahre bis zu einem Durchmesser von 1 cm mit ca.  $10^9$  Tumorzellen. Aber nicht nur dieser lange Verlauf erklärt, warum Metastasen häufig erst spät entstehen, gelegentlich nach 10-20 Jahren nachweisbar sind. Viele metastatisch über den Organismus disseminierte Tumorzellen verharren zunächst in einem als Tumor-Dormancy bezeichneten Ruhezustand. Das Ende eines solchen Zustandes äußert sich klinisch am eindrucksvollsten in dem Auftreten von Spätmetastasen und beruht wahrscheinlich darauf, dass tumoreigene Wachstums- und Angiogenesefaktoren das Übergewicht über solche Faktoren gewinnen, die Proliferation und Angiogenese hemmen (Pantel et al., 1993). Grundsätzlich gilt, dass die Mehrzahl der in die Peripherie gelangten Tumorzellen vor Ort verschwinden oder in einem ruhenden Zustand verbleiben bzw. nur ein Bruchteil der disseminierten Tumorzellen die Fähigkeit zur Entwicklung einer Metastase besitzt (Orr et al., 1993). Beim Mammakarzinom läßt sich die lymphogene von der hämatogenen Metastasierung unterscheiden.

#### **1.3.4 Prognose**

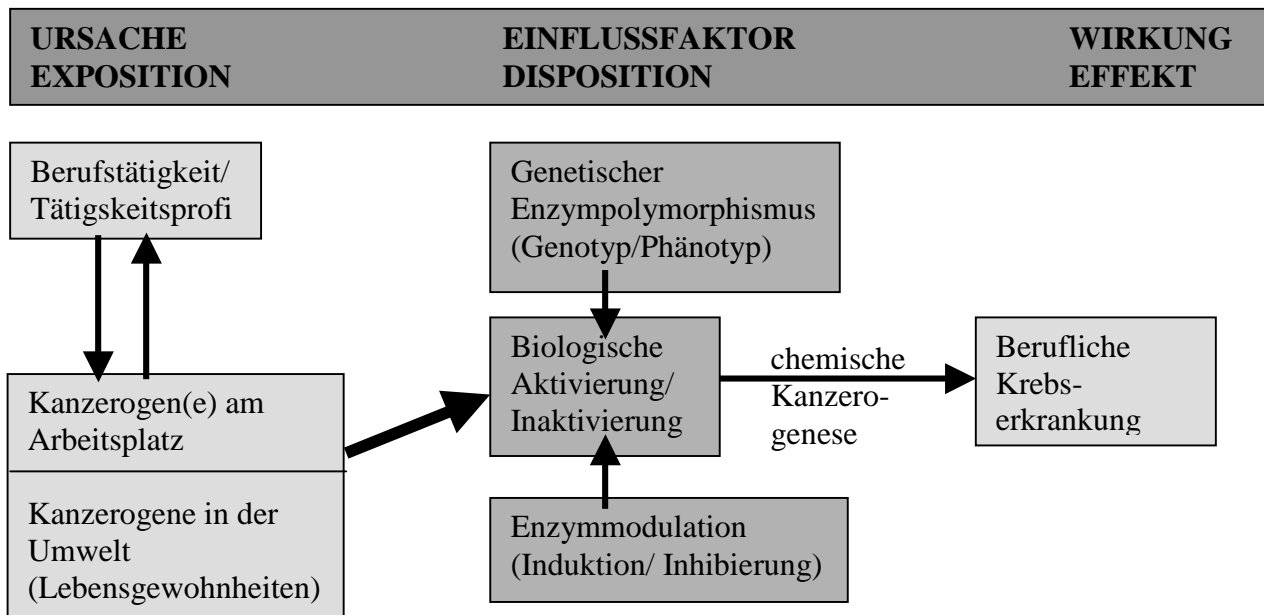
Die echte Heilungsrate des Mammakarzinoms liegt weltweit derzeit bei 35-40%, wobei eine Spontanheilung noch nie beobachtet worden ist. Das Mammakarzinom ist zu 40-60% im oberen, seitlichen Quadranten, zu 12-18% im oberen, inneren Quadranten sowie am Mammillenzentrum und zu 5-10% in den unteren Quadranten lokalisiert. Zentral gelegene Geschwülste zeigen die ungünstigste Prognose. Besonders bemerkenswert ist die häufige Multifokalität und Multizentrität des Mammakarzinoms (Schmidt-Matthiesen et al., 2000). Die Häufigkeit metastasierender Mammakarzinome (Neuerkrankungen) in der Bundesrepublik Deutschland wird aktuell mit 18.000-20.000 Fällen pro Jahr angegeben; für Mammakarzinompatientinnen in diesem Erkrankungsstadium bestehen trotz modernster Therapiemethoden bis zum heutigen Zeitpunkt keine Heilungsmöglichkeiten (Hepp et al., 1999). In einem Zeitraum von 5-20 Jahren nach operativer Behandlung erfahren noch ungefähr 40-50% der Patientinnen lokale Rezidive und/oder Fernmetastasen ohne erneuten Primärherd (Seeber et al., 1995). Vetter (2001) betonte diesbezüglich die Notwendigkeit einer besseren Brustkrebs-Prävention durch das Wissen um individuelle Risikofaktoren und dem Meiden karzinogener Noxen. Grundsätzlich betrachtet, scheint die Prognose auf einer dynamischen Interaktion zwischen anatomischer Ausdehnung des Karzinoms zum Zeitpunkt der Diagnose einschließlich stattgehabter Mikrometastasierung und

dem Wachstumspotential (Aggressivität oder Virulenz) einerseits und dem Grad der Immunkompetenz des Wirtes („Host-defense“-Mechanismus) andererseits sowie dem Zeitpunkt des Therapiebeginns zu basieren (Leis, 1987). Auch nach Seeber et al. (1995) hängt die Prognose eng mit der Größe des Primärtumors und dem Lymphknotenstatus zusammen. Die Prognose der Tumorerkrankung ist ebenfalls eng mit der zur Verfügung stehenden Therapie im Sinne von Wirksamkeit (auch in Bezug auf die Lebensqualität der Frauen), Toxizität und den Kosten verknüpft (Gasparini, 1998). Die zunehmende Inzidenz bei weitgehend gleicher Mortalitätsrate des Mammakarzinoms sind dabei Ausdruck einer verbesserten Heilungschance. Letztendlich weist Obrecht (1995) auf die Tumorzelllast („tumor load“) und die Resistenz gegenüber tumorhemmenden Substanzen als die wichtigsten Determinanten der Prognose hin.

#### **1.4 Fremdstoffmetabolismus**

Zunehmend tritt die individuelle Suzeptibilität des Menschen gegenüber chemischen Stoffen, insbesondere Schadstoffen am Arbeitsplatz und in der Umwelt, bei der Entstehung chronischer Erkrankungen in den Vordergrund des toxikologischen Interesses (Zbinden, 1992). Die Schäden und Folgen für den menschlichen Organismus, die durch kanzerogene Substanzen verursacht werden, hängen von individuellen Faktoren ab, die als Suszeptibilitätsfaktoren bezeichnet werden und eine unterschiedliche Enzymausstattung des fremdstoffmetabolisierenden Systems und des DNA-Reparaturmechanismus bedeuten. Aufgenommene Fremdstoffe unterliegen einer schrittweisen Biotransformation, in deren Verlauf Metabolite entstehen können, die ein größeres oder geringeres toxisches oder kanzerogenes Potential als die Ausgangssubstanz haben. Die biologisch aktive Dosis dieser Metabolite ist abhängig von der Dosis exogen aufgenommener Fremdstoffe und von der Stoffwechselleistung fremdstoffmetabolisierender Enzyme (FME). Eine Ursache der individuell unterschiedlichen Stoffwechselleistungen besteht in der Variabilität der Gene, die diese Enzyme kodieren. Die Enzyme des Fremdstoffmetabolismus werden mit ihren polymorphen Varianten zu den angeborenen Suzeptibilitätsfaktoren gezählt. Mutationen, die mit einer Häufigkeit von mindestens 1% in der Bevölkerung in einem Gen für ein FME auftreten, werden als Polymorphismen bezeichnet (Bolt, 1994). Unterschiede an einzelnen Basenpaaren bezeichnet man als Single-Nucleotid-Polymorphismus oder SNP („snip“). Einige Millionen SNPs sind inzwischen identifiziert und teilweise kartiert worden ([www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP)). Die

Häufigkeit der einzelnen Varianten kann in verschiedenen Bevölkerungsgruppen sehr unterschiedlich sein. Für den Beitrag der polymorphen FME (PFME) auf die Entstehung chronischer Erkrankungen in der Bevölkerung sind das relative Risiko, das mit dem Vorliegen einer Interaktion von Fremdstoffbelastung und genetischem Polymorphismus assoziiert ist, und die Häufigkeit dieser Kombination in der Bevölkerung ausschlaggebend. Bei komplexen Erkrankungen, die durch exogene Risikofaktoren mitverursacht werden, sind Risikoeingrenzungen über eine Senkung der Fremdstoffbelastung in suszeptiblen Personengruppen möglich. Nur wenige Studien haben bisher die Wechselwirkung von Genotyp und Exposition genauer untersucht („gene-environment interaction“), (Thier et al., 1999). Das derzeitige Grundkonzept ist in **Abbildung 2** schematisch wiedergegeben.



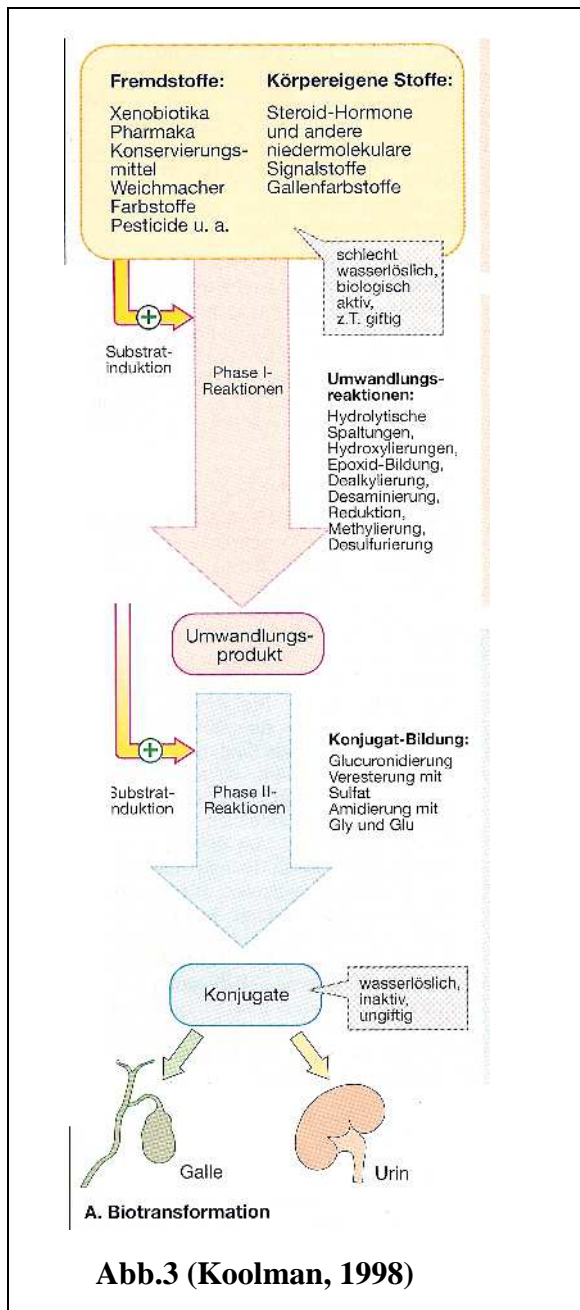
**Abb.2: Grundkonzept der Interaktion von Exposition, genetisch determinierten Polymorphismen der FME und toxischen Effekten (schematisch)** (Thier et al., 1999)

Das fremdstoffmetabolisierende Enzymsystem bildet eine große Gruppe von überwiegend membranständigen Enzymen, die neben Fremdstoffen (Arbeitsstoffe, Umweltchemikalien, Arzneistoffe) auch endogene Substrate (Fettsäuren, Hormone, auch Ethylen), aktivieren oder inaktivieren. Charakteristisch für FME ist die häufig breite Spezifität, die auf eine hohe Redundanz des Systems schließen läßt (Thier et al., 1999). Die große Variabilität der individuellen Reaktionen auf Medikamente beruht ebenfalls auf Unterschieden in den Enzymen,

die Medikamente umzusetzen und wieder auszuscheiden. Man schätzt, dass mehr als die Hälfte der gebräuchlichen Medikamente durch Enzyme aus der Superfamilie von Monooxygenasen der Cytochrom P450-Gruppe metabolisiert wird, und man weiß, dass die Gene für diese Klasse von Enzymen hochpolymorph sind (Knippers, 2001).

Die Enzyme des Fremdstoffmetabolismus haben die Aufgabe, die Ausscheidung durch Umwandlung in wasserlösliche Metabolite zu ermöglichen und damit eine Akkumulation von Fremdstoffen im Körper zu verhindern. Hinsichtlich der Funktion werden FME in Enzyme der Phase I und der Phase II gegliedert. In der ersten Phase finden Aktivierungs- bzw. Umwandlungsreaktionen statt, bei denen apolare, lipophile Substanzen in polare, hydrophile

Stoffe umgewandelt werden. Dazu werden funktionelle Gruppen demaskiert oder in das Substrat eingefügt. In der zweiten Phase werden die Metaboliten mit endogenen Molekülen konjugiert. Daraus resultieren stark hydrophile Produkte, die leicht vom Körper ausgeschieden werden können (Marquardt et al., 1994). Interessanterweise können einige Xenobiotika durch Phase I-Reaktionen zu toxischen oder kanzerogenen Verbindungen aktiviert werden. Die pathogene Potenz dieser Stoffe hängt somit entscheidend vom metabolischen Gleichgewicht zwischen Aktivierung und Entgiftung ab (Kawajiri et al., 1993). Wichtige Biotransformationsreaktionen der Phase I sind hydrolytische Spaltungen, Oxidationsreaktionen, Reduktionsreaktionen, Methylierungen und Desulfurierungen, wie sie auch in **Abbildung 3** dargestellt sind (Koolman, 1998). Abhängig vom Substrat führen diese Reaktionen zur Entgiftung oder Giftung. Ein Beispiel für typische Enzyme der Phase I sind Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen. Die Phase II dient primär der



Entgiftung. Abhängig vom Reaktionstyp und Stoff können dabei erneut hochreaktive Intermediate entstehen, die dann zelluläre Makromoleküle irreversibel schädigen können (Thier et al., 1999). Wegen der überlappenden Substratspezifitäten zwischen den Enzymen der FME kann man vermuten, dass eine einzelne Variante vom genetischen Widtyp meist mit einer gewissen Toleranz abgefangen werden kann. Von besonderem Interesse sind daher Kombinationen der Varianten von mehreren PFME. Kombinationen solcher Varianten wurden bisher erst ansatzweise untersucht, da diese mit einer nur geringen Prävalenz zu erwarten sind und deshalb im Ansatz einen großen Studenumfang erfordern. Für die Bereiche der Arbeits- und Umweltmedizin erscheinen in diesem Zusammenhang in erster Linie von den PFME der Phase I verschiedene Isoformen des Cytochrom P450, von den Enzymen der Phase II insbesondere N-Acetyltransferasen und Gluthiontransferasen wichtig (Bolt, 1994).

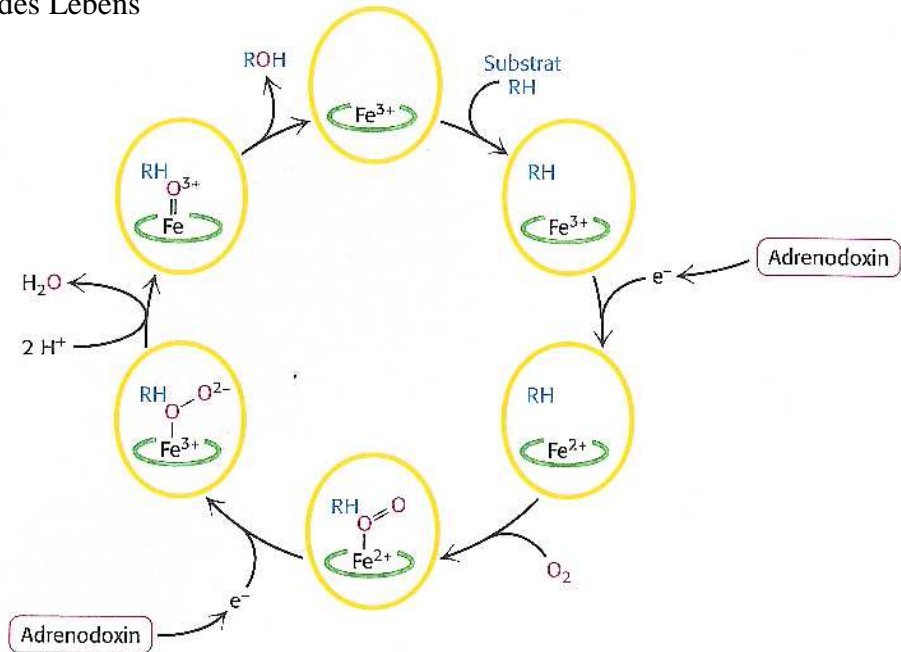
### **1.5 Cytochrom P450-Enzystem**

Das Cytochrom P450-System, das eine Superfamilie von Isoenzymen darstellt, hat eine besondere Bedeutung im Fremdstoffmetabolismus und in der metabolisch vermittelten Toxizität von Xenobiotika. Zahlreiche Fremdstoffe bedürfen zunächst einer Aktivierung durch dieses System, um direkt oder durch Folgereaktionen toxisch zu wirken. Dies geschieht in der Regel durch Einfügen eines Sauerstoffatoms in das Substrat und stellt eine typische Phase I-Reaktion des Metabolismus dar. Diese Tatsache ist insbesondere im Bezug auf den Stoffwechsel von (Pro-)Kanzernogenen und zytotoxischen Substanzen von Bedeutung (Gonzalez und Gelboin, 1994; Guengerich, 1991). Trotz der generellen Schutzfunktion des P450-Systems beim Entfernen fremder chemischer Substanzen, ist seine Aktivität nicht immer von Nutzen. Einige der stärksten Karzinogene entstehen aus harmlosen Substanzen *in vivo* erst durch die metabolische Aktivierung durch das P450-System (Berg, 2003). Auch Nelson et al. (1993) bezeichnet die Cytochrom P450-System als eine der größten und der funktionell vielfältigsten Superfamilien der Hämproteine. Dieses System ist phylogenetisch sehr alt. Im Laufe der Evolution haben viele Pflanzen- und Tierspezies ihr eigenes Sortiment an CYP P450 entwickelt (Gonzalez, 1990). Die P450-Enzyme der Säuger werden von acht Genfamilien codiert. Die ersten P450-Proteine in der Evolution waren wahrscheinlich an Synthese und Abbau von Fettsäuren und Steroiden beteiligt. Die Entgiftung von Fremdstoffen durch P450 entwickelte sich erst später (Stryer, 1994). Um die

Mechanismen zu erklären, die verantwortlich sind für die Entstehung der P450-Vielfältigkeit, bedient man sich der Theorie der molekularen Triebkraft (Dover und Tautz, 1986; Dover, 1987). Diese beinhaltet, dass das Genom ein „intern-angetriebener“ Fließzustand ist, der aus einer kontinuierlichen DNA-Verschiebung resultiert. Diese kann unabhängig von natürlicher Selektion zu einer Gen-Inaktivierung oder der Entstehung neuer oder abweichender Formen führen. Diese neuen Gene erweitern überdies die Genfamilie und können (im Fall des Cytochroms P450) dem Organismus ermöglichen neue Nahrungsquellen zu erobern oder sich in vormals toxischen Nischen auszubreiten (Gonzalez und Nebert, 1990). *Homo sapiens* haben 75 Cytochrom P450, einschließlich 19 angenommener Pseudogene (Danielson, 2002). Nach internationaler Übereinkunft wurde ein standardisiertes Nomenklatorsystem errichtet, wobei das wichtigste Kriterium für die Zuordnung die Sequenzhomologie der Proteine darstellt (Gonzalez, 1990, Nebert und Gonzalez, 1987). Wenngleich auch zahlreiche Ausnahmen existieren, sind P450-Sequenzen, die mehr als 40 % Aminosäure-Übereinstimmung aufweisen, in der gleichen Familie platziert, die mit einer arabischen Zahl benannt wird. Gleichsam werden Sequenzhomologien, die mehr als 55% betragen, einer Subfamilie zugeordnet, gekennzeichnet mit einem Buchstaben. Die, die 97% identisch sind, repräsentieren die gleichen Allele, es sei denn, es gibt Beweise für das Gegenteil (Nebert und Nelson, 1991; Nelson et al., 1993). Die Benennung als Cytochrom P450 verdankt das Enzym der auffälligen Absorption bei 450 nm (Omura und Sato, 1962; 1964), die aus der trans- Ausrichtung der Zystein- und Kohlenmonoxid-Liganden der Enzym-assoziierten Hämgruppe resultiert.

Die Oxidationsreaktionen werden überwiegend durch Enzyme der Cytochrom P450-Superfamilie katalysiert. Diese werden auch als Monooxygenasen oder mischfunktionelle Oxygenasen bezeichnet. P450 ist das letzte Glied der Elektronentransportkette in Mitochondrien der Nebennierenrinde und der Lebermikrosomen. Ihre Funktion besteht in der Hydroxylierung, nicht in der oxidativen Phosphorylierung. NADPH überträgt sein energiereiches Elektron auf ein Flavoprotein dieser Kette, von dem es zu Adrenodoxin, einem Nicht-Häm-Eisenprotein, gelangt. Adrenodoxin überträgt ein Elektron auf die oxidierte Form des Cytochrom P450. Die reduzierte Form aktiviert dann Sauerstoff.

## Synthese der Moleküle des Lebens

**Abb.4: Cytochrommechanismus**

Diese Enzyme binden  $O_2$  und verwenden ein Sauerstoffatom, um ihre Substrate zu hydroxylieren.

Das Cytochrom P450- System ist bei der Entgiftung fremder Substanzen (xenobiotischer Verbindungen) wichtig. So erhöht zum Beispiel die Hydroxylierung von Phenobarbital, einem Barbiturat, dessen Löslichkeit und erleichtert seine Ausscheidung. Ebenso werden polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe vom P450- System hydroxyliert. Die Einführung von Hydroxylgruppen schafft die Möglichkeit zur Konjugation mit stark polaren Stoffen, was die Löslichkeit des modifizierten aromatischen Moleküls beträchtlich steigert (Stryer, 1994). Steroide und andere lipophile Substanzen (z.B. Eicosanoide, Pharmaka und Xenobiotika) können durch Monooxygenasen hydroxyliert werden. Diese Enzymsysteme sind in der Lage, Sauerstoffmoleküle zu spalten: Ein Sauerstoff-Atom wird auf das Substrat übertragen, während das andere zu Wasser reduziert wird. Viele dieser Monooxygenasen tragen als prosthetische Gruppe ein Häm, das Cytochrom P450 vom Typ b, dessen zentrales Eisen-Atom reversibel oxidiert oder reduziert werden kann (Koolmann, 1994), woraus sich seine Funktion in der oben beschriebenen Elektronentransportkette ergibt.

## 1.6 Cytochrom-P450-2E1

Das CYP2E1 stellt ein wichtiges Schlüsselenzym im oxidativen Stoffwechsel vieler Xenobiotika dar und ist so an der Oxidation der Alkene, der halogenierten Kohlenwasserstoffverbindungen, von Lösemitteln und industriellen Grundchemikalien beteiligt (Thier et al., 1999).

CYP2E1 katalysiert die Umsetzung der Präkanzerogene Benzol, Vinylchlorid, Chloroform und von Nitrosaminen zu sehr aktiven Intermediaten. Wichtige Substrate für P450-2E1 sind neben den Präkanzerogenen auch Arzneistoffe, wie Paracetamol, Chlorzoxazon und einige Inhalationsanästhetika (Lipp und Schuler, 1995).

CYP2E1 ist in der Lage, neben Oxidationsreaktionen auch Reduktionsreaktionen mit einer Vielzahl von Substraten zu katalysieren (Lieber, 1997).

Die aktive Stelle des Enzyms ist so strukturiert, dass sie insbesondere kleine Moleküle aufnehmen kann. Hydrophobe Stoffe mit niedrigem Molekulargewicht sind daher besonders gute Substrate für das Enzym. Einige Stoffe, die von CYP2E1 metabolisiert werden, erfahren durch das Enzym eine Umwandlung zu Kanzerogenen. Das Cytochrom-P-450-2E1 katalysiert also die Aktivierung verschiedener Karzinogene der Umwelt. Dieser Prozeß wird durch eine Alkoholinduktion des Isoenzym verstärkt und spielt so eine wichtige Rolle für die Hepatokarzinogenese (Ladero et al., 1996). Dabei ist allerdings zu beachten, dass im Gegensatz zum chronischen Alkoholabusus eine akut hohe Ethanolaufnahme zu einer Hemmung dieses Isoenzym führt (Lieber, 1986). Das Tuberkulostatikum Isoniazid kann ebenfalls CYP2E1 induzieren (Lipp und Schuler, 1995). Als Inhibitoren sind das Pharmakon Disulfiram und Diethyl-Dithiocarbamate bekannt (Danielson, 2002). Nachgewiesen wurde das Vorkommen des Isoenzym CYP2E1 außer in der Leber auch in vielen anderen Geweben bzw. Organen eingeschlossen die Lunge und das Gehirn (Raunio et al., 1995). In diesem Zusammenhang ist interessant, dass in den Leukozyten von Diabetikern eine erhöhte Expression des P450-2E1-Gens nachgewiesen werden konnte (Gonzalez, 1992). Die Expression des CYP2E1 im Brustgewebe ist nur in wenigen Studien untersucht worden. CYP2E1 mRNA konnte sowohl in Brusttumoren als auch im gesunden Brustgewebe, erhalten von verschiedenen Individuen (Hellmold et al., 1998) und aus zusammengehörenden Proben (Iscan et al., 2001), nachgewiesen werden. In letzterer Studie wurde kein qualitativer Unterschied in der Expression des CYP2E1 auf der mRNA-Ebene zwischen Brusttumoren und



umliegenden tumorfreien, normalem Gewebe gefunden (Iskan et al., 2001). Eine neuere Studie, welche mittels Immunhistologie, die Expression des CYP2E1 in 25 zusammengehörenden Tumor-Kontroll-Proben von Frauen mit infiltrativen duktalem Mammakarzinom, untersucht hat, zeigt ebenfalls eine Expression des CYP2E1 in Brusttumorgewebe und normalem Brustgewebe mit zunehmender Expression im Tumorgewebe (Kapucuoglu et al., 2003). Der mögliche Effekt dieser Erkenntnis auf die Pathogenese des Mammakarzinoms bleibt zu untersuchen.

Das für CYP2E1 kodierende Gen befindet sich auf dem humanen Chromosom 10 (McBride et al., 1987) und enthält neun Exons (Umeno et al., 1988). Es ist bis jetzt eine beträchtliche Anzahl an RFLP bzw. Basensubstitutionen, die zu Polymorphismen führen in dem Gen bekannt. Die am besten untersuchten genetischen Polymorphismen des CYP2E1 sind die PstI- und RsaI-Polymorphismen in der 5'-Region und der DraI-Polymorphismus im Intron 6 des CYP2E1-Gens. Dies sind auch die Polymorphismen mit den stärksten Hinweisen auf eine Veränderung des Stoffwechsels von Kanzerogenen und auf eine Veränderung des Krebsrisikos (Schulz und Hallier, 1999). Für PstI und RsaI ist eine genetische Kopplung obligat, so dass man auch von PstI/RsaI-Polymorphismus spricht. Die DraI-Mutation scheint bei allen Individuen vorzukommen, die auch PstI/RsaI-positiv sind. Das umgekehrte trifft dagegen nicht zu (Hildesheim et al., 1995).

Alle drei Polymorphismen unterliegen einer erheblichen interethnischen Variabilität, insbesondere zu den asiatischen Populationen (Stephens, 1994). Diese interethnischen Differenzen in der Häufigkeit werden in **Tabelle 2** dargestellt. PstI und RsaI kommen häufiger bei Japanern und Chinesen vor als bei Kaukasiern oder Afrikanern (Kato et al., 1992). Der DraI-Polymorphismus tritt häufiger bei Taiwanesen auf als bei Europäern oder Afro-Amerikanern (Stephans et al., 1994). Die Untersuchungen der enzymatischen Aktivität der polymorphen Allele des CYP2E1 sind in *vivo* vor allem durch die Tatsache erschwert, dass diese Polymorphismen insbesondere bei Kaukasiern, bei denen die meisten Studien durchgeführt werden, selten sind.

Für den PstI/RsaI-Polymorphismus wird das Allel des Referenzgenotyps (Wildtyp) mit c1 und das mutierte Allel als c2 bezeichnet. Die Allele treten homozygot (Referenzgenotyp: c1/c1, Mutant: c2/c2) und heterozygot (Mutant: c1/c2) auf. Für das mutierte Allel c2 ist die Transkriptionsaktivität (mRNA-Expression) höher als für den Referenzgenotyp c1 (Ladero et al., 1996).

Der DraI-Polymorphismus lässt eine Unterteilung in den homozygoten Referenzgenotyp (DD) und homozygoten Mutationsgenotypen (CC) sowie den heterozygoten Mutationsgenotypen (CD) zu.

**Tab.2: Häufigkeiten der Genotypen (in %) des PstI/RsaI- und DraI- Polymorphismus des CYP2E1 in unterschiedlichen ethnischen Gruppen modifiziert nach Stephens et al., 1994**

	<b>PstI/RsaI</b>			<b>DraI</b>		
	<b>c1/c1</b>	<b>c1/c2</b>	<b>c2/c2</b>	<b>DD</b>	<b>CD</b>	<b>CC</b>
<b>Afro- Amerikaner</b>	98,0	2,0	0,0	84,0	16,0	1,0
<b>Europa- Amerikaner</b>	92,0	7,0	1,0	80,0	19,0	1,0
<b>Taiwanesen</b>	56,0	32,0	12,0	55,0	43,0	3,0

Vor kurzem wurden neue Polymorphismen des CYP2E1 entdeckt, unter anderem der in dieser Arbeit untersuchte G-71T Polymorphismus in Exon1, welcher in Beziehung mit einer erhöhten Aktivität des CYP2E1 Enzyms in HepG2 Zellen steht (Fairbrother et al., 1998). Der Polymorphismus CYP2E1 G-71T, welcher von Hu et al., 1997 entdeckt wurde beweist in Kombination mit dem von Fairbrother et al., 1998 identifizierten Polymorphismus CYP2E1 - 333T>A eine höhere in vitro Aktivität auf als der Referenzgenotyp (Wildtyp). Unterstützend dazu weist die in vitro Studie von Fairbrother et al., 1998 auf einen Zusammenhang des CYP2E1 G-71T mit erhöhter transkriptioneller Aktivität hin, und Bevölkerungsstudien, bei denen die Frequenz für dieses Allel bei Kaukasiern höher war als anderer früher bekannter CYP2E1 Allelvarianten, welche mit veränderter Aktivität assoziiert waren. Weil diese Studie als einzige den CYP2E1 G-71T Polymorphismus erwähnt, muß seine Bedeutung möglicher metabolischer Konsequenzen noch näher untersucht werden. Die Möglichkeit, dass G-71T für

die Entstehung von einigen Krebsarten und alkoholbedingten Lebererkrankungen relevant ist sollte weiter verfolgt werden, aber die relativ geringe Allelfrequenz und kleinen funktionellen Effekte lassen darauf schließen, dass es unwahrscheinlich ist, ein bedeutender Suszeptibilitätsfaktor zu sein (Fairbrother et al., 1998).

### **1.7 Zielsetzung der Arbeit**

Eine der größten Herausforderungen der heutigen Medizin, insbesondere der Interaktion zwischen Molekulargenetik und Epidemiologie, ist der Kampf gegen Krebs. Besonderes Augenmerk gilt dabei dem Auffinden unbekannter Ursachen und die detaillierte Klärung der Pathomechanismen. Das könnten wichtige Voraussetzungen für die Entwicklung neuer Therapiewege und die Einführung wirksamer präventiver Maßnahmen sein. Gerade die Prävention gewinnt aufgrund der schlechten Prognose vieler Karzinome zunehmend an Relevanz. Das Erarbeiten und Etablieren von einfachen Screening-Methoden zur Identifikation physischer Risikofaktoren, sogenannter Biomarker, würde eine individuelle Einschätzung der Krebsanfälligkeit erlauben und könnte als Grundlage für eine angepasste Risikoaufklärung potentiell gefährdeter Personen in Verbindung mit regelmäßiger prophylaktischer Diagnostik dienen. Wie bei vielen anderen Krankheiten existieren auch bei der Entstehung maligner Entartungen interindividuelle Unterschiede. Dafür scheinen unter anderem Gen-Umwelt-Beziehungen verantwortlich zu sein (Shields et al., 2000). Dabei handelt es sich um Interaktionen zwischen umweltbedingten Noxen und einem Organismus mit definierten genetischen Voraussetzungen.

Polymorphismen fremdstoffmetabolisierender Enzyme können nach einer Exposition gegenüber kanzerogenen Schadstoffen einen Einfluss auf die Genese von Krebserkrankungen haben und somit als Suszeptibilitätsfaktoren im Bezug auf das individuelle Krebsrisiko betrachtet werden.

Noch heute ist die Ätiologie des Brustkrebses nur teilweise bekannt, unidentifizierte Risiken werden vermutet und die Wirkmechanismen vieler bekannter Faktoren sind weiterhin unklar (Kelsey et al., 1988). So bedarf das wahrscheinlich genetisch bedingte Risiko unter Verwandten einer Klärung, denn die familiäre Belastung zählt zu den stärksten Dispositionsfaktoren (Vetter, 2001). Am Beispiel des Mammakarzinoms wird allerdings deutlich, dass die alleinige Betrachtung von äußeren Einflüssen, wie z.B. ionisierender Strahlung (Kelsey et al., 1988;

Seeber et al., 1995; Wolff et al., 1997) oder genetischen Faktoren hoher Penetranz, wie BRCA1/2 (Schmidt-Matthiesen et al., 2000) nur einen Bruchteil der Fälle erklären kann.

Die Untersuchung von Gen-Umwelt-Interaktionen könnte weiteren Aufschluss über die Ursachen des Mammakarzinoms und die interindividuellen Unterschiede in der Anfälligkeit geben. Vor diesem Hintergrund ist das Ziel dieser Fall-Kontroll-Studie, den Nachweis zu erbringen, dass die Polymorphismen CYP2E1 C1053T und CYP2E1 G71T in Verbindung mit den Risikofaktoren Rauchen oder der Einnahme von Hormonersatzpräparaten für den Prozess der Kanzerogenese des Mammakarzinoms von Bedeutung sind. Die katalytischen Eigenschaften der polymorphen Variante unterscheiden sich von denen des Referenzgenotyps, so dass der entsprechende Genotyp im Falle einer Fremdstoffexposition einen Einfluss auf die Art und Menge anfallender genotoxischer Stoffwechselmetaboliten hat. Diese schädigen in Abhängigkeit von Dosis und Zeit zelluläre DNA-Strukturen und verursachen möglicherweise Mutationen in Tumorsuppressorgenen oder Proto-Onkogenen, die für eine fehlerfreie Zellproliferation und -differenzierung verantwortlich sind. Der damit verbundene Verlust ihrer Kontrollfunktionen stellt eine entscheidene Voraussetzung für autonomes Zellwachstum dar.

Der Vergleich zweier Kollektive aus 688 Mammakarzinompatientinnen und 724 Kontrollprobandinnen erlaubte eine detaillierte Auswertung der Mutationsfrequenzen für die beiden in dieser Arbeit zu untersuchenden Polymorphismen des CYP2E1 für eine regional begrenzte deutsche Bevölkerungsgruppe, sowie der individuellen Exposition gegenüber kanzerogenen Fremdstoffen. Tritt nun vermehrt eine Exposition mit einem bestimmten Risikofaktor, wie z.B. das Rauchen zusammen mit einem bestimmten Polymorphismus des CYP2E1 bei Mammakarzinompatientinnen auf, spricht dies bei ihnen aufgrund ihrer individuellen Enzymausstattung für ein Fremdstoff-induziertes Mammakarzinom. Ähnliche protektive Zusammenhänge zwischen Suszeptibilitätsfaktoren und individueller Enzymausstattung des CYP2E1 sollten in der Studie für die Kontrollen aufgezeigt werden. Dann könnte auch die Identifizierung von Individuen möglich sein, die mit einer erhöhten Krebs susceptibilität belastet sind, wenn mit der Hilfe des Real-time-PCR-Verfahrens eine Genotyp-Analyse wichtiger fremdstoffmetabolisierender Enzyme durchgeführt wird.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Studiengruppe

Vom 1. August 2000 bis 31. Oktober 2002 wurde eine Gruppe von Brustkrebspatientinnen sowie eine Kontrollgruppe aus Bonn und den benachbarten Bezirken Euskirchen und dem Rhein-Sieg-Kreis für die GENICA Studie rekrutiert.

Während dieses Zeitraumes meldeten die 14 mithelfenden Krankenhäuser der Studienregion, unter Rücksichtnahme auf die Brustoperation, insgesamt 888 für die Studie in Frage kommender Brustkrebsfälle.

Unabhängig davon wurden weitere Fälle von Patientinnen mit Mammakarzinom von den umliegenden pathologischen Instituten gemeldet, die es erlaubten eine regional vollständige Patientenrekrutierung durchzuführen.

Die für die Studie relevanten Patientinnen mußten folgende Voraussetzungen erfüllen:

1. Sie mussten zum gegenwärtigen Zeitpunkt in der Studienregion wohnen.
2. Sie durften nicht älter als 80 Jahre alt sein.
3. Sie mussten die deutsche Staatsangehörigkeit besitzen und der ethnischen Gruppe der Kaukasier angehören.
4. Die Diagnose des erstmals aufgetretenen, primären Mammakarzinoms musste innerhalb von 6 Monaten vor der Teilnahme histopathologisch bestätigt werden.

Von den 888 Fällen konnten 102 Frauen nicht zur gegebenen Zeit in den Krankenhäusern erreicht werden und 98 Frauen lehnten die Teilnahme ab. Insgesamt konnten 688 Brustkrebsfälle in der Studie verwertet werden.

Die Kontrollgruppe wurde durch eine zufällige Adressenauswahl aus dem Einwohnermelde-register von 31 Gemeinden ermittelt und der Häufigkeit der Fälle entsprechend von dem Geburtsjahr an in 5-Jahres Abschnitte unterteilt.

Die Kontrollen kamen in Frage, wenn sie zum gegenwärtigen Zeitpunkt der Teilnahme in der Studienregion resident und Kaukasier mit deutscher Nationalität waren.

Von 1.306 Frauen, die über einen Brief kontaktiert wurden, entsprachen 152 Frauen nicht den vorgegebenen Kriterien und 355 Frauen lehnten eine Teilnahme ab. Gefolgt von 3 weiteren Versuchen per Post, einem Minimum von 20 Versuchen per Telefon und einem persönlichen Besuch, konnten 75 Frauen nicht erreicht werden. Insgesamt nahmen 724 geeignete Kontrollen an der Studie teil.

## **2.2. Interviewdesign**

Im Rahmen des Interviews der *Interdisciplinary Study Group on Gene-Environment Interaction and Breastcancer in Germany* (GENICA) wurden der Teilnehmerin durchschnittlich 200 Fragen zu bekannten und vermutlichen Brustkrebsrisikofaktoren wie Lebensstil, Beruf, Umweltbelastung, Familie, Ernährung, sportlicher Betätigung, Hormoneinnahme, Stillzeiten, Schwangerschaften, Rauchen u.a. gestellt.

Zusätzlich zu diesen Angaben wurden bei den Brustkrebspatientinnen Daten aus der Krankenakte erhoben, um den Gesamtdatensatz zu vervollständigen. Die Computer gesteuerten Interviews wurden von geschulten Mitarbeitern durchgeführt. Von allen Teilnehmerinnen wurde eine schriftliche Einwilligung abgegeben. Die Studie wurde von der Ethik-Kommission der Universität Bonn genehmigt.

Für diese Arbeit sind insbesondere die Fragen zum Zigarettenkonsum und zur Einnahme von Hormonersatzpräparaten als mögliche Suszeptibilitätsfaktoren für Brustkrebs von Bedeutung.

Im Rahmen der Raucheranamnese wurde sowohl der aktuelle als auch der ehemalige Raucherstatus erfasst.

Rauchfreie Intervalle, Alter des Rauchbeginns, durchschnittlicher Konsum pro Tag im gesamten Leben und zuletzt, sowie die größte Anzahl Zigaretten pro Tag über ein Jahr wurden innerhalb des Interviews erfasst.

In der statistischen Auswertung wurde jedoch nur der Raucher- und Nichtraucherstatus erfasst. Als Raucherinnen galten diejenigen Frauen die mindestens 5 Zigaretten oder mehr pro Tag zur Zeit des Interviews oder in früherer Zeit konsumierten.

Bezüglich der Fragen zur Hormonersatztherapie wurde die Gesamtdauer der Einnahme erfasst und innerhalb der Statistik in 3 Kategorien unterteilt:

- a) keine HRT- Einnahme
- b) HRT-Einnahme bis zu 10 Jahren
- c) HRT-Einnahme 10 Jahre und länger.

### 2.3 Probenmaterial

Zusätzlich zu dem Interview wurde sowohl den Patientinnen als auch den Kontrollpersonen mit deren Einverständnis eine Blutprobe entnommen. Für die DNA-Extraktion standen uns von jedem Probanden davon 3 Heparinröhrchen mit 7 ml antikoaguliertem Blut zur Verfügung. Diese wurden zusammen mit den Röhrchen für die Serum- bzw. die Plasma-Isolierung vom Interviewer in den Kühlschrank des DNA-Labors der Poliklinik der Universität Bonn gelegt und spätestens am nächsten Tag aufgearbeitet.

### 2.4 DNA-Extraktion

Die Isolierung der DNA erfolgte aus den Leukozyten mit dem *Genomic DNA Purification Kit* der Firma *Puregene*. Zur Zell-Lyse wurden in zwei 50 ml-Zentrifugenröhrchen jeweils 30 ml *RBC Lysis Solution* vorgelegt. Dann wurde das Blut auf beide Röhrchen gleichmäßig verteilt hinzugefügt. Um nicht wertvolles biologisches Material zu verschwenden, wurden Blutreste, welche in den Heparinröhrchen verblieben sind, mit 5 ml *RBC Lysis Solution* nachgespült und mit einer Plastikpipette überführt. Zum Mischen wurden die Röhren mindestens einmal über Kopf gedreht, 10 Minuten bei RT inkubiert und währenddessen 3 bis 5 Mal invertiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation für 10 min mit 2000 g. Der Überstand wurde vorsichtig in einer Bewegung abgegossen. Noch rotgebliebener Zellniederschlag wurde in 10-15 ml *RBC Lysis Solution* resuspendiert und der Vorgang solange wiederholt bis der Zellniederschlag weiß war. Der weiße Zellniederschlag wurde durch intensives vortexen in 200-400 µl Restvolumen resuspendiert. Nun wurde in jedes Röhrchen 10 ml *Cell Lysis Solution* gegeben und mit einer

Plastikpipette durch auf- und abpipettieren gemischt. Damit sich noch vorhandene Zellklumpen lösen konnten, wurde die Lösung über Nacht bei RT inkubiert.

Zur Durchführung der Proteinfällung und DNA-Isolierung wurden zu jedem Ansatz 3,33 ml *Protein Precipitation Solution* gegeben. Diese wurden 10 Minuten mit 2000 g bei RT zentrifugiert. Die gefällten Proteine sollten einen festen Niederschlag bilden. War dies nicht der Fall, musste erneut gevortext, 10 min auf Eis inkubiert und schließlich zentrifugiert werden. Der Überstand wurde in ein neues 50 ml-Zentrifugenröhrchen, in welches 10 ml 100 % Isopropanol vorgelegt wurde, überführt. Nach ca. 50 maligen Drehen des Röhrchens bildete die ausgefallene DNA einen deutlich sichtbaren weißen Faden. Die DNA erzeugte durch dreiminütige Zentrifugation mit 2.000 g bei RT einen kleinen weißen Niederschlag. Der Überstand wurde abgegossen. Um die verbleibende DNA zu waschen, wurden 10 ml 70 % Ethanol hinzugefügt, das Röhrchen mehrmals gedreht, wie zuvor zentrifugiert und ohne Ablösen des Niederschlags der Überstand abgegossen. Als letzten Schritt der DNA-Isolierung wurde das Röhrchen zum Trocknen für 10 bis maximal 15 Minuten kopfüber auf ein sauberes, saugstarkes Papier gestellt. Zum Lösen der DNA wurde 1 ml *DNA Hydration Solution* beigefügt und mit einer Pipette in 1,5 ml Röhrchen überführt. Die Inkubation erfolgte 1 Stunde bei 65 ° C und anschließend über Nacht bei RT. Das Röhrchen wurde kurz abzentrifugiert, die Lösung in ein mit der Probennummer versehenes 1,8 ml Nunc-Röhrchen überführt und bei 4 ° C im Kühlschrank gelagert.

## **2.5 Quantifizierung und Verdünnung**

Die Quantifizierung und Qualitätskontrolle erfolgte mit dem *Gene Quant II* der Firma *Pharmacia*, Deutschland. Der *Gene Quant II* ist ein Spektralphotometer, das speziell zum Gebrauch in der Molekularbiologie entwickelt wurde. Das Instrument bietet erweiterte Funktionen, die die schnelle Berechnung verschiedener Parameter auf der Grundlage von Oligonukleotidsequenzen erlauben. Es misst die optische Dichte von RNA- und DNA-Proben in UV-Zellen gleichzeitig bei Wellenlängen von 230 nm, 260 nm, 280 nm und 320 nm. Dabei dienen 260 nm und 280 nm zur Quantifizierung und Berechnung zur Reinheitsüberprüfung, während 320 nm zur Hintergrundkompensierung gebraucht werden. 230 nm kann als Hilfe zur Proteinbestimmung anhand der Peptidbindungsabsorption verwendet werden. Die Werte der



einzelnen werden gespeichert und zur Berechnung benutzt, bis die nächste Rechnung durchgeführt wird. Das Instrument misst die tatsächliche Nukleotidmenge in der Probe.

Damit erhielt man die Konzentration der jeweiligen DNA-Probe, die als *Stock-Solution* gelagert wurde, aus der dementsprechend die Verdünnungen berechnet werden konnten. Zunächst wurde mit DNA- Hydrationslösung 500 µl auf eine Konzentration von 100 ng/ml verdünnt. Die zweite Verdünnung auf 25 ng/µl in 100 µl *Eppendorf-Caps* erfolgte mit destilliertem Wasser und wurde zur Genotypisierung verwendet.

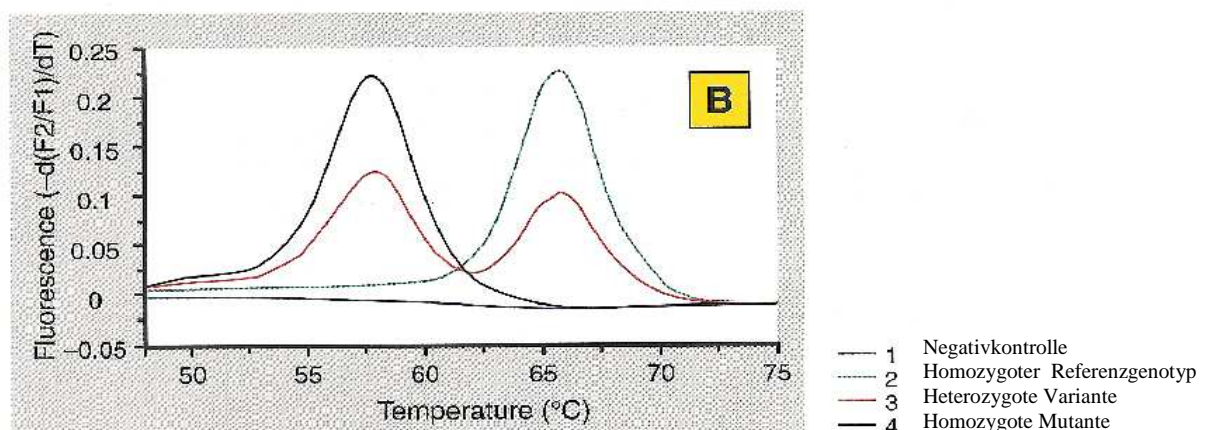
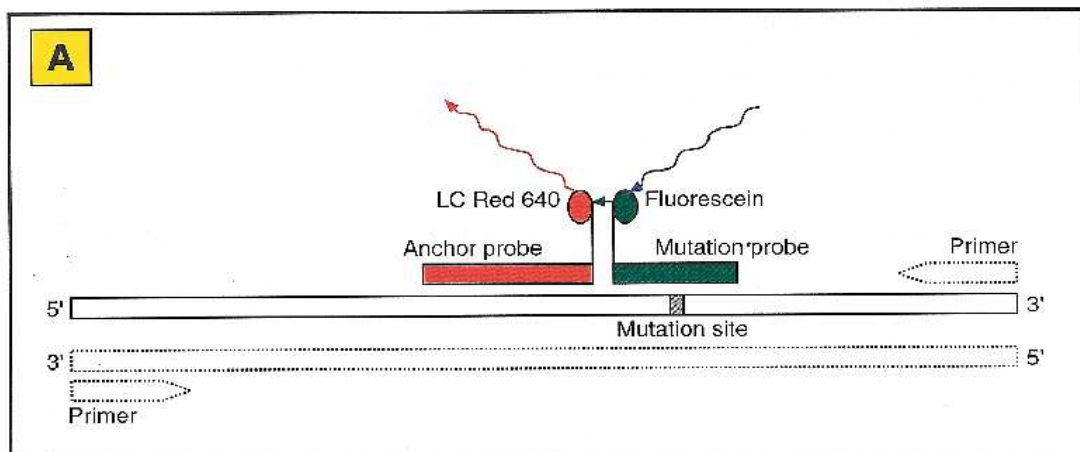
## 2.6 PCR

Das Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde 1983 von Kary Mullis entwickelt, der 1993 für die von ihm beschriebene Technik mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurde. Die PCR wird seit Mitte der 80er Jahre benutzt, um selektiv und gezielt DNA-Abschnitte zu amplifizieren (Mullis et al., 1996). Es handelt sich hierbei um zyklische, temperaturabhängige Reaktionen, welche die komplementäre Vervielfältigung selbst geringer Mengen von DNA erlaubt. Sie ermöglicht die selektive in vitro Amplifikation (Vermehrung) einer spezifischen DNA-Region, indem die Abläufe der zellulären in vivo DNA-Replikation nachgeahmt werden. Jede DNA-Sequenz kann innerhalb weniger Stunden spezifisch, auch aus hoch komplexen Genomen heraus, amplifiziert werden, ohne zeitaufwendige Klonierung und Identifizierung der zu untersuchenden DNA-Sequenzen. Das Prinzip der PCR basiert auf der Denaturierung, durch Erhitzen eines doppelsträngigen DNA-Templates, an dessen 5'- und 3'-Ende sich in einem zu amplifizierenden Bereich spezifische, maschinell synthetisierte Oligonukleotide, die als Primer bezeichnet werden, anlagern. Dieses Anlagern heißt *Annealing*; die optimale Annealing-Temperatur der Primer ist abhängig von ihrem mittleren Schmelzwert ( $T_m$ ). Das freie 3'-OH Ende der Primer dient einer DNA-abhängigen Polymerase als Ansatzpunkt zur DNA-Synthese. Diese Primer sind etwa 20 bp lang und dienen einer DNA-Polymerase als Startpunkt. Sie flankieren die DNA-Region, die amplifiziert werden soll und sind jeweils komplementär zu den beiden Target-DNA-Strängen, d.h. es müssen zur Synthese der Primer Sequenzinformationen über die Target-DNA vorliegen (Schreinert, 1997). Das Substrat der DNA-Synthese sind freie Desoxynukleosid-Triphosphate (dNTPs). Bei der Taq-Polymerase handelt sich um ein thermostabiles Enzym, welches die hohen Temperaturen, die zur Auftrennung des DNA-

Doppelstranges notwendig sind, übersteht, ohne zu denaturieren. Die Taq-Polymerase besitzt keine 5'-3'- Exonukleaseaktivität. Dies soll verhindern, dass neusynthetisierte Stränge von den Polymerasen partiell wieder abgebaut werden. Die Anreicherung der Ausgangs-DNA geschieht durch die zyklische Abfolge von Denaturierung, Annealing der Primer und DNA-Amplifikation durch die Taq-Polymerase. Die eigentliche PCR besteht typischerweise aus 30-45 sich wiederholenden Zyklen mit den zuvor beschriebenen Reaktionsschritten.

## 2.7 Real-time PCR

Durchgeführt wurde die Polymerase-Kettenreaktion mit dem Light-Cycler der Firma Roche, Mannheim, Deutschland unter der Benutzung von Hybridisierungs sonden in Kombination mit dem Light-Cycler DNA Master Hybridisation Probes Kit (Roche). Generell werden zusätzlich zu den Genfragment-spezifischen Primern zwei Sequenz-spezifische Hybridisierungssonden verwendet, von denen die erste von ihrem 3'-Ende mit Fluorescein (Detektionssonde) und die zweite (Ankersonde) an ihrem 5'-Ende mit einem anderen fluoreszierenden Farbstoff, Light-Cycler- Red 640 (LC-640) oder 705 (LC-705), markiert sind.



**Abb. 5: A:** Schematische Darstellung eines Faktor V PCR-Fragmentes

**B:** Schmelzkurvenanalyse von verschiedenen Genotypen der analysierten Sequenz

Diese beiden Sonden werden so ausgewählt, dass sie innerhalb des amplifizierten Genfragments maximal 1-5 Basenpaare von einander entfernt hybridisieren. Die Emissionsdiode des Light.Cyclers (470 nm) regt das Fluorescein in der Dektionssonde zur Fluoreszenz an. Das dadurch emittierte grüne Licht regt die Fluorophore LC-640 bzw. LC-705 in der Ankersonde zur Emission von rotem Licht (640 bzw. 705 nm) an. Dieser Vorgang wird als Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) bezeichnet. FRET kann nur stattfinden, wenn sich die beiden Sonden in unmittelbarer Nähe zueinander befinden. Daher wird die Messung am Ende der Annealing-Phase eines jeden PCR-Zyklus durchgeführt. Die Emission roten Lichtes ist proportional zur Menge des amplifizierten DNA-Fragmentes und wird jeweils in dem entsprechenden Kanal des Light-Cyclers gemessen. Im Anschluß an den Messvorgang werden die beiden Hybridisierungssonden von der Taq-Polymerase verdrängt (Extensionsphase des PCR-Zyklus).

Die Sequenzen der PCR-Primer und der Hybridisierungssonden sind in **Tabelle 3** aufgeführt.

**Tab.3 a) und b): PCR-Primer und Hybridisierungsproben für CYP2E1-Polymorphismen**

**a) G-71T:**

PCR-Primer	Hybridisierungssonden
-71 for 5'-TTGTCTAACCAGTGCCAAAG-3'	-71 sensor 5'-LCR- CTCCTTCTCAGAACACATTATAAAAA-3'
-71 rev 5'-GGAGGACAATCCTGTGGAAA-3'	-71 anchor 5'- GCAAGAGGGCATTGGTTGGTGGGTCA- FI-3'

**b) C-1053T:**

PCR-Primer	Hybridisierungssonden
C-1053T se 5'-AGAATGGCATAACTCAAAATCC-3'	C-1053T sensor 5'- TTCATTGTTAATATAAAAAGTACAAAATT- FL-3'
C-1053 as 5'-CAGACCCTCTTCCACCTTCTAT-3'	C-1053T anchor 5'-LCR CAACCTATGAATTAAGAACTTCTATATA TTGCCAG-3'

Die Fluorescein-markierte Sonde für CYP2E1 G-71T (5' - GCAAGAGGGCATTGGTTGGTGGGTCA-FL-3') hybridisiert innerhalb des PCR-Fragmentes an der Position des CYP2E1 G-71T Polymorphismus und die korrespondierende Sonde für CYP2E1 C-1053T (5'-TTCATTGTTAATATAAAAAGTACAAAATT-FL-3') an der Position des CYP2E1 C-1053T Polymorphismus.

Daher wird im Falle eines Referenzgenotyp-Allels (=Wildtyp-Allels) die erwartete Schmelztemperatur höher sein als diejenige für die Mutante, die ein ausgetauschtes Basenpaar beinhaltet. Sowohl die Primer als auch die Sonden sind von der Firma *TIB MOLBIOL (Berlin, Deutschland)* synthetisiert worden.

Der Reaktionsansatz enthielt pro Kapillare 2µl verdünnte DNA (25ng/µl) und 18µl Mastermix, der sich wie folgt zusammen setzt:

- 2,4 µl MgCl<sub>2</sub> (4 mM)
- 1,0 µl 3'Primer (20pmol)
- 1,0 µl 5'Primer (20pmol)
- 1,0 µl FL-Sonde (1pmol)
- 1,0 µl LC-Sonde (1pmol)
- 2,0 µl Puffer ( *DNA Master Hybridisation Mix von Roche, Mannheim, Deutschland*)
- 9,6 µl H<sub>2</sub>O

Jeder PCR wurde als Negativkontrolle ein Ansatz ohne DNA hinzugefügt.  
Das durchschnittliche PCR-Temperaturprofil wird in **Tabelle 4** dargestellt.

**Tab.4: PCR-Temperaturprofil**

	<b>1. Denaturierung</b>	<b>2. Zyklus- denaturierung</b>	<b>3. Annealing</b>	<b>4. Extension</b>
Zieltemperatur (°C)	95°C	95°C	55°C	75°C
Zeit (sec)	120 sec	5 sec	20 sec	25 sec

Es wurden pro Durchlauf 45 PCR-Zyklen (Phase 2-4) durchgeführt.

Die Differenzierung der Allele erfolgte durch die Bestimmung der Schmelztemperaturkurvenkurven nach der PCR.

Diese erhielt man nach einer Denaturierungsphase für 5 sec bei 95°C bei einer Starttemperatur von 45°C und einer Endtemperatur von 80°C mit einem Temperaturanstieg von 0,4°C/sec. Die Schmelztemperaturkurven wurden mit dem Light-Cycler-System (*Roche, Mannheim, Deutschland*) durchgeführt und ermittelt.

## 2.8 Mutationsanalyse und Sondenspezifität

Nach Abschluß der PCR wird eine Schmelztemperaturkurve der Amplifikate erstellt. Die Schmelztemperatur ist die Temperatur bei der sich die Hybridisierung zwischen den Sonden und dem Amplifikat auflöst und von der Länge und Sequenz der Sonden sowie der Homologie zum Amplifikat bestimmt. Dazu wird die Temperatur der Probengefäße von einem geringen Ausgangswert aus in kleinen Schritten erhöht und in Abhängigkeit zur gemessenen Fluoreszenz dargestellt. Da der FRET nicht erfolgen kann, wenn die Sonden in freier Form vorliegen, kommt es zu einem sprunghaften Abfall der Fluoreszenz, wenn die Temperatur erreicht ist, bei der es zur Ablösung der Sonden vom DNA-Strang kommt. Die Abschmelzungstemperatur ist niedriger,

wenn eine Punktmutation zur einer Basenfehlpaarung zwischen der Hybridisierungssonde und dem ansonsten komplementären DNA-Strang geführt hat. Wird die Schmelzkurve graphisch nach ihrer Differenzierung dargestellt ( $-dF/dT$ ), so befindet sich am Temperaturpunkt der Sondenablösung ein Peak. Handelt es sich beim Genotyp der betrachteten Probe um die homozygot mutierte Variante, so ist der Peak aufgrund der Punktmutation bei einer etwas niedrigeren Temperatur als beim Referenzgenotyp lokalisiert. Im Fall von Heterozygotie sind zwei Peaks vorhanden.

Der mittlere Schmelzwert liegt ( $T_m$ ) für die referenzgenotypspezifische Sonde des Polymorphismus CYP2E1 G-71T liegt bei ca.  $65^{\circ}\text{C}$  und für die referenzgenotypspezifische Sonde des Polymorphismus CYP2E1 C 1772T bei ca.  $59,5^{\circ}\text{C}$ .

## 2.9 Statistische Methoden

Alle Rechnungen zur Risikoschätzung für die Entwicklung eines Mammakarzinoms wurden unter Verwendung der SAS/STAT Software, Version 8.02. durchgeführt. Die Risikoschätzungen für die Entwicklung eines Mammakarzinoms wurden als Odds Ratios (OR) und 95 % Konfidenzintervalle (CI) mittels bedingter logistischer Regression, abhängig vom Alter (<45 Jahre, 45-<50 Jahre, 50-<55 Jahre, 55-<60 Jahre, 60-<65 Jahre, 65-<70 Jahre,  $\geq 70$  Jahre) berechnet, die als Crude Odds Ratios (COR) herangezogen werden. Zusätzlich wurde eine Adjustierung der Risikofaktoren HRT und Rauchen durchgeführt, bei der in diesem Modell folgende Confounder einbezogen wurden: Menopausentyp (prämenopausal, natürliche Menopause, operativ bedingte), Menopausenalter (prämenopausal, <45 Jahre, 45-<50 Jahre, 50-<55 Jahre,  $\geq 55$  Jahre), Alter bei der ersten Geburt (kinderlos, <25 Jahre, 25-<30 Jahre,  $\geq 30$  Jahre), Anzahl der Geburten (keine Kinder, 1-2 Kinder,  $\geq 3$  Kinder), BMI (<22,5, 22,5-<25, 25-<30,  $\geq 30$ ), Alter der ersten Regelblutung, Anzahl der Mammographien bis zwei Jahre vor dem Interview, Lebensstilzeit, familiärer Brustkrebs (Mutter und Schwester) und Anzahl der Jahre der Einnahme oraler Kontrazeptiva. Für den Risikofaktor HRT wurde als zusätzlicher Confounder der Raucherstatus (Raucher, Nichtraucher), für den Risikofaktor Rauchen die Dauer der HRT-Einnahme (nie, <10 Jahre,  $\geq 10$  Jahre). Die Stratifizierung erfolgte nach den Subgruppen der Genotypen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Genotypverteilung und Brustkrebsrisiko der CYP2E1 Polymorphismen C-1053T und G-71T

Zuerst wurde die Genotyp-Verteilung der CYP2E1 Polymorphismen C- 1053T und G-71T in der Gruppe der Mammakarzinompatientinnen und bei den Kontrollindividuen analysiert. Von den 688 rekrutierten Fällen konnten insgesamt 663 (96,37%) und von den 724 Kontrollen 678 (93,65%) genotypisiert werden. Die Abweichung von der Gesamtzahl der rekrutierten Personen ergibt sich entweder aus der Verweigerung der Blutabnahme der Probandin oder diese konnte aus medizinischer Sicht nicht durchgeführt werden.

Die Anzahl der fehlgeschlagenen Genotypisierungen liegt für den Polymorphismus C-1053T unter den Fällen bei 45 (6,79%) und unter den Kontrollen bei 22 (3,24%). Bei der Genotypisierung des Polymorphismus G-71T sind unter den Fällen 50 (7,54%) und unter den Kontrollen 23 (3,39%) fehlgeschlagen. Gründe für diese Missings sind unter anderem , dass das Blut nicht erfolgreich zu DNA verarbeitet werden konnte bzw. die Menge der extrahierten DNA zu gering war oder die Probe mit der Methode der Real-time PCR auch bei mehrmaliger Wiederholung des Reaktionsansatzes kein auswertbares Ergebnis lieferte.

Das heißt, dass letztendlich für den Polymorphismus G-71T die extrahierte DNA von 613 (92,46%) Brustkrebspatientinnen und von 655 (96,61%) Kontrollpobandinnen erfolgreich genotypisiert und für die nachfolgenden Ergebnisse ausgewertet werden konnten. Für den Polymorphismus C-1053T wurden 618 (93,21%) Fälle und 656 (96,76%) Kontrollen erfolgreich genotypisiert.

Der Referenzgenotyp (Wildtyp) CC des CYP2E1 C-1053T Polymorphismus wurde sowohl in der Patientengruppe zu 94.17% als auch im Kontrollkollektiv zu 94.97% nahezu zu gleichen Anteilen gefunden. Auch der heterozygote Genotyp CT wies mit 5.50% in der Patientinnengruppe und 4.57% im Kontrollkollektiv keine schwerpunktmäßige Verteilung auf. Der Anteil des Genotyps mit homozygot mutierten Allel TT kam sowohl in der Patientengruppe mit 0.32% und im Kontrollkollektiv mit 0.46% sehr selten vor. Nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz, welches als Qualitätsmerkmal für das Auftreten von wahrscheinlichen Genhäufigkeiten bei statistischen Auswertungen herangezogen wird, hält diese Häufigkeitsverteilung nicht stand. So das von

Fehlern bei der Genotypisierung ausgegangen werden muss. Die Daten des Polymorphismus CYP2E1 C-1053T wurden deshalb in dieser Arbeit nicht weiter verwertet.

Der Polymorphismus CYP2E1 G-71T wurde als Referenzgenotyp GG zu 90.54% in der Patientengruppe und zu 90.84% im Kontrollkollektiv gefunden. Der heterozygote Genotyp GT fand sich in der Patientengruppe zu 8.95% und in der Kontrollgruppe zu 8.85%. Der homozygot variante Genotyp TT war in der Patientengruppe in 0.49% der Fälle etwas häufiger vertreten als im Kontrollkollektiv mit 0.31%. Das aus dieser Population errechnete Verteilungsmuster der unterschiedlichen Genotypen entspricht für diesen Polymorphismus den genetischen Regeln des Hardy-Weinberg-Gesetzes und spiegelt im Falle der Kontrollprobandinnen die Genotypenhäufigkeitsverteilung wieder die für gesunde Kaukasier beschrieben ist. Nach der *Cancer Genome Anatomy Project SNP 500 Cancer Database des National Cancer Institute* kommt der Referenzgenotyp GG bei gesunden Kaukasier in 83,3% der Fälle, der heterozygote Genotyp GT in 13,3% der Fälle und der homozygot mutierte Genotyp TT in 3,3% der Fälle vor (<http://snp500cancer.nci.nih.gov/snplist.cfm>).

Der Anteil der homozygot mutierten Genotypen TT war bei den Mammakarzinompatientinnen häufiger vertreten als bei den Kontrollen, woraus sich bei einer OR von 1.61 (95%CI: 0.27-9.66) für diese Allelpaarträgerinnen ein erhöhtes Risiko für Brustkrebs ergibt, jedoch nicht in statistisch signifikantem Ausmaß.

Die Ergebnisse der Genotypverteilung und des Brustkrebsrisikos werden in **Tabelle 5** dargestellt. Die Konfidenzintervalle (CI) werden zum 95%-Niveau angegeben.



**Tab.5: Genotypverteilung und Brustkrebsrisiko der CYP2E1 Polymorphismen C-1053T und G-71T**

	Fälle		Kontrollen		OR <sub>crude</sub> *
	N*	%	N*	%	
CYP2E1_1053_C>T					
CC	582	94.17	623	94.97	1
CT	34	5.50	30	4.57	1.21 (0.73-2.00)
TT	2	0.32	3	0.46	0.71 (0.12-4.29)
p -Wert HWE					
Chi <sup>2</sup>	0.05		0.0003		
LR	0.12		0.01		
CYP2E1_71_G>T					
GG	555	90.54	595	90.84	1
GT	55	8.95	58	8.85	1.02 (0.69-1.50)
TT	3	0.49	2	0.31	1.61 (0.27-9.66)
p -Wert HWE					
Chi <sup>2</sup>	0.20		0.64		

\*) Anzahl und Häufigkeiten ohne Berücksichtigung fehlender Werte der Confounder (roh)

Die rohe Odds Ratio Schätzung für das heterozygote Allelpaar des CYP2E1 G-71T beträgt 1.02 (95%CI: 0.69-1.50) und für den homozygot varianten Genotyp 1.61 (95%CI: 0.27-9.66). Das heißt, daß sich ein geringer Trend hin zu einem erhöhten Brustkrebsrisiko für homozygot variante Allelpaarträgerinnen abzeichnet, der statistisch jedoch nicht signifikant ist. Die Art des Genotyps allein erhöht demnach nicht das Risiko an Brustkrebs zu erkranken.

Der Referenzgenotyp ist sowohl in der Patientinnenpopulation als auch in der Kontrollgruppe der am stärksten vertretene.

### 3.2 Genotypverteilung und Brustkrebsrisiko des CYP2E1 G-71T in Abhängigkeit vom Raucherstatus

289 Patientinnen aus der Mammakarzinomgruppe und 314 gesunde Frauen aus der Kontrollgruppe wurden als Raucherinnen bzw. Ex-Raucherinnen identifiziert (siehe **Tabelle 6**). Davon konnten insgesamt 251 Raucherinnen, die an einem Mammakarzinom erkrankt waren und 289 Kontrollen genotypisiert werden. Die Abweichung ergibt sich aufgrund oben dargestellter Schwierigkeiten der Blutabnahme, DNA-Extraktion und Genotypisierung.

**Tab.6: Brustkrebsrisiko in Abhängigkeit vom Raucherstatus**

Raucherstatus	Fälle		Kontrollen		OR <sub>adj</sub> <sup>1)</sup>
	N*	%	N*	%	
Nichtraucherinnen	398	57.93	410	56.63	1
Raucherinnen	289	42.07	314	43.37	0.91 (0.72-1.15)

\*) Anzahl und Häufigkeiten ohne Berücksichtigung fehlender Werte der Confounder (roh)

1) adjustiert nach Menopausentyp, Alter bei Menopause, Alter der ersten Geburt, Anzahl der Geburten, BMI, Alter bei Menarche, Anzahl der Mammographien, Dauer des Stillens, familiärer Brustkrebs (Mutter und Schwester), Jahre der Einnahme oraler Kontrazeptiva

Aus der **Tabelle 6** ergibt sich unabhängig von der Art des Genotyps bei einem adjustierten Odds Ratio Schätzer von 0.91 und einem 95%CI zwischen 0.72-1.15 kein erhöhtes Risiko für Raucherinnen an einem Mammakarzinom zu erkranken. Der scheinbar protektive Faktor ist statistisch nicht signifikant. Ein Brustkrebsrisiko an sich in Abhängigkeit vom Raucherstatus wird demnach nicht bestätigt.

Der Einfluss des Raucherstatus im Zusammenhang mit der Genotypverteilung unter den Fällen und Kontrollen auf das Brustkrebsrisiko wird in **Tabelle 7** dargestellt.

**Tab.7: Genotypverteilung in Abhängigkeit vom Raucherstatus**

CYP2E1 G-71T	GG			GT			TT		
	Anzahl * Fälle N* (%)	Kontr. N* (%)	OR <sub>adj</sub> <sup>1)</sup> (CI)	Fälle N* (%)	Kontr. N* (%)	OR <sub>adj</sub> <sup>1)</sup> (CI)	Fälle N* (%)	Kontr. N* (%)	OR <sub>adj</sub> <sup>1)</sup> (CI)
Nicht- raucher- innen	327 59.03	328 55.13		31 56.36	36 62.07		3 100.00	2 100.00	
Raucher- innen	227 40.97	267 44.87	0.78 (0.60- 1.01)	24 43.64	22 37.93	4.02 (1.01- 16.02)	0 0.00	0 0.00	

\*) Anzahl und Häufigkeiten ohne Berücksichtigung fehlender Werte der Confounder (roh)

1) adjustiert nach Menopausentyp, Alter bei Menopause, Alter der ersten Geburt, Anzahl der Geburten, BMI, Alter bei Menarche, Anzahl der Mammographien, Dauer des Stillens, familiärer Brustkrebs (Mutter und Schwester), Jahre der Einnahme oraler Kontrazeptiva

40.97% der rauchenden Mammakarzinom-Patientinnen hatten den Referenzgenotyp GG, 43,64% hatten den heterozygoten Genotyp GT und 0% wiesen den homozygot mutierten Genotyp TT auf. Der Anteil des homozygot mutierten Genotyps in der Kontrollgruppe liegt ebenfalls bei 0%, der heterozygote bei 37.93% und der Referenzgenotyp bei 44.87%.

Vergleicht man die Daten der Patientenfälle und Kontrollen in Bezug zu den drei möglichen Genotypen mit dem Raucherstatus, fällt auf, dass der adjustierte Odds Ratio Schätzer für das heterozygote Allelpaar GT signifikant erhöht ist (OR: 4.02, 95%CI: 1.01-16.02). Das Risiko an einem Mammakarzinom zu erkranken ist somit für Frauen mit dem heterozygoten Genotyp GT und positiver Raucheranamnese signifikant erhöht.

Im Gegensatz dazu zeigt der adjustierte Odds Ratio für den Referenzgenotyp GG einen leichten Trend das Risiko als Raucherin an Brustkrebs zu erkranken, jedoch nicht signifikant, zu schmälern (OR: 0.78, 95%CI: 0.60-1.01). Ein Odds Ratio für den homozygot varianten Genotyp

TT konnte aufgrund des Nichtvorkommens dieses Allelpaars unter den für diese Studie rekrutierten Raucherinnen nicht berechnet werden.

### 3.3 Genotypverteilung und Brustkrebsrisiko des CYP2E1 G-71T Polymorphismus in Abhängigkeit vom HRT-Gebrauch

In **Tabelle 8** ist der HRT-Status der Brustkrebspatientinnen und der Kontrollprobandinnen zur Zeit des Interviews dargestellt. Die Dauer der Einnahme wurde in drei Kategorien eingeteilt: keine Verwendung von HRT, Einnahme bis 10 Jahre, sowie kumulativ 10 Jahre und länger.

**Tab.8: Brustkrebsrisiko in Abhängigkeit vom HRT-Gebrauch**

HRT-Einnahme	Fälle		Kontrollen		OR <sub>adj</sub> <sup>1)</sup>
	N*	%	N*	%	
keine	339	49.93	379	52.71	1
>0; <10 Jahre	166	24.45	200	27.82	0.93 (0.69-1.25)
10+ Jahre	174	25.63	140	19.47	1.41 (1.01-1.96)

\*) Anzahl und Häufigkeiten ohne Berücksichtigung fehlender Werte der Confounder (roh)

1) adjustiert nach Menopausentyp, Alter bei Menopause, Alter der ersten Geburt, Anzahl der Geburten, BMI, Alter bei Menarche, Anzahl der Mammographien, Dauer des Stillens, familiärer Brustkrebs (Mutter und Schwester), Jahre der Einnahme oraler Kontrazeptiva

49.93% der Patientinnen und 52.71% der Kontrollprobandinnen haben niemals Hormonersatzpräparate eingenommen. Bis zu einer Dauer von 10 Jahren haben unter den Brustkrebspatientinnen 24.45% und unter den Kontrollen 27.82% solche Präparate eingenommen. Die Odds Ratio Schätzung für diese Kategorie liegt bei 0.93 (95%CI: 0.69-1.25). Es zeigt sich folglich unabhängig vom Genotyp ein leicht protektiver Einfluss auf die Entwicklung eines Mammakarzinoms bei einer HRT-Einnahme bis zu 10 Jahren, der jedoch statistisch nicht signifikant ist. In der dritten Kategorie fallen die Patientinnen mit einem höheren Anteil von 25.63% gegenüber den Kontrollindividuen mit 19.47% auf. Die Odds Ratio Schätzung

bei HRT-Einnahme von kumulativ 10 Jahren und länger ist unabhängig vom Genotyp signifikant erhöht (OR. 1.41, CI: 1.01-1.96). Daraus lässt sich folgern, dass im Gegensatz zu einem Gebrauch von HRT-Präparaten unter 10 Jahren, das Risiko für Brustkrebs bei einer HRT-Einnahme von 10 Jahren, unabhängig von der Art des Genotyps signifikant erhöht ist. Die Genotypverteilung in Bezug auf die HRT-Einnahme ist in **Tabelle 9** dargestellt.

**Tab.9: Genotypverteilung in Abhängigkeit von der HRT-Einnahme**

CYP2E1 G-71T	GG			GT			TT		
	Anzahl * Fälle N* (%)	Kontr. N* (%)	OR <sub>adj</sub> <sup>1)</sup> (CI)	Fälle N* (%)	Kontr. N* (%)	OR <sub>adj</sub> <sup>1)</sup> (CI)	Fälle N* (%)	Kontr. N* (%)	OR <sub>adj</sub> <sup>1)</sup> (CI)
keine	263 48.08	298 50.51		36 65.45	30 51.72		2 66.67	2 100.00	
>0<10 Jahre	144 26.33	170 28.81	0.98 (0.71- 1.36)	8 14.55	17 29.31	0.11 (0.02- 0.71)	1 33.33	0 0.00	
10+ Jahre	140 25.59	122 20.68	1.35 (0.94- 1.95)	11 20.00	11 18.97	0.18 (0.03- 1.27)	0 0.00	0 0.00	

\*) Anzahl und Häufigkeiten ohne Berücksichtigung fehlender Werte der Confounder (roh)

1) adjustiert nach Menopausentyp, Alter bei Menopause, Alter der ersten Geburt, Anzahl der Geburten, BMI, Alter bei Menarche, Anzahl der Mammographien, Dauer des Stillens, familiärer Brustkrebs (Mutter und Schwester), Jahre der Einnahme oraler Kontrazeptiva

Auf die Genotypverteilung bezogen, geht aus **Tabelle 9** für den Referenzgenotyp GG bei einer HRT-Einnahme von 10 Jahren und länger ein erhöhtes Risiko für eine Brustkrebserkrankung hervor, welches bei einer Odds Ratio Schätzung von 1.35 und einem 95%CI zwischen 0.94-1.95 jedoch nicht signifikant ist. Für eine HRT-Einnahme unter 10 Jahren lässt sich ein minimal protektiver Faktor für den Genotyp GG bei einem Odds Ratio Schätzer von 0.98 und einem 95%CI zwischen 0.71-1.36, der ebenfalls nicht signifikant ist, feststellen.

Für den heterozygoten Genotyp GT geht aus den Ergebnissen unabhängig von der Dauer der HRT-Einnahme ein protektiver Faktor hervor. Dieser ist mit einer Odds Ratio Schätzung von 0.11 und einem 95%CI zwischen 0.02-0.71 aber nur für die Einnahme von HRT bis zu 10 Jahren statistisch signifikant erhöht. Das Risiko an Brustkrebs zu erkranken ist somit bei Frauen mit dem heterozygoten Genotyp GT und einer HRT-Einnahme unter 10 Jahren signifikant gemindert. Die Werte für den homozygot mutierten Genotyp TT waren zu klein, um berechnet werden zu können.

## 4. Diskussion

### 4.1 Verteilung des CYP2E1 G-71T Polymorphismus unter Patientinnen sowie Kontrollen und Brustkrebsrisiko

Unter den Kontrollprobandinnen wurde der Referenzgenotyp GG zu 90.84% und in der Patientinnengruppe zu 90.54% gefunden. Der heterozygote Genotyp fand sich in der Kontrollgruppe zu 8.85% und in der Patientengruppe zu 8.95%. Der homozygot variante Genotyp kam im Kontrollkollektiv zu 0.31% und somit etwas weniger oft vor als im Patientenkollektiv mit 0.49%. Die aus dieser von der Genica-Studie randomisierten Population errechneten Genhäufigkeiten entsprachen den genetischen Regeln des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>). Das Verteilungsmuster der Kontrollprobandinnen (**Tabelle 10**) entsprach annähernd der vom *National Cancer Institute* im *SNP500Database* für gesunde Kaukasier beschriebenen Verteilung in Tabelle???? (GG= 83.3%; GT=13.3%; TT=3.3%) (<http://snp500cancer.nci.nih.gov/snplist.cfm>).

**Tab.10: Genotypverteilung des CYP2E1 G-71T Polymorphismus unter den Kontrollen**

CYP2E1 G-71T	Genotypen			HWE bestanden?	Allele	
	GG	GT	TT		G	T
Kontrollprobandinnen (weibl. Kaukasier)	595/655 (0.908)	58/655 (0.088)	2/655 (0.003)	ja	1248/1310 (0.952)	62/1310 (0.047)

**Tab.11: Genotypverteilung des CYP2E1 G-71T von 99 anonymen Individuen aus der SNP500Database**

dbSNP ID: rs6413420						
Subpopulations	Genotypic			passed	Allelic	
	GG	GT	TT	HWE?	G	T
Total Completed	89/99 (0.899)	9/99 (0.091)	1/99 (0.010)	-	187/198 (0.944)	11/198 (0.056)
Afr/Afr American	22/24 (0.917)	2/24 (0.083)	0/24 (0.000)	passed	46/48 (0.958)	2/48 (0.042)
<b>Caucasian</b>	<b>25/30 (0.833)</b>	<b>4/30 (0.133)</b>	<b>1/30 (0.033)</b>	<b>passed</b>	<b>54/60 (0.900)</b>	<b>6/60 (0.100)</b>
Hispanic	19/22 (0.864)	3/22 (0.136)	0/22 (0.000)	passed	41/44 (0.932)	3/44 (0.068)
Pacific Rim	23/23 (1.000)	0/23 (0.000)	0/23 (0.000)	passed	46/46 (1.000)	0/46 (0.000)

Es fällt auf, dass in der Referenzdatenbank nur 30 kaukasische Individuen analysiert worden sind, deren Geschlecht unbekannt ist. Es handelt sich hierbei jedoch um die einzige verfügbare validierte Datenquelle überhaupt.

Die einzige Studie, die sich in der Literatur unter anderem auch mit der Genotypenhäufigkeit des CYP2E1 G-71T auseinandersetzt, zeigt für diesen Polymorphismus ein Sequenzierungsergebnis von 10% für den heterozygoten Genotyp GT von 115 gesunden kaukasischen nicht näher bestimmten Kontrollindividuen ( Fairbrother et al., 1998). Dieses Ergebnis unterstützt durchaus den für die vorliegende Studie in Bezug auf den heterozygoten Genotyp ermittelten Wert. Weitere Angaben aus Studien über die Genotypenhäufigkeiten und Verteilung des CYP2E1 G-71T Polymorphismus finden sich derzeit nicht in der einschlägigen Literatur.

Zusätzlich fanden sich in einer Studie Angaben über die Häufigkeit des heterozygoten Genotyp GT des CYP2E1 G-71T Polymorphismus, der in dieser Personengruppe zu 13,5% (8



Heterozygote Individuen von 59) auftrat. Man untersuchte 59 Personen, die geringen Mengen an industriellen Acrylnitrilen über einen Zeitraum von 5 Jahren als Teil eines medizinischen Überwachungsprogramms ausgesetzt waren. Es wurde der Zusammenhang der Acrylnitrilexposition und die signifikanten individuellen Unterschieden im menschlichen Acrylnitrilmetabolismus untersucht, unter anderem bezogen auf Genotypen von CYP2E1 Polymorphismen, (Thier et al., 2002). Dieses Verteilungsmuster entspricht ebenfalls der Datenquelle der *SNP500Database*.

Auch Untersuchungen, die einen Zusammenhang zwischen dem CYP2E1 G-71T Polymorphismus und dem Auftreten eines Mammakarzinoms oder auch anderen Krebsarten herstellen, sind bis jetzt nicht veröffentlicht worden.

Allerdings existieren zahlreiche Studien über die häufiger vorkommenden CYP2E1 Polymorphismen RsaI und DraI im Zusammenhang mit einer Vielzahl von Krebserkrankungen. Die Ergebnisse sind kontrovers. Mehrere Studien scheiterten daran, eine Verbindung zwischen dem RsaI- und/oder dem DraI-Polymorphismus mit Lungenkrebs (London, 1996; Sugimura, 1995; Kato, 1994; Watanabe, 1995), Head-Neck-Karzinom (Gonzales, 1998), Leberzellkarzinom (Kato, 1995; Wong, 2000), Harnblasenkrebs (Anwar, 1996; Farker, 1998), Nasopharyngeal- oder Pharyngealkarzinom (Lucas, 1996; Jahnke 1996), Magenkrebs (Kato, 1995, 1996, 1997), Plattenepithelkarzinom der Speiseröhre (Morita, 1997; Lucas, 1996; Hori, 1997), Prostatakrebs (Murata, 2001) oder Zervixkarzinom (Kim, 2000) herzustellen.

Im Gegensatz dazu fanden andere Studien eine signifikante Assoziation zwischen CYP2E1-Polymorphismen und dem Auftreten von verschiedenen Karzinomen heraus, zumindest wenn addierende Faktoren wie Rauchen oder Alkoholkonsum berücksichtigt wurden (Oyama, 1997; Hildesheim, 1997; Ladero, 1996; Shields, 1996; Hung, 1997; Kiss, 2000). Interessanterweise beschreiben einige Arbeiten einen protektiven Effekt von Allelvarianten im CYP2E1-Gen für das Risiko von heranreifenden Karzinomen (Marchand, 1998; Wu, 1997; Tan, 2000). Die Studie, die sich bisher mit der Assoziation von CYP2E1 Polymorphismen und Brustkrebs befasste, fand ein erhöhtes Risiko für das Auftreten eines Mammakarzinoms bei prämenopausalen, rauchenden Frauen mit dem DraI-Polymorphismus heraus (Shields, 1996).

Da die Frequenz der variablen Allele bei Kaukasiern und Afro-Amerikanern sehr gering ist, ist die statistische Aussagekraft der zuvor erwähnten Studien eher gering. Zusammenfassend weisen

die kontroversen Resultate auf die Wichtigkeit einer guten Dokumentation von CYP2E1 Genotypen und der Entstehung von Krebs in Verbindung mit verschiedensten Risikofaktoren hin.

In der vorliegenden Studie war der Anteil des Referenzgenotyps GG mit 90.54% in der Patientinnengruppe und mit 90.84% im Kontrollkollektiv der Anteil des heterozygoten Genotyps GT mit 8.95% und 8.85% respektive nahezu identisch. Der homozygot variante Genotyp TT war mit 0.49% unter den Patientinnen häufiger vertreten als unter den Kontrollen mit 0.31%. Das heißt, das Risiko für die Trägerin des homozygot varianten Genotyps an Brustkrebs zu erkranken, ist geringfügig gesteigert, allerdings bei einer Odds Ratio Schätzung von 1.61 und einem 95%CI zwischen 0.27-9.66 nicht in statistisch signifikantem Maße. Die relativ geringe Allelfrequenz dieser Genotypvariante macht eine Bedeutung für das Erkrankungsrisiko Mammakarzinom als alleinig auslösender Suszeptibilitätsfaktor ebenfalls sehr unwahrscheinlich.

Die Art des Genotyps für den CYP2E1 G-71T Polymorphismus allein erhöht demnach das Risiko für Brustkrebs nicht.

#### **4.2 Bedeutung der Risikofaktoren Estrogene sowie HRT und CYP2E1 G-71T**

Der Zusammenhang zwischen Estrogenexposition und dem Auftreten von Mammakarzinomen bei Frauen ist nicht von der Hand zu weisen. Frühe Menarche, späte Menopause und Adipositas in der Postmenopause (Estrogenproduktion im Fettgewebe) erhöhen signifikant das Mammakarzinom-Risiko (Colditz, 1998; Jeffcoate et al., 2000; Reid, 1996). Die beidseitige Ovariectomie reduziert das Mammakarzinom-Risiko um fast 80% (Jefcoate et al., 2000). Frauen ohne funktionierende Ovarien haben ein ähnlich niedriges Mammakarzinom-Risiko wie Männer (Reid et al., 1996).

Auch wenn die Daten kontrovers diskutiert werden, zeigt die Metaanalyse der Collaborative Group on Hormonal Factors in Breastcancer, dass eine Hormonersatztherapie über 5 Jahre das relative Risiko für die Diagnose eines Mammakarzinoms um den Faktor 1.35 (CI: 1.21-1.49) erhöht (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 1997). Die Studie der Woman's Health Initiative fand eine etwas geringere Erhöhung der Inzidenz von invasiven Mammakarzinomen (relatives Risiko 1.26; CI: 1.00-1.59) unter Hormonsubstitution mit

konjugierten equinen Estrogenen und Medroxyprogesteronacetat, die nach 5-jähriger Behandlung in Erscheinung trat (Writing Group of the Woman's Health Initiative Investigators, 2002).

Nach Ettinger wird die gesundheitliche Relevanz des beobachteten geringen Anstiegs des Brustkrebs-Risikos bei einer Substitutionsdauer von mehr als 5 Jahren unter Einbezug der Reduktion des Herz-Kreislauf-Erkrankungsrisikos und einer effektiven Osteoporoseprophylaxe mehr als ausgeglichen (Ettinger et al., 1996).

Außerdem nimmt das leicht erhöhte Risiko innerhalb von 2-5 Jahren nach Absetzen wieder ab und liegt in der gleichen Größenordnung wie bei Frauen ohne Hormonersatztherapie oder gemäß einiger Studien sogar tiefer. Dies lässt den Schluss zu, dass Estrogene das Wachstum eines bestehenden Karzinoms fördern können, es aber nicht auslösen. Aus diesem Grunde können Estrogene nicht als Karzinogene bezeichnet werden (Day, 1983).

Hingegen zählt die *International Agency for Research and Cancer (IARC)* Estron und Estradiol zu den Substanzen, die bei Versuchstieren (Nagern) und Menschen karzinogen sind (IARC, 1987,1999). Eine Expertengruppe des National Toxicology Programs des *National Institute of Environmental Health Sciences* der USA schlug im Dezember 2000, vor die steroidalen Estrogene in die Liste der Karzinogene aufzunehmen. Dieses Gremium betonte dass, „Estrogene nicht nur mit einem erhöhten Risiko für Karzinome assoziiert sind, sondern dass es sich um Substanzen handelt, die bekannte Ursachen von menschlichen Karzinomen sind“ (National Toxicology Program, 2000). Bei Mäusen erzeugt Estradiol Tumoren der Mamma, der Hypophyse, des Uterus, der Zervix, der Vagina, der Testes, des lymphatischen Systems und der Knochen. Bei Ratten induzieren Estradiol (E2) und Estron (E1) Tumoren des Uterus und der Hypophyse und bei Hamstern Nierenkarzinome (Liehr, 2000, 2001). Die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf den Menschen wird weiterhin durch ausgeprägte Speziesunterschiede im endokrinen System eingeschränkt (Emons et al., 2002).

Zwar waren in den klassischen In-vitro-Assays (*Salmonella typhimurium*, V79 Hamster-Zellen usw.) Estrogene nicht mutagen (Liehr, 2001), aber die estrogeninduzierte Tumorentwicklung konnte durch eine rezeptorvermittelte Stimulation der Proliferation estrogenabhängiger Zellen erklärt werden. Durch die Zunahme von Mitosen erhöht sich die Wahrscheinlichkeit des Auftretens spontaner Replikationsfehler. Die Möglichkeiten der DNA-Reparatur sind bei rasch proliferierenden Zellen reduziert (Henderson et al., 2000). Als potente Mitogene für entsprechende ER-positive Zellen sind Estrogene somit klassische Tumorpromotoren. Diese Theorie ist für die Entstehung von Mammakarzinomen nicht ganz so schlüssig, da normale

proliferierende Mammaepithelzellen keine Estrogenrezeptoren (ER) exprimieren. Allerdings werden ER von den nicht proliferierenden Stromazellen exprimiert, die über die Sekretion von Wachstumsfaktoren das mitogene Estrogensignal an die Epithelzellen weitergeben. Transformierte Mammaepithelzellen (duktale Carcinomata in situ, invasive Karzinome) exprimieren zumindest im frühen Stadium meist ER und können durch Estrogene direkt stimuliert werden (Clarke et al., 1997; Liehr, 2001; Russo et al., 2000). Tierversuche an syrischen Hamstern legen nahe, dass die hormonelle Aktivität von Estrogenen über ER-vermittelte Mechanismen und durch Störung des mitotischen Apparates notwendig für die Tumorinduktion sind, sie sind aber nicht ausreichend. Es wurde vermutet, dass direkte genotoxische (mutagene) Effekte der Estrogene bzw. bestimmter Estrogenmetaboliten eine Rolle spielen. Da Estradiol selbst keine direkte mutagene Wirkung hat, wurde vermutet, dass Stoffwechselprodukte dieses Steroids zu DNA-Schäden führen könnten. In der Tat konnte gezeigt werden, dass die durch aromatische Orthohydroxylierung von  $E_2$  bzw.  $E_1$  gebildeten Catecholestrogene (2-Hydroxy und 4-Hydroxyestrogene) zu entsprechenden Chinonen weiter metabolisiert werden, die direkt mit der DNA reagieren können. Die Metaboliten der 2-Hydroxyestrogene bilden stabile DNA-Addukte und haben eine geringe mutagene Potenz. Die DNA-Addukte der Metaboliten der 4-Hydroxyestrogene sind jedoch instabil und führen zum Verlust von Guanin oder Adenosin aus der DNA (sogenannte depurinierende Addukte). Dadurch kommt es zu Einzelstrangbrüchen, Punktmutationen und zur Bildung von sogenannten „bulky DNA-adducts“. In zellfreien Systemen induzieren nur die Catecholestrogene bzw. die Chinone diese DNA-Veränderungen. Im Kultursystem mit intakten Zellen, in denen Estradiol oxidativ metabolisiert werden kann, ist auch dieses Estrogen genotoxisch (Liehr, 2001). Zahlreiche durch Estradiol bzw. die Catecholestrogene induzierten genetischen Mutationen sind in experimentellen Systemen beschrieben worden (Liehr, 2000; 2001). Russo und Mitarbeiter (2002) konnten MCF-10F Zellen (immortalisierte humane Mammaepithelzellen ohne Estrogenrezeptoren) mit Estradiol in einer sehr niedrigen Konzentration (7 picomolar) maligne transformieren. Sie postulierten, dass  $E_2$  in diesem Modell die gleiche Effizienz zur malignen Transformation habe wie das chemische Karzinogen Benzpyren. Somit ist in experimentellen Modellen ein schlüssiges Konzept entwickelt worden, wie Estrogene eine Zelle maligne transformieren können: Die direkt genotoxischen Estrogenmetabolite, insbesondere das Estradiol-3,4,-chinon, führen zu DNA-Schäden und transformieren Mutationen. Exprimiert die betroffene Zelle gleichzeitig Estrogenrezeptoren, wirken Estrogene gleichzeitig mitogen. Durch häufige Mitosen ist die Zeit

für die DNA-Reparatur verkürzt, die Wahrscheinlichkeit für transformierende Mutationen und deren Weitergabe an Tochterzellen ist erhöht. Estrogene sind in diesem Modell somit mutagen und mitogen. Sie sind nicht nur Tumorpromotoren, sondern durch ihre mutagene Eigenschaft auch Tumorinitiatoren und damit komplette Karzinogene (Liehr, 2000; 2001).

Das Risiko, an einem Mammakarzinom zu erkranken, hängt vor allem von der kumulativen Estrogenexposition des Brustgewebes ab (Pike et al., 1993). Auch ein aktuellerer Übersichtsartikel (Clemons und Goss, 2001) unterstreicht die Annahme, dass nicht das Hormon 17- $\beta$ -Estradiol an sich, sondern die kontinuierliche lokale Belastung mit supraphysiologischen Dosen dieses Hormons zu einem hohen Proliferationsdruck epithelialer Brustzellen, einer erhöhten Dichte und Schmerzhaftigkeit des Brustparenchyms und in weiterer Folge zu einem erhöhten Risiko führt, an einem Mammakarzinom zu erkranken.

Liehr (2001) betont, dass Estrogene und ihre Metaboliten im Vergleich zu klassischen chemischen Karzinogenen, wie z.B. Dimethylbenzanthracen (DMBA) und Benzo-(a)-pyren nur schwach wirksam sind. Möglicherweise ist das Risiko, an einem Estrogen-induzierten Karzinom zu erkranken, abhängig von der individuellen Ausstattung mit spezifischen Enzymen des Estrogenstoffwechsels. Gen-Polymorphismen dieser Enzyme spielen dabei eine sehr große Rolle. Denkbar wäre, dass Frauen, die aufgrund eines Polymorphismus des Enzyms CYP1B1 vermehrt 4-Hydroxyestrogene bilden, ein höheres Risiko für die Estrogen-induzierte Karzinogenese aufweisen. Die Daten über höhere 4-Hydroxyestrogenspiegel in Mammakarzinomen (Liehr, 2001; Santen, 2002) deuten in diese Richtung.

Aus der Literatur ergeben sich stark kontroverse Resultate über den direkten Einfluss von Estrogene auf das Brustkrebsrisiko. Relativ gesichert scheint, dass die Langzeithormonersatztherapie das Brustkrebsrisiko mehr oder weniger steigert.

Lacey et al. fanden bei Frauen, die eine reine Estrogensubstitution über mehr als 10 Jahre durchführten, eine Erhöhung des relativen Risikos an einem Mammakarzinom zu erkranken um den Faktor 1,8 (CI: 1,1-3,0) (Lacey et al., 2002). In einer ähnlichen Studie in Schweden wurde gar ein Faktor von 2,14 (CI: 1,03-4,46) errechnet (Riman et al., 2002).

Studien über einen Zusammenhang zwischen CYP2E1-Polymorphismen und einer estrogen-induzierten Karzinogenese für ein Mammakarzinom sind zur Zeit noch nicht bekannt. Wir konnten in unserer Fall-Kontroll-Studie jedoch feststellen, dass eine Vielzahl der Mammakarzinompatientinnen den CYP2E1 G-71-T Polymorphismus aufwiesen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie suggerieren jedoch, dass nur unabhängig vom Genotyp für die Einnahme von HRT über einen Zeitraum von 10 Jahren und länger ein signifikant erhöhtes Risiko besteht an Brustkrebs zu erkranken (OR: 1.41; CI: 1.01-1.96). Außerdem ergibt sich aus dieser Studie unabhängig von der Art des Genotyps für die HRT-Einnahme bis zu einer Dauer von insgesamt 10 Jahren, ein gering protektiver Faktor, an einem Mammakarzinom zu erkranken (OR. 0.93; CI: 0.69-1.25). Dieser Wert ist statistisch jedoch nicht signifikant und kann somit nur eine Trendrichtung anzeigen. Diese Erkenntnis spiegelt sich in vielen anderen Studien, die zuvor beschrieben wurden wieder.

In Abhängigkeit vom jeweiligen Genotyp des CYP2E1 G-71-T ergeben sich für ein erhöhtes Risiko an Brustkrebs bei HRT-Einnahme zu erkranken, keine statistisch signifikanten Werte. Allerdings zeichnet sich auch aus diesen Daten zumindest für den Referenzgenotyp GG bei einer HRT-Einnahme von 10 Jahren und länger der Trend zu einem erhöhten Erkrankungsrisiko bei einer OR von 1.35 und einem CI zwischen 0.94-1.96 ab.

Dass eine HRT- Einnahme bis zu 10 Jahren das Brustkrebsrisiko geringfügig senkt, kann in Verbindung mit dem heterozygoten Genotyp GT bei einer OR von 0.11 und einem CI zwischen 0.02-0.71 signifikant bestätigt werden. Auch die zwar statistisch nicht signifikanten Werte für den Referenzgenotypen GG folgen dem protektiven Trend bei einer OR von 0.97 für eine HRT-Einnahme von bis zu 10 Jahren. Die Werte für die homozygote Varianzform waren aufgrund des geringen Vorkommens zu klein, um berechnet werden zu können.

Vergleichbare Daten zur Beeinflussung des Brustkrebsrisikos bei HRT- Einnahme durch Genvarianten des CYP2E1 G-71-T Polymorphismus finden sich zur Zeit nicht in der einschlägigen Literatur. Das mag daran liegen, dass zum einem dieser Polymorphismus des CYP2E1 sehr selten in der kaukasischen Bevölkerung auftritt, zum anderen, daß das Enzym CYP2E1 für den Hormonstoffwechsel und somit auch für die HRT keine direkte Rolle spielt. Deshalb wurden in diesem Zusammenhang mit hoher Wahrscheinlichkeit auch keine anderen weitaus häufiger vorkommenden Polymorphismen des CYP2E1 untersucht.

### **4.3 Bedeutung des Risikofaktors Rauchen und CYP2E1 G-71T**

Der Effekt von Rauchen auf das Brustkrebsrisiko bleibt umstritten. Teerprodukte sollen das Risiko erhöhen, der antiöstrogene Effekt das Risiko verringern, obwohl Rauchen mit erhöhtem

Auftreten von hormonrezeptor-negativen Tumoren assoziiert ist und somit als ungünstiger Prognosefaktor zu werten ist (Manjer et al., 2001).

Die meisten epidemiologischen Studien zum Zigarettenrauchen und der Brustkrebsinzidenz vermochten nicht, einen starken Zusammenhang zwischen diesen Faktoren aufzuzeigen. Eine Studie aus Schweden fand keine signifikante Assoziation zwischen gegenwärtigem Rauchen und dem Brustkrebsrisiko heraus. Das adjustierte relative Risiko unter allen Ex-Rauchern war 1.31 (1.02-1.69), verglichen mit Nicht-Rauchern, und in premenopausalen Ex-Rauchern war es 1.57 (1.07-2.30). Die Brustkrebsinzidenz in premenopausalen Ex-Rauchern stand in inverser Beziehung zur Zeit der Abstinenz (Manjer und Berglund, 2000). Der karzinogene Effekt des Rauchens wird durch aromatische Hydrokarbone erklärt, die in Tabak enthalten sind, wobei genetische Polymorphismen der N-Acetyltransferase-2 eine potentielle Rolle spielen (Krajinovic et al., 2001).

Für die Subgruppe der Raucher wurde hier kein bedeutender Effekt festgestellt (Rylander-Rudqvist et al., 2003). Im Gegensatz zu Field et al. (1992) wiesen einige amerikanische Studien (Brownson et al., 1988; Calle et al., 1994) auf eine erhöhte Brustkrebsgefahr bei Raucherinnen hin. Zusätzlich wurde von einer dosisabhängigen Risikosteigerung berichtet. Darüber hinaus entdeckten Morabia et al. (1996) und Lash et al. (1999) nicht nur für aktive Raucher, sondern auch für Passivraucher eine deutliche Risikosteigerung. Passives Rauchen führte in einer prospektiven US-Studie (Wartenberg et al., 2000) mit 146.488 Nichtraucherinnen und 12-Jahre-Follow-Up zu keiner signifikanten Risikoerhöhung, während in einer kanadischen Fall-Kontrollstudie (Johnson et al., 2000) mit 2.317 Brustkrebspatientinnen für prämenopausale Frauen und aktives oder passives Rauchen eine signifikante Risikoerhöhung belegt wurde. Kürzlich zeigte Terry et al. (2002), dass ein positiver Zusammenhang zwischen Tabakkonsum und Brustkrebsrisiko besteht. Verglichen mit Nichtrauchern waren Frauen, die über 40 Jahre mehr als 20 Zigaretten pro Tag geraucht hatten, am meisten gefährdet (RR=1,83; 95% CL 1,29-2,61).

Das CYP2E1 aktiviert das Prokarzinogen N-Nitrosamine (Kushida et al., 2000). Der DraI-Polymorphismus wurde mit Lungenkrebs assoziiert (Uematsu et al., 1994) und zeigte eine Zigarettenkonsum-abhängige Risikosteigerung. Auch bei prämenopausalen amerikanischen Frauen spielte die Raucheranamnese für das CYP2E1-bedingte Brustkrebsrisiko eine wichtige Rolle (Shields et al., 1996). Shields et al. fand ein erhöhtes Risiko für ein Mammakarzinom für den DraI-Polymorphismus bei prämenopausalen Frauen heraus.

In der vorliegenden Studie wurde ein geringfügig protektiver Faktor des „Risikofaktors“ Rauchen unabhängig vom Genotyp in Bezug auf das Brustkrebsrisiko bei einer statistisch nicht signifikanten OR von 0.91 und einem CI zwischen 0.72-1.15 ermittelt.

In Abhängigkeit vom Genotyp konnte für die heterozygote Genotypvariante GT des CYP2E1 G-71T Polymorphismus im Zusammenhang mit positiver Raucheranamnese ein signifikant erhöhtes Erkrankungsrisiko für Brustkrebs nachgewiesen werden (OR: 4.02; CI: 1.01-16.02).

Der Referenzgenotyp GG dagegen zeigt wiederum einen protektiven Effekt, der jedoch nicht signifikant ist (OR: 0.78; CI: 0.60-1.01). Für den homozygoten Varianzgenotyp TT konnten keine Werte ermittelt werden. Ein Vergleich zu den bisher durchgeführten Studien fällt schwer, da zum einen der für diese Studie relevante Polymorphismus G-71T in diesem Zusammenhang noch nie untersucht wurde, zum anderen da in der vorliegenden Studie nicht zwischen prämenopausalen und postmenopausalen Frauen unterschieden wurde. Der sich aus den Ergebnissen abzeichnende protektive Trend des Rauchens unabhängig vom Genotyp oder auch für den Referenzgenotyp GG ist sehr kritisch zu betrachten, vor allem da das Rauchen als unumstrittener Risikofaktor für das Auftreten von Lungenkrebs und anderen hormonrezeptor-negativen Tumoren gilt. Das in dieser Studie ermittelte signifikant erhöhte Erkrankungsrisiko für Brustkrebs für Trägerinnen der heterozygoten Genotypvariante GT bei positiver Raucheranamnese bedarf sicherlich noch weiteren Studien ausführlicherem Umfangs, um als medizinisch gesicherte Tatsache an Bedeutung zu gewinnen, da die Frequenz der variablen Allele für diesen Polymorphismus unter den untersuchten kaukasischen Probandinnen sehr gering war. Außerdem wäre eine genauere Beschreibung des Rauchverhaltens in Bezug auf Dauer und Menge für weitere Studien sinnvoll.

#### **4.4 Analyse des Studienaufbaus der Genica-Brustkrebs-Studie**

Bei der Genica-Studie handelt es sich um eine Fall-Kontroll-Studie. In solchen Studien wird die Assoziation zwischen der Exposition mit einem möglichen schädigenden Agens und dem Vorliegen einer Erkrankung untersucht. Es werden Patienten identifiziert, die an einer bestimmten Erkrankung leiden (Fälle). Um die Fälle zu vergleichen, werden Personen (Kontrollen) identifiziert, die den Fällen möglichst ähnlich sind (bezüglich Alter, Geschlecht, Blutdruck, Einnahme anderer Medikamente, Begleiterkrankungen usw.), die Erkrankung jedoch



nicht aufweisen. Anschließend wird ermittelt, wie viele der Fälle und wie viele der Kontrollen der zu untersuchenden Noxe ausgesetzt waren. Besteht eine positive Assoziation zwischen Exposition und Erkrankung, so ist der Anteil der Exponierten im Kollektiv der Fälle höher als im Kollektiv der Kontrollen. Eine positive Assoziation in der Fall-Kontroll-Studie ist aber nicht unbedingt ein Beweis für eine kausale Beziehung. Entscheidend für die Qualität einer Fall-Kontroll-Studie ist die Zusammensetzung und Vergleichbarkeit der Kontrollgruppe.

Oft ist eine Fall-Kontroll-Studie die einzige Möglichkeit, einen Zusammenhang zwischen einem Risikofaktor und dem daraus resultierenden Schaden nachzuweisen. Dies gilt vor allem dann, wenn die Krankheit entweder sehr selten auftritt oder die Zeit zwischen der Exposition (z.B. Asbest) und dem Auftreten der vermuteten assoziierten Krankheit (Pleuramesotheliom) lange dauert. Letzteres gilt auch für die Entstehung des Brustkrebses. Es ist nahezu unmöglich, unmittelbare Zusammenhänge zwischen Lebensumstand und Brustkrebsätiologie nachzuweisen. Daher ist der Vergleich einer großen Anzahl von Kontrollen und Fällen, deren Verhältnisse und Gesundheitszustand möglichst vollständig erfasst werden, sinnvoll. Hinzukommend ermöglicht dies den Vergleich innerhalb von Subgruppen, z.B. Frauen, die eine positive Raucheranamnese aufweisen oder Hormonersatzpräparate einnehmen.

Für die Aussagekraft der Genica-Studie spricht vor allem die Größe des Gesamtkollektivs der Studienteilnehmerinnen. Es konnten 688 Fälle und 724 Kontrollindividuen aus einem lokal begrenzten Bezirk, dem Rhein-Sieg-Kreis rekrutiert werden.

Ein zusätzliches Qualitätsmerkmal ist die Auswahl der Kontrollen per Zufallsprinzip aus den Listen der Einwohnermeldeämter, wobei allerdings nicht berücksichtigt werden konnte, seit wann die Personen in dieser Region resident waren. Zusätzlich wurden die Kontrollprobandinnen entsprechend den Brustkrebsfällen in Altersgruppen von 5 Jahren vom Geburtsjahr an zugeordnet. Ebenfalls kann nicht davon ausgegangen werden, dass Frauen innerhalb des Rhein-Sieg-Kreises immer unter gleichen Umweltbedingungen leben. Aufgrund der ähnlichen Anzahl von Patienten und Kontrollen gleicht sich dieser Fehler in beiden Kollektiven aus, da flächendeckend gearbeitet wurde. Mit extremem Aufwand wurden die ausgewählten Kontrollen kontaktiert, zum Teil persönlich aufgesucht, um die Teilnahme zu gewährleisten. Trotz des allgemein hohen Interesses der weiblichen Bevölkerung für die Erkrankung lehnten 355 Frauen die Teilnahme ab. 152 der 1306 angeschriebenen Frauen entsprachen aufgrund nicht kaukasischer Herkunft oder einem früheren Vorliegen einer Brustkrebserkrankung nicht den vorgegebenen

Kriterien für eine Teilnahme. Eine Fehlerquelle hierbei könnte sein, dass möglicherweise bei einer der „gesund“ eingestuften Personen ein nicht diagnostizierter Brustkrebs vorlag.

Von den geeigneten Kontrollpersonen wollten 27,19 % nicht an der Studie partizipieren, im Gegensatz zu den Patienten, von denen nur 11,04 % die Teilnahme verweigerten. Die unterschiedliche Motivation sowie das abweichende Interesse werden nur geringfügig durch die Bereitschaft zur Blutentnahme reflektiert, bei 93,65 % der Kontrollen im Gegensatz zu 96,37 % der Fälle konnte oder durfte Blut zur DNA-Extraktion entnommen werden. Interessanterweise sind unter den Fällen fast doppelt so viele fehlgeschlagene Genotypisierungen („missings“).

Für den Polymorphismus G-71T nämlich 7.54 % unter den Fällen verglichen mit 3.39 % unter den Kontrollen. Für den Polymorphismus C-1053T verhält es sich mit 6.79% fehlgeschlagenen Genotypisierungen unter den Fällen und 3.24% unter den Kontrollen genauso. Eine mögliche Ursache könnte die veränderte Qualität oder Konzentration der Leukozyten der erkrankten Personen sein. Schließlich fanden Interview und Blutabnahme meistens in zeitlicher Nähe zur Operation des Brusttumors oder auch der Chemotherapie statt. Leider ist es trotz äußerster Sorgfalt der wissenschaftlichen Mitarbeiter und geschulter Doktoranten nicht auszuschließen, dass zusätzliche Fehlerquellen in der DNA-Extraktion, dem Ansetzen der Proben oder der Anwendung des Light-Cyclers liegen, wie es sich in der Auswertung des C-1053T Polymorphismus gezeigt hat, die dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht nicht standhielt und somit für diese Arbeit nicht weiter verwendet werden konnte.

Nach subjektiver Einschätzung waren sowohl die betroffenen Frauen als auch die teilnehmenden Kontrollpersonen im ca. einstündigen Interview motiviert die gestellten Fragen gut zu beantworten, so dass man den Angaben eine hohe Reliabilität zusprechen darf. Eine mögliche Verzerrung der Ergebnisse ist dadurch gegeben, dass die Interviews von mehreren Personen durchgeführt wurden, und durch eventuelle Rückfragen an den Interviewer eine Einflussmöglichkeit besteht. Allgemein sind die Interpretationsmöglichkeiten durch die Vorgabe der Antworten gering. Zudem führten alle Interviewer sowohl mit Patientinnen als auch mit Kontrollen Fragegespräche, wodurch sich der Fehler minimieren sollte.

Insgesamt handelt es sich um sehr breit gefächertes Interview, das in Teilbereichen relativ oberflächlich bleibt. Es ist sinnvoll, nach gewisser Voreinschätzung Ansätze für diffizilere Fragestellungen herauszufiltern.

## 5. Zusammenfassung

Der Anstieg der Mammakarzinominzidenz in den modernen Industrieländern wird sehr häufig mit veränderten Umweltbedingungen in Zusammenhang gebracht. Mit zunehmender Aufklärung in der Bevölkerung und steigendem Gesundheitsbewusstsein werden verschiedenste Faktoren gesucht, die maßgeblich zur Entstehung von Brustkrebs beitragen oder diesen selbst auslösen. Individuell unterschiedliche Ansprechbarkeiten bzw. Wirkungsunterschiede von exogenen Fremdstoffen, unter anderem von Nahrungsmitteln, Nikotin, Hormonersatzpräparaten oder eventuell sogar von endogenen Estrogenen haben ihre Ursache in der Variabilität der Gene, die für fremdstoffmetabolisierende Enzyme kodieren. Es ist insgesamt evident, dass diese Polymorphismen fremdstoffmetabolisierender Enzyme die Wirkungen toxischer Stoffe entscheidend modulieren und somit deren Karzinogenität steigern können. Die katalytischen Eigenschaften der polymorphen Genvariante unterscheiden sich von denen des Referenzgenotyps, so dass der entsprechende Genotyp im Falle einer Fremdstoffexposition einen Einfluss auf Art und Menge anfallender genotoxischer Stoffwechselmetaboliten hat. Diese schädigen in Abhängigkeit von Dosis und Zeit zelluläre DNA-Strukturen und verursachen möglicherweise Mutationen in Tumorsuppressorgenen oder Proto-Onkogenen, die für eine fehlerfreie Zellproliferation und -differenzierung verantwortlich sind. Der damit verbundene Verlust ihrer Kontrollfunktion stellt eine entscheidene Voraussetzung für autonomes Zellwachstum dar. Gen-Umwelt-Beziehungen spielen demnach als Suszeptibilitätsfaktoren für die Entstehung eines Mammakarzinoms eine bedeutende Rolle.

Für die vorliegende Fall-Kontroll-Studie wurden 688 Brustkrebspatientinnen und 724 Kontrollprobandinnen aus einem lokal begrenzten Gebiet, dem Rhein-Sieg-Kreis, in Bezug auf ihre Lebensgewohnheiten, Krankheitsgeschichte und Fremdstoffexposition interviewt. Zusätzlich konnten 613 Fälle und 655 Kontrollen erfolgreich mit der Real-time Light Cycler PCR für den CYP2E1 G-71T Polymorphismus genotypisiert und hinsichtlich eines Einflusses von Hormonersatzpräparaten und Zigarettenkonsum auf die Brustkrebsentstehung untersucht werden. Das CYP2E1 stellt ein wichtiges Schlüsselenzym des oxidativen Stoffwechsels vieler Xenobiotika dar. Es katalysiert u.a. die Umsetzung der Präkanzerogene Benzol, Vinylchlorid, Chloroform und Nitrosaminen.

In der Auswertung dieser Studie war der Anteil des homozygot varianten Genotyps TT unter den Patientinnen leicht erhöht, woraus sich bei einer OR von 1.61 (CL: 0.27-9.66) für diese

Allelpaarträgerinnen jedoch kein erhöhtes Brustkrebsrisiko im statistisch signifikanten Ausmaß ergibt. Die Art des Genotyps allein erhöht demnach nicht das Brustkrebsrisiko.

Estrogene spielen eine zentrale Rolle in der Entwicklung von Brustkrebs, ihre potentielle Kanzerogenität auf die humanen Brustepithelzellen wurde in der Arbeit dargestellt. Das Erkrankungsrisiko für Brustkrebs ist für Frauen, die kumulativ 10 Jahre und länger HRT eingenommen haben, unabhängig vom Genotyp signifikant erhöht (OR: 1.41; CL:1.01-1.96). Allerdings zeigt sich bei einer HRT-Einnahme bis zu 10 Jahren, unabhängig vom Genotyp ein leicht protektiver Einfluss auf die Entwicklung eines Mammakarzinoms (OR: 0.93; CL:0.69-1.25). Auch genotypspezifisch konnte in dieser Studie für den heterozygoten Genotyp GT bei der Einnahme von Hormonersatzpräparaten bis zu 10 Jahren ein statistisch signifikanter protektiver Faktor ermittelt werden (OR: 0.11; CL: 0.02-0.71). Das Risiko an Brustkrebs zu erkranken, hängt vor allem von der kumulativen Estrogenexposition des Brustgewebes ab. Nicht das 17 $\beta$ - Estradiol an sich, sondern die kontinuierliche lokale Belastung mit supraphysiologischen Dosen dieses Hormons, wie z.B. unter Langzeit-HRT führen zu einem hohen Proliferationsdruck epithelialer Brustzellen. Somit ist es ratsam die HRT-Einnahme trendgerecht zeitlich zu begrenzen.

Der Effekt des Rauchens auf das Brustkrebsrisiko ist umstritten. Viele Studien publizieren sogar einen leicht protektiven Einfluss des Rauchens auf die Mammakarzinomentstehung, der möglicherweise durch den antiestrogenen Effekt der Tabakbestandteile zu erklären ist. Das CYP 2E1 aktiviert das in Tabak enthaltene Prokanzerogen N-Nitrosamin und deshalb für diese Subgruppe der verschiedenen exogenen Risikofaktoren von besonderem Interesse. Ein signifikant risikomindernder Faktor konnte in der vorliegenden Studie sowohl genotypunabhängig als auch genotypspezifisch nicht ermittelt werden. Im Gegensatz dazu konnte für den heterozygoten Genotyp GT im Zusammenhang mit positiver Raucheranamnese ein signifikant erhöhtes Erkrankungsrisiko für Brustkrebs nachgewiesen werden (OR: 4.02; CL: 1.01-16.02).

Aufgrund der geringen Genotypfrequenzen des CYP2E1 G-71T Polymorphismus in der kaukasischen Bevölkerung wird sich das individuelle Brustkrebsrisiko nur schwer voraussagen lassen. Zudem ist noch ungenügend untersucht, inwieweit Gen-Gen-Interaktionen, wie z.B. Kombinationen von Polymorphismen unterschiedlicher Enzyme zum Erkrankungsrisiko von Brustkrebs beitragen.

## 6. Literaturverzeichnis

**Alister HM.** Long-term hormone replacement therapy. Aust Prescr 2000; 23: 90-92

**Anonymous.** Alcohol, tobacco and breast cancer - collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58 515 women with breast cancer and 95 067 women without the disease. Br J Cancer 2002; 87: 1234-1245

**Anwar WA,** Abdel-Rahman SZ, El-Zein RA, Mostafa HM, Au WW. Genetic polymorphism of GSTM1 , CYP2E1 an CYP2D6 in Egyptian bladder cancer patients. Carcinogenesis 1996; 17(9): 1923-9

**Arbeitsgemeinschaft bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland.** Krebs in Deutschland. 3. erweiterte, aktualisierte Ausgabe, Saarbrücken, 2002.

**Armstrong K,** Eisen A, Weber B. Assessing the risk of breast cancer. N Engl J Med 2000; 342: 564-571

**ATAC (Arimidex, Tamoxifen Alone or in Combination) Trialists`Group.** Anastrozole alone or in Combination with Tamoxifen versus Tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early breast cancer: first results of the ATAC randomised trial. Lancet 2002; 355: 2131-2139

**Bässler R.** Histopathologie und aktuelle Klassifikation des Mammakarzinoms. Onkologie 1998; 4:878-895

**Bässler R.** Mamma. In: Remmele W, Hrsg. Pathologie. Band 4, 2. Aufl. Berlin Heidelberg New York: Springer, 1997: 237-339

**Baster G,** Costa SD. Malignome der Mamma, In: Baster G, Hrsg. Spezielle gynäkologische

Onkologie II. Klinik der Frauenheilkunde und Geburtshilfe. Band 12, 3. Aufl.. München Wien  
Baltimore: Urban & Schwarzenberg, 1996: 121-243

**Berg JM**, Tymoczko JL, Stryer L. Biochemie. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag  
GmbH, 2003

**Bergstrom A**, Pisani P, Tenet V, Wolk A, Adami HO. Overweight as an avoidable cause of  
cancer in Europe. *Int J Cancer* 2001; 91: 421-430

**Birkhäuser M**, Bodmer Ch, Brundel Re R, De Geyter Ch, De Grandi P, Delaloye JF,  
Eppenberger U, Keller PJ, Litschgi M, Schäfer P, Senn HJ. Hormonsubstitution und  
Mammakarzinom. *Praxis* 2002; 91: 2169-2180

**Birkhäuser M**. Hormonersatztherapie nach Behandlung eines Mammakarzinoms. *Schweiz Med  
Wochenschr* 1998; 128: 10675-89

**Böcker W**, Denk H, Heitz Ph U. Mamma. In: Böcker W, Denk H, Heitz Ph U, Hrsg. Pathologie.  
2. Aufl. München Jena: Urban & Fischer, 2001: 909-916

**Bolt HM**. Genetic an individual differences in the process of biotransformation and their  
relevance for occupational medicine. *Med Lav* 1994; 85: 37-48

**Browson RC**, Blackwell CW, Pearson DK, Reynolds RD, Richens JW Jr, Papermaster BW.  
Risks of breast cancer in relation to cigarette smoking. *Arch Intern Med* 1988; 148: 140-144

**Calle EE**, Miracle-McMahill HL, Thun MJ, Health CW Jr. Cigarette smoking and risk of fatal  
breast cancer. *Am J Epidemiol* 1994; 139: 1001-1007

**Caporosa N**, Goldstein A. Cancer genes: single and susceptibility: exposing the difference.

Pharmacogenetics 1995; 5: 59-63

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

**Clavel-Chapelon F**. Differential effects of reproductive factors on the risk of pre- and postmenopausal breast cancer. Results from a large cohort of French women. *Br J Cancer* 2002; 86: 723- 727

**Clemons M** and Goss P. Estrogen and the risk of breast cancer. *New Engl J Med* 2001; 344 (4): 276-85

**Coditz GA**. Relationship between estrogen levels, use of hormone replacement therapy and breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 814-824

**Coffey DS**. Similarities of prostate and breast cancer: Evolution, diet, and estrogens. *Urology* 2001; 57: 31-38

**Coleman MP**, Sloggett A, Babb P, et al. Trends in breast cancer incidence, survival and mortality. *Lancet* 2000; 356: 590-591.

**Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast cancer**. Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50 302 women with breastcancer and 96 973 women without the disease. *Lancet* 2002; 360: 187-95

**Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast cancer**. Breastcancer and hormone replacement therapy: Collaborative reanalysis of data 51 epidemiological studies of 52705 women with breast cancer and 108411 women without breast cancer. *Lancet* 1997; 357: 1047-1059

**Danielson PB.** The Cytochrome P450 Superfamily: Biochemistry, Evolution and Drug Metabolism in Humans. *Current Drug Meabolism* 2002; 3: 561-597

**Day NE.** Epidemiologie: The role of multi-stage models. *Cancer Survey* 1983; 2: 579-93

**Deapen D,** Liu L, Perkins C, Bernstein L, Ross RK. Rapidly rising breast cancer incidence rates among Asian-American women. *Int J Cancer* 2002; 99: 747-750

**Dover GA** and Tautz D. Conservation and divergence in multigene families: alternatives to selection and drift. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1986 Jan 29;312(1154):275-89

**Dover GA.** DNA turnover and the molecular clock. *J Mol Evol.* 1987; 26(1-2): 47-58

**Dupont WD,** Page DL. Menopausal estrogen replacement therapy and breast cancer. *Arch Intern Med* 1991; 151: 67-72

**Easton D,** Ford D, Peto J. Inherited susceptibility to breast cancer. *Cancer Surv* 1993; 18: 95 -113

**El-Bayoumy K.** Environmental carcinogens that may be involved in human breast cancer etiology. *Chem Res Toxicol* 1992; 5: 585-590

**Emerit I.** Reactive oxygen species, chromosome mutations, and cancer : possible role of clastogenic factors in carcinogenesis. *Free Radic Biol Med* 1994; 16: 99-109.

**Emmons G,** Fleckenstein G, Hinney B, Huschmand A, Heyl W. Hormonal interactions in endometrial cancer. *Endocrine Related Cancer* 2000; 7: 227-242.

**Engers R,** Gabbert HE. Basismechanismen der Metastasierung. *Onkologe* 1998; 4: 682-688



**Eppenberger U**, Kueng W, Eppenberger-Castori S, von Landenberg EM, Müller H. Molekulare Faktoren bestimmen die primäre und sekundäre Therapie des Mammakarzinoms. *Ther Umsch* 1997; 54: 451-6

**Ettinger B**, Friedman GD, Bush T, Quesenberry Jr CP. Reduced mortality associated with long-term postmenopausal estrogen therapy. *Obstet Gynecol* 1996; 87: 6-12

**Fairbrother KS**, Grove J, de Waziers I, Steimel DT, Day CD, Crepsi CL, Daly AK. Detection and characterization of novel polymorphisms in the CYP2E1 gene. *Pharmacogenetics* 1998; 8: 543-552

**Farker K**, Lehmann MH, Oelschlagel B, Haerting J, Hoffmann A, Janitzky V, Schubert J. Impact of CYP2E1 genotype in renal cell and urothelial cancer patients. *Exp Toxicol Pathol.* 1998; 50(4-6): 425-31

**Favero A**, Parpinel M, Franceschi S. Diet and risk of breast cancer: major findings from an Italian case-control study. *Biomed Pharmacother* 1998; 52: 109-115

**Favero A**, Parpinel M, Montella M. Energy sources and risk of cancer of the breast and colon-rectum in Italy. *Adv Exp Med Biol* 1999; 472: 51-55

**Ferraroni M**, Decarli A, Franceschi S, La Vecchia C. Alcohol consumption and risk of breast cancer: a multicentre Italian case-control study. *Eur J Cancer* 1998; 34: 1403-1409

**Field NA**, Baptiste MS, Nasca PC, Metzger BB. Cigarette smoking and breast cancer. *Int J Epidemiol* 1992; 21: 842-848

**Finlay CA**, Hinds PW, Levine AJ. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 1989; 57: 1083-93

**Friedrichs K**. Genetische Aspekte des Mammakarzinoms. *Gynäkologe* 1994; 27: 7-11

**Fryberg ER**, Blank K. Overview of the biology and management of ductal carcinoma in situ of the breast. *Cancer* 1994; 74 Suppl.: 350-361

**Gammon MD**, Schoenberg JB, Teitelbaum SI, Brinton LA, Potischman N, Swanson CA, Brogan DJ, Coates RJ, Malone KE, Stanford JL. Cigarette smoking and breast cancer risk among young women (United States). *Cancer Causes Control* 1998; 9: 583-590

**Gasparini G**. Prognostic variables in node-negative and node-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 52: 321-331

**Ghadirian P**, Lacroix A, Perret C, Maisonneuve P, Boyle P. Sociodemographic characteristics, smoking, medical and family history, and breast cancer. *Cancer Detect Prev* 1998; 22:485-494

**Gonzales FJ**, Gelboin HV. Role of human cytochromes P450 in the metabolic activation of chemical carcinogens and toxins. *Drug Metab Rev* 1994; 26:165-183

**Gonzalez F**. Human cytochrome P450: problems and perspectives. *Trends Pharmacol Sci* 1992; 13: 346-52

**Gonzalez FJ** and Nebert DW. Evolution of the P450 gene superfamily: animal-plant 'warfare', molecular drive and human genetic differences in drug oxidation. *Trends Genet.* 1990 Jun; 6(6): 182-6

**Gonzalez FJ**. Molecular genetics of the P450 superfamily. *Pharmacol Ther* 1990; 45: 1-38

**Gonzalez MV**, Alvarez V, Pello MF, Menendez MJ, Suarez C, Coto. Genetic polymorphism of N-acetyltransferase-2, glutathione-S-transferase-M1, and cytochrome p450IIE1 and P450IID6 in the susceptibility to head and neck cancer. *J Clin Pathol.* 1998; 51(4): 294-8

**Greenlee RT**, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin* 2000; 50: 7-

33

**Guengerich FP.** Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes. *Chem Res Toxicol* 1991; 4: 391-407

**Hardman AE.** Physical activity and cancer risk. *Proc Nutr Soc* 2001; 60: 107- 113

**Harris H,** Miller OJ, Klein G, Worst P, Tachibana T. Suppression of malignancy by cell fusion. *Nature* 1969; 223: 363-8

**Hellmolt H,** Rylander T, Magnusson M, Reihner E, Warner M, Gustafsson JA. Characterization of cytochrome P450 enzymes in human breast tissue from reduction mammoplasties. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 886-95

**Henderson BE,** Feigelson HS. Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2000; 21:427-433

**Hepp H,** Untch M, Bender HG, Nitz U. Metastasiertes Mammakarzinom. *Gynäkologie* 1999; 32: 593

**Hildesheim A,** Anderson LM, Chen CJ, Cheng YJ, Brinton LA, Dal Ak, Reed CD, Chen III, Caporaso NE, Iisu MM, Chen JY, Idle JR, Hoover RN, Yang CS, Chhabra SK. CYP2E1 genetic polymorphisms and risk of nasopharyngeal carcinoma in Taiwan. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89(16): 1207-12

**Hildesheim A,** Chen CJ, Caporaso NE, Cheng YJ, Hoover RN, Hsu MM, Levine PH, Chenm IH, Chen JY, Yang CS, Daly AK, Idle JR. Cytochrome P4502E1 genetic polymorphisms and risk of nasopharyngeal carcinoma: Results from a case-control study conducted in Taiwan. *Cancer Epidemiol Biomarkers & Prev* 1995; 4: 607-610

**Holland JF,** Frei E, Bast RC, Kufe DW, Morton DL, Weichselbaum RR. *Cancer Medicine*. Baltimore: Williams & Wilkens: Fourth edition, Volume One, 1997

**Holmes MD**, Hunter DJ, Colditz GA, Stampfer MJ, Hankinson SE, Speizer FE, Rosner B, Willett WC. Association of dietary intake of fat and fatty acids with risk of breast cancer. *JAMA* 1999a; 281: 914-920

**Holmes MD**, Stampfer MJ, Colditz GA, Rosner B, Hunter DJ, Willett WC. Dietary factors and the survival of women with breast carcinoma. *Cancer* 1999b; 86: 826-835

**Hori H**, Kawano T, Endo M, Yuasa Y. Genetic polymorphisms of tobacco- and alcohol-related metabolizing enzymes and human esophageal squamous cell carcinoma susceptibility. *J Clin Gastroenterol.* 1997; 25(4): 568-75

**Hu Y**, Oscarson M, Johansson I, Yue QY, Dahl ML, Tabone M, Arinco S, Albano E, Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphism of human CYP2E1: characterization of two variant alleles. *Mol Pharmacol* 1997; 51: 370-376

**International Agency for Research on Cancer.** Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Hormonal Contraception and Postmenopausal Hormone Therapy. IARC, Lyon, Frankreich 1987; Suppl 7: 280-285

**International Agency for Research on Cancer.** Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Hormonal Contraception and Postmenopausal Hormone Therapy. IARC, Lyon, Frankreich 1999; 72: 474-530

**Iscan M**, Klaavuniemi T, Coban T, Kapucuoglu N, Pelkonen O, Raunion H. The expression of cytochrome P450 enzymes in human breast tumours and normal breast tissue. *Breast Cancer Res Treat* 2001; 70: 47-54

**Jahnke V**, Matthias C, Fryer A, Strange R. Glutathione S-transferase and cytochrome-P-450 polymorphism as risk factors for squamous cell carcinoma of the larynx. *Am J Surg.* 1996;

172(69): 671-3

**Jänicke F.** Prognostische und prädiktive Faktoren bei patientinnen mit Mammakarzinom. In: Kreienberg R, Möbus V, Alt D, Hrsg. Management des Mammakarzinoms: ein Leitfadens für die Praxis. Berlin Heidelberg New York: Springer, 1998: 115-132

**Jefcoate CR,** Liehr JG, Santen RJ, Sutter TR, Yager JD, Yue W, Santner SJ, Tekmal R, Demers L, Pauley R, Naftolin F, Mor G, Berstein L. Tissue-specific synthesis and oxidative metabolism of estrgens. J National Cancer Inst Monogr 2000; 27: 95-112

**Johnson KC,** Hu J, Mao Y. Passive and aktive smoking and breast cancer risk in Canada, 1994-97. The Canadian Cancer Registries Epidemiology Research Group. Cancer Causes Control 2000; 11: 211-221

**Kapucuoglu N,** Coban T, Raunio H, Pelkonen O, Edwards RJ, Boobis AR, Iscan M. Immunohistochemical demonstration of the expression of CYP2E1 in human breast tumour and non-tumour tissues. Cancer Letters 2003; 196: 153-59

**Kato S,** Onda M, Matsukura N, Tokunaga A, Matsuda N, Yamashita K, Shields PG. Genetic polymorphisms of the cancer related gene and Helicobacter pylori infection in Japanese gastric cancer patients. An age and gender matched case-control study. Cancer 1996; 77(8 Suppl): 1654-61

**Kato S,** Onda m, Matsukura N, Tokunaga A, Matsuda N, Yamashita K, Shields PG. Helicobacter pylori infection and genetic polymorphisms for cancer-related genes in gastric carcinogenesis. Biomed Pharmacother 1997; 51(4): 145-9

**Kato S,** Onda M, Matsukura N, Tokunaga A, Tajiri T, Kim Dy, Tsuruta II, Matsuda N, Yamashita K, Shields PG. Cytochrome P4502E1 (CYP2E1) genetic polymorphism in a case-control study of gastric cancer and liver disease. Pharmacogenetics 1995; 5 Spec NO:S 141-4

**Kato S**, Shields PG, Caporaso NE, Sugimura II, Trivers GE, Tucker MA, Trump BF, Weston A, Harris CC. Analysis of cytochrome P450 2e1 genetic polymorphisms in relation to human lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1994; 3(6): 515-8

**Kato S**, Shields PG, Caporaso NE; Hoover RN, Trump BF, Sugimuro H, Weston A, Harris CC. Cytochrome P4502E1 genetic polymorphisms, racial variation and lung cancer risk. *Cancer Res* 1992; 52: 6712-15

**Kawajiri K**, Nakachi k, Watanabe J, Hayashi SI. The Cyp 1A1 gene and cancer susceptibility. *Crit Rev Oncol Hematol* 1993; 14: 77-87

**Kelsey JL**, Berkowitz GS. Breast cancer epidemiology. *Cancer Res* 1988; 48: 5615-5623

**Key TJ**, Allen NE, Spencer EA, Travis RC. The effect of diet on the risk of cancer. *Lancet* 2002; 360: 861-868

**Key TJ**, Allen NE, Verkaslo PK, Banks E. Energy balance and cancer: the role of sex hormones. *Proc Nutr Soc* 2001; 60: 81-89

**Kim JW**, Lee CG, Park YG, Kim KS, Sohn YW, Min HK, Namkoong SE. Combined analysis of germline polymorphisms of p53, GSTM1, GSTT1, CYP1A1, and CYP2E1: relation to the incidence rate of cervical carcinoma. *Cancer* 2000; 88(9): 2082-91

**Kiss I**, Sandor J, Pajkos G, Bogner B, Hegedus G, Ember I. Colorectal cancer risk in relation to genetic polymorphism of cytochrome P450 1A1, 2E1, and glutathione-S-transferase M1 enzymes. *Anticancer Res.* 2000; 20(1B): 519-22

**Knippers R**. *Molekulare Genetik*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 2001

**Knudson AG Jr**. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastom. *Proc Natl Acad Sci*

USA 1971; 68: 820-3

**Koolmann J**, Röhm KH. Taschenatlas der Biochemie. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 1994

**Krajnovic M**, Ghadirian P, Richer c Sinnett H, Gandini S, Perret C, Lacroix A, Labuda D, Sinnett D. Genetic susceptibility to breast cancer in French-Canadians: rolr of carcinogen-metabolizing enzymes and gene-environment interactions. *Int J Cancer* 2001; 92: 220-225

**Kurihara M**, Aoki K, Tominaga S. Cancer mortality statistics in the world. Univ Nagoya Press 1984

**Kushida H**, Fujita KI, Suzuki A, Yamada M, Endo T, NohmiT, Kamataki T. Metabolic activation of N-alkynitrosamines in genetically engineered salmonella typhimurium expressing CYP2E1 or CYP2A6 together with human NADPH-cytochromeP450 reductase. *Carcinogenesis* 2000; 21: 1227-1232

**Lacey JV Jr**, Mink PJ, Lubin JH, Sherman ME, Troisi R, Hartge P, Schatzkin A, Schairer C. Menopausal hormone replacment therapy and risk of ovarian cancer. *JAMA* 2002; 288: 334-341

**Lacey JVJ**, Devesa SS, Brinton LA. Recent trends in breast cancer incidence and mortality. *Environ Mol Mutagen* 2002; 360: 187-195

**Ladero JM**, Agundez JA, Rodriguez-Lescure A, Diaz-Rubio M, Benitez J. RsaI polymorphism at the cytochrome P4502E1 locus and risk of hepatocellular carcinoma. *Gut* 1996; 39(2): 330-3

**Ladero JM**, Agundez JAG, Rodriguez-Lescure A, et al. Rsa I polymorphism at the cytochrom P450 2E1 locus and risk of hepatocellular carcinoma. *Gut* 1996; 39: 330-333

**Lagios MD**. Duktales carcinoma in situ. In: Untch M, Konecny G, Keßler M, Reiser M, Hepp H, Hrsg. Diagnostik un Therapie des Mammakarzinoms: State of the Art. 2. Aufl.. München Bern

Wien: Zuckschwerdt, 2000: 147-164

**Lane DP**, Crawford LV. T antigen bound to a host protein in SV 40-transformed cells. *Nature* 1979; 278: 261-3

**Lash TI**, Aschengrau A. Active and passive cigarette smoking and the occurrence of breast cancer. *Am J Epidemiol* 1999; 149: 5-12

**Le Marchand L**, Sivaraman L, Pierce L, Seifried A, Lum A, Wilken LR, Lau AF. Associations of CYP1A1, GSTM1, and CYP2E1 polymorphisms with lung cancer suggest cell type specificity to tobacco carcinogens. *Cancer Res.* 1998; 58(21): 4858-63

**Leis HP**. Prognose des Mammakarzinoms. In: Strömbeck JO, Rosato ER, Hrsg. *Mammachirurgie*. Stuttgart New York: Thieme, 1987: 120-130

**Leung GM**, Thach TQ, Lam TH, Hedley AJ, Foo W, Fielding R, Yip PS, Lau EM, Wong CM. Trends in breast cancer incidence in Hong Kong between 1973 and 1999: an age-period-cohort analysis. *Br J Cancer* 2002; 87: 982-988

**Lieber CS**. Cytochrome P-450E1: Its physiological and pathological role. *Physiological Reviews* 1997; 77:517-544

**Lieber CS**. Metabolism of ethanol and associated interactions with other drugs, carcinogens, and vitamins. *NY State J Med* 1986; 297-307

**Lichtenstein P**, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, Pukkala E, Skytthe A, Hemminki K. Environmental and heritable factors in the causation of cancer- analysis of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med* 2000; 343: 78-85

**Liehr JG**. Genotoxicity of the steroidal oestrogens oestrone and oestradiol: possible mechanisms of uterine and mammary cancer development. *Human Reproduction Update* 2001; 7: 273-281



**Liehr JG.** Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen? *Endocriner Reviews* 2000; 21: 40-54

**Linzer DIH,** Levine AJ. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cells* 1979; 17: 43-52

**Lipp HP,** Schuler U. Die menschlichen Cytochrom-P450-Isoenzyme. *Arzneimitteltherapie* 1995; 9: 272-280

**London SJ,** Daly AK, Cooper j, Carpenter CL, Navidi WC, Ding L, Idle JR. Lung cancer risk in relation to the CYP2E1 Rsa I genetic polymorphism among African-Americans and Caucasians in Los Angeles County. *Pharmacogenetics* 1996; 6(2): 151-8

**Lukas D,** Menez C, Floch F, Gourlaouen Y, Sparfel O, Joannet I, Bodenez p, Jezequel J, Gouerou H, Berthou F, Bardou LG, Menez Jf. Cytochromes P4502E1 and P4501A1 genotypes and susceptibility to cirrhosis or upper aerodigestive tract cancer in alcoholic caucasians. *Alcohol Clin Exp Res.* 1996; 20(6). 1033-7

**Macdonald F,** Ford CHJ. *Molecular biology of cancer.* Bios scientific publishers, 1997

**Malkin D,** Li FP, Strong LC, Fraumeni JFJ, Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA, Friend SH. Germline p53 mutations in a familial syndrome of breast cancers, sarcomas and other neoplasms. *Science* 1990; 250: 1233-1238

**Manjer J,** Janzon L. Covariance of breast cancer incidence with smoking-, oestrogen- and diet-related cancers in pre- and postmenopausal women in Sweden. *Med Hypotheses* 1999; 52: 561-568

**Manjer J,** Malina J, Berglund G, Bondeson L, Garne JP, Janzon L. Smoking associated with hormone receptor negative breast cancer. *Int J cancer* 2001; 91: 580-584

**Marcus PM**, Newman B, Millikan RC, Moorman PG, Baird DD, Qaqish B. The associations of adolescent cigarette smoking, alcoholic beverage consumption, environmental tobacco smoke, and ionizing radiation with subsequent breast cancer risk (United States). *Cancer Causes Control* 2000; 11: 271-278

**Marquardt H**, Schäfer SG. *Lehrbuch der Toxikologie*. Mannheim: BI-Wissenschaftsverlag, 1994

**McBride OW**, Umeno M, Gelboin HV, Gonzales FJ. A taq I polymorphism in the human P450III<sub>E1</sub> gene on chromosome 10 (CYP 2E). *Nucleic Acids Res* 1987; 15: 10071

**Merzenich H**, Boing H, Wahrendorf J. Dietary fat and sports activity as determinants for age at menarche. *Am J Epidemiol* 1993; 138: 217-224

**Messina M**, Gardner C, Barnes S. Gaining insight into the health effects of soy but a long way still to go: commentary on the fourth International Symposium on the Role of Soy in Preventing and Treating Chronic Disease. *J Nutr* 2002; 132: 547S-551S

**Missmer SA**, Smith-Warner SA, Spiegelman D, Yaun SS, Adami HO, Beeson WL, van den Brandt PA, Fraser GE, Freudenheim JL, Goldbohm RA, Graham S, Kushi LH, Miller AB, Potter JD, Rohan TE, Speizer FE, Toniolo P, Willett WC, Wolk A, Zeleniuch-Jacquettoe A, Hunter DJ. Meat and dairy food consumption and breast cancer: a pooled analysis of cohort studies. *Int J Epidemiol* 2002; 31: 78-85

**Moore DB**, Folsom AR, Mink PJ, Hong CP, Anderson KE, Kushi LH. Physical activity and incidence of postmenopausal breast cancer. *Epidemiology* 2000; 11: 292-296

**Morabia A**, Bernstein M, Heritier S, Khatchatrian N. Relation of breast cancer with passive and active exposure to tobacco smoke. *Am J Epidemiol* 1996; 143: 918-928

**Morita S**, Yano M, Shiozaki H, Tsujinaka T, Ebisui C, Morimoto T, Kishibuti M, Fujita J,

Ogawa A, Taniguchi M, Inoue M, Tamura S, Yamazaki k, Kikkawa N, Mizunoya S, Monden M. CYP1A1, CYP2E1 and GSTM1 polymorphisms are not associated with susceptibility to squamous-cell carcinoma of oesophagus. *Int J Cancer* 1997; 71(2): 192-5

**Morris CR**, Wright WE, Schlag RD. The risk of developing breast cancer within the next 5, 10 or 20 years of a woman's life. *Am J Prev Med* 2001; 20(3): 214-8

**Mullis K**, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986; 51:263-73

**Murata M**, Watanabe M, Yamanaka M, Kubota Y, Ito H, Nagao M, Katoh T, Kamataki T, Kawamura J, Yatani R, Shiraishi T. Genetic polymorphisms in cytochrome P450 (CYP) 1A1, CYP1A2, CYP2E1, glutathione S-transferase (GST) M1 and GSTT1 and susceptibility to prostate cancer in the Japanese population. *Cancer Lett.* 2001; 165(2): 171-7

**Murray CLJ, Lopez AD.** Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997; 349: 1269-76.

**NAMS.** The role of isoflavones in menopausal health: consensus opinion of The North American Menopause Society. *Menopause* 2000; 7: 215-229

**National Toxicology Program.** National Institute of Environmental Health Sciences. Report on Carcinogens 2000. <http://www.niehs.nih.gov/news/rocrslt.htm>

**Nebert DW** and Nelson DR P450 gene nomenclature based on evolution. *Methods Enzymol.* 1991;206:3-11.

**Nebert DW**, Gonzalez FJ. P450 genes: Structure, evolution and regulation. *Annu Rev Biochem* 1987; 56: 945-993

**Nelson DR**, Kamataki T, Waxmann DJ, Guengerich FP, Estabrook RW, Feyereisen R, Gonzalez FJ, Coon MJ, Gunsalus IC, Gotoh O, Okuda K and Nebert DW. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol* 1993 Jan-Feb; 12(1): 1-51

**Obrecht JP**. Adjuvante systemische Therapie. IN: Meuret G, Hrsg. Mammakarzinom. 2. Aufl. Stuttgart: Thieme, 1995: 107-135

**Oeser H**. Das Mammakarzinom biometrisch betrachtet. *Dtsch Med Wochenschr* 1980; 105: 1124-1127

**Oestereich S**, Fuqua SA. Tumor suppressor genes in breast cancer. *Endocrelat Cancer* 1999; 6: 405-419

**Omura T** and Sato R. A new cytochrome in liver microsomes. *J Biol Chem*. 1962 Apr; 237: 1375-6

**Omura T** und Sato R. The carbon monoxid-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem*. 1964 Jul; 239: 2370-8

**Orr FW**, Kostenuik P, Sanchez-Sweatman OH, Singh G. Mechanisms involved in the metastasis of cancer to bone. *Breast Cancer Res Treat* 1993; 25: 151-163

**Oyama T**, Kawamoto T, Mizoue T, Sugio K, Kodama Y, Mitsudomi T, Yasumoto K. Cytochrome P450 2E1 polymorphism as a risk factor for lung cancer relation to p53 gene mutation. *Anticancer Res*. 1997; 17(1B). 583-7

**Pantel K**, Koprowski H, Riethmüller G. Conference on cancer micrometastasis: biology, methodology and clinical significance. *Int J Oncol* 1993; 3: 1019-1022

**Park SK**, Yoo KY, Lee SJ, Kim SU, Ahn SH, Noh DY, Choe KJ, Strickland PT, Hirvonen A, Kang D. Alcohol consumption, glutathione S-transferase M1 and T1 genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Pharmacogenetics* 2000; 10: 301-309

**Peto R**, Boreham J, Clarke M, et al. UK and USA breast cancer deaths down 25% in year 2000 at ages 20-69 years. *Lancet* 2000; 355: 1822.

**Pike MC**, Spicer DV, Dahmouch L, Press MF. Estrogens, progesterons, normal breast cell proliferation, and breast cancer risk. *Epidemiol Rev.* 1993; 15: 17-35

**Pisani P**, Parkin DM, Bray F, Farley J, 1999. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990 (published erratum. *Int J Cancer* 1999;83: 18-29). *Int J Cancer* 1999; 83: 870-873.

**Raunio H**, Pasanen M, Mäenpää J, Hakkola J, Pelkonen O. Advances in Drug Metabolism in Man. In: Pacifici GM, Fracchia GN, Hrsg. European Commission. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 1995: 234-287

**Reid SE**, Murthy MS, Kaufman M, Scanlon EF. Endocrine and paracrine hormones in the promotion, progression and recurrence of breast cancer. *British Journal of Surgery* 1996; 83: 1037-1041

**Riede UN**, Wiestler OD, Müller H. Autonomes Zellwachstum (Tumorpathologie). In: Riede UN, Schaefer HE, Hrsg. Allgemeine und spezielle Pathologie. Stuttgart: Thieme, 1995: 344-92

**Ries LA**, Eisner MP, Kosary CL, Hankey BF, Miller BA, Clegg L, Edwards BK. SEER cancer statistics review, 1973-1997. Bethesda, MD: National Cancer Institute 2000

**Riman T**, Dickman PW, Nilsson S, Correia N, Nordlinder H, Magnusson CM, Weiderpass E, Persson IR. Hormone replacement Therapy and risk of invasive epithelial ovarian cancer in Swedish

women. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 497-50

**Rohan Te**, Jain M, Howe GR, Miller AB. Alcohol consumption and risk of breast cancer: a cohort study. *Cancer Causes Control* 2000; 11: 239-247

**Rosen PP**, Oberman HA. Tumors of the mammary gland. In: Rosai J, Sobin IH, Hrsg. Atlas of tumor pathology. 3. Aufl. Bethesda: Armed forces institute of pathology, 1993: 7-15

**Russo J**, Hu YF, Yang X, Russo JH. Developmental, cellular, and molecular basis of human breastcancer. *J Natl Cancer Inst Mongr* 2000; 27: 17-37

**Russo J**, Lareef MH, Tahin Q, Hu YF, Slater C, Ao X, Russo IH. 17 Beta-estradiol is carcinogenic in human breast epithelial cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002; 80:149-162

**Santen RJ**. To block estrogen's synthesis or action: that is the question. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 3007-3012

**Schmidt-Matthiesen H**, Bastert G, Wallwiener D. Gynäkologische Onkologie. Stuttgart New York: Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, 2000

**Schreinert P**, PCR - Die Polymerasekettenreaktion (Teil I) *BioTec* 1997; 3: 50-51

**Schulz TG**, Hallier E. Die Bedeutung von genetischen Polymorphismen Fremdstoff-metabolisierender Enzyme in der Arbeitsmedizin. *Arbeitsmed Sozialmed Umweltmed* 1999; 34: 307-314

**Seeber S**, Becher R. Mammakarzinom. In Seeber S, Schütte J (Hrsg): *Therapiekonzepte in der Onkologie*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg 1995; 892-920

**Seow A**, Duffy SW, McGee MA, Lee HP. Breast cancer in Singapore: trends in incidence 1968-

1992. *Int J Epidemiol* 1996; 25: 40-45

**Shields PG**, Harris CC. Cancer risk and low-penetrance susceptibility genes in gene-environment interactions. *JCO* 2000; 18: 2309-2315

**Shields PG**, Harris CC. Molecular epidemiology and the genetics of environmental cancer. *JAMA* 1991; 266: 681-7

**Shields PG**, Ambrosone CB, Graham S, Bowman ED, Harrington AM, Gillenwater KA, Marshall JR, Vena JE, Laughlin R, Nemoto T, Freudenheim JL. A cytochrome P4502E1 genetic polymorphism and tobacco smoking and breast cancer. *Mol Carcinog.* 1996; 17(3): 144-50

**Sloane JP**, Amendoeira I, Apostolikas N, Belloqc JP, Bianchi S, Böcker W, Bussolati G, Connolly CE, De Miguel C, Dervan P, Drijkoning R, Elston CW, Faverly D, Gad A, Holland R, Jacquemier J, Lacerda M, Lindgren A, Martinez-Penuela J, Peterse JL, Rank F, Tsakraklides V, de Wolf C, Zafrani B. Leitlinien für die Pathologie, Anhang zu den Europäischen Leitlinien für die Qualitätssicherung beim Mammakarzinomscreening. Bericht der Arbeitsgruppe Pathologie der Europäischen Gemeinschaft. *Pathologie* 1997; 1: 71-88

**Smith- Warner SA**, Spiegelman D, Adami HO, Beeson WL, van den Brandt PA, Folsom AR, Fraser GE, Freudenheim JL, Goldblohm RA, Graham S, Kushi LH, Miller AB, Rohan TE, Speizer FE, Toniolo P, Willett WC, Wolk A Zeleniuch-Jacquotte A, Hunter DJ. Types of dietary fat and breast cancer: a pooled analysis of cohort studies. *Int J Cancer* 2001; 92: 767-774

**Smith-Warner SA**, Spiegelman D, Yaun SS, van den Brandt PA, Folsom AR, Goldbohm RA, Graham S, Holmberg L, Howe GR, Marshall JR, Miller AB, Potter JD, Speizer FE, Willett WC, Wolk A, Hunter DJ. Alcohol and breast cancer in women: a pooled analysis of cohort studies. *JAMA* 1998; 279: 535-540

**Stanford JL**, Herrinton LJ, Schwartz SM, Weiss NS. Breast cancer incidence in Aian migrants to

the United States and their descendants. *Epidemiology* 1995; 6: 181- 183.

**Steinberg KK**, Thacker SB, Smith SJ, Stroup DF, Zack MM, Flanders WD et al. A meta-analysis of the effect of estrogen replacement therapy on the risk of breast cancer. *JAMA* 1991; 265: 1985-90

**Stephens EA**, Taylor JA, Kaplan N, Yang CH, Hsieh LL, Lucier GW, Bell DA. Ethnic variation in the CYP2E1 gene: polymorphism analysis of 695 African-Americans, European-Americans and Taiwanese. *Pharmacogenetics* 1994; 4: 185-192

**Stoll BA**. Western diet, early puberty, and breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 49: 187-193

**Stoll BA**. Western nutrition and the insulin resistance syndrome: a link to breast cancer. *Eur J Clin Nutr* 1999; 53: 83-87

**Stryer L**. *Biochemie*. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 1994

**Sturmer T**, Wang-Gohrke S, Arndt V, Boeing H, Kong X, Kreienberg R, Brenner H. Interaction between alcohol dehydrogenase II gene, alcohol consumption, and risk for breast cancer. *Br J Cancer* 2002; 82: 519-523

**Sugimura H**, Hamada GS, Suzuki I, Iwase T, Kiyokawa E, Kino I, Tsugane S. Cyp1A1 and CYP2E1 polymorphism and lung cancer, case-control study in Rio de Janeiro, Brazil. *Pharmacogenetics* 1995; 5 Spec No:S 145-8

**Tan W**, Song N, Wang GQ, Liu Q, Tang HJ, Kadlubar FF, Lin DX. Impact of genetic polymorphisms in cytochrome P450 2E1 and glutathione S-transferase M1, T1, and P1 on susceptibility esophageal cancer among high-risk individuals in China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000; 9(6): 551-6



**Terry PD**, Miller AB, Rohan TE. Cigarette smoking and breast cancer risk: a long latency period? *Int J Cancer* 2002; 100: 723-728

**Thier R**, Lewalter J, Selinski S, Bolt HM. Possible impact of human CYP2E1 polymorphisms on the metabolism of acrylnitrile. *Toxicol. Lett.* 2002; 128: 249-255

**Thier R**, Golka K, Brüning T, Bolt HM. Genetische Suszeptibilität im Hinblick auf toxische Arbeitsplatz- und Umweltbelastungen. *Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz* 1999; 42: 834-840

**Trichopoulou A**, Lagiou P, Kuper h, Trichopoulos D. Cancer and Mediterranean dietary traditions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 869-873

**Umeatsu F**, Ikawa S, Kikuchi H, Sgami I, Kanamaru R, Abe t, Satoh K, Motomiya M, Watanabe M. Restriction fragment length polymorphism of human CYP2E1 gene and susceptibility to lung cancer: possible relevance to low smoking exposure. *Pharmacogenetics* 1994; 4: 58-63

**Umeno M**, McBride OW, Yang CS, Gelboin HV, Gonzales FJ. Human ethanol-inducible P450IIE1: Complete gene sequence, promoter characterization, chromosome mapping, and cDNA-directed expression. *American Chemical Society* 1988; 27: 9006-9013

**Velie E**, Kulldorff M, Schairer C, Block G, Albanes D, Schatzkin A. Dietary fat, fat subtypes, and breast cancer in postmenopausal women: prospective cohort study. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 833-839

**Vetter C**. *Brustkrebs*. zm 91 2001;7:786-788

**Wartenberg D**, Calle EE, Thun MJ, Heath CWJ, Lally C, Woodruff T. Passive smoking exposure and female breast cancer mortality. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1666-1673

**Watanabe J**, Yang JP, Eguchi H, Hayashi S, Imai K, Nakachi K, Kawajiri K. *An Rsa I*

polymorphism in the CYP2E1 gene does not affect lung cancer risk in a Japanese population. *Jpn J Cancer Res.* 1995; 86(3): 245-8

**Welp EA**, Weiderpass E, Boffetta P, Vainio H, Vasama-Neuvonen K, Petralia S, Partanen TJ. Environmental risk factors of breast cancer. *Scand J Work Environ Health* 1998; 24: 3-7

**WHI**. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women`s Health Initiative (WHI) randomized controlled trial. *JAMA* 2002; 288: 321-333

**WHO**. Histological typing of breast tumors. International histological classification of tumors no.2. 2. Aufl. Geneva, 1981

**Willet WC**. Diet and cancer: one view at the start of the millennium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10: 3-8

**Wolff MS**, Weston A. Breast cancer risk and environmental exposures. *Environ health Perspect* 1997; 4: 891-896

**Wong NA**, Rae F, Simpson KJ, Murray GD, Harrison DJ. Genetic polymorphisms of cytochrome p4502E1 and susceptibility to alcoholic liver disease and hepatocellular carcinoma in a white population: a study and literature review, including meta-analysis. *Mol Pathol*, 2000;53(2): 88-93

**Writing Group for the Women`s Health Initiative Investigators**. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women. Principal results from the Women`s Health Initiative randomised controlled trial. *JAMA* 2002; 288: 321-333

**Wu J**. Apoptosis and angiogenesis: two promising tumor markers in breast cancer. *Anticancer Res* 1996; 16: 2233-6

**Wu X**, Shi H, Jiang H, Kemp B, Hong WK, Delclos GL, Spitz MR. Associations between

cytochrome P4502E1 genotype, mutagen sensitivity, cigarette smoking and susceptibility to lung cancer. *Carcinogenesis* 1997; 18(5): 967-73

**Wyshak G**, Frisch RE. Breast cancer among former college athletes compared to non-athletes: a 15-year follow-up. *Br J Cancer* 2000; 82: 726-730

**Zbinden G**. The three eras of research in experimental toxicology. *TIPS* 1992; 13: 221-223

**Zeeb H**, Razum O, Blettner M, Stegmaier C. Transition in cancer patterns among Turks residing in Germany. *Eur J Cancer* 2002; 38: 705-711

**Zheng W**, Gustafson DR, Sinha R, Cerhan JR, Moore D, Hong CP, Anderson KE, Kushi LH, Sellers TA, Folsom AR. Well-done meat intake and the risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 1724-1729

**Zheng W**, Wen WQ, Gustafson DR, Gross m, Cerhan JR, Folsom AR. GSTM1 and GSST1 polymorphisms and postmenopausal breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat* 2002; 74: 9-16

## **Danksagung:**

Herrn Prof. Dr. Vetter spreche ich meinen Dank aus für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit in der Medizinischen Universitäts-Poliklinik sowie für die dort vorgefundenen guten Arbeitsbedingungen.

Besonderen Dank möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Ko aussprechen, der mich an das Thema der Arbeit herangeführt hat und mich bei der Erstellung dieser Arbeit stets unterstützte.

Insbesondere erwähnen möchte ich Herrn Dr. Volker Harth und Herrn Christian Baisch sowie Frau Dr. Beate Pesch und Frau Sylvia Rabstein, die mir bei der Interviewdurchführung, Literatursauswahl und der statistischen Auswertung mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ebenfalls danken möchte ich Frau Silke Schöneborn und Herrn Dr. Viktor Janzen sowie allen übrigen Mitarbeitern der wissenschaftlichen Abteilung für die freundliche Arbeitsatmosphäre im Labor und für die geduldige Einführung in die Methodik der Arbeit.

Meiner Familie und meinen Freunden bin ich dankbar für ihr Interesse und ihre unermüdliche Unterstützung.