

Diplomarbeit

**Studie zur Überprüfung der
Matrix-Metalloproteinasen 1-Genotypen
bei metastasierten / nicht metastasierten
Mammakarzinom Patientinnen**

eingereicht von

Katharina Hirschmann

Mat.Nr.: 0312578

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktorin der gesamten Heilkunde
(Dr. med. univ.)**

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Medizinischen Abteilung, LKH Fürstenfeld

unter der Anleitung von

Univ.-Doz. Prim. Dr. Peter Krippel

Univ.-Doz. Dr. Wilfried Renner

Graz, am 23|01|2010

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwende habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 23|01|2010

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die bei der Entstehung dieser Arbeit beteiligt waren.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Univ.-Doz. Prim. Dr. Peter Krippel für die ausgezeichnete Betreuung meiner Diplomarbeit. Er stand mir stets mit seinem hervorragenden Fachwissen, kreativen Anregungen, und Ratschlägen zur Seite und hat mich bei Problemen und Fragen jeglicher Art exzellent unterstützt.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Univ.-Doz. Dr. Wilfried Renner für seine Unterstützung bedanken, vor allem für die Hilfe der statistischen Auswertung und Bereitstellung der Daten.

Des Weiteren gilt mein Dank meiner Familie. Besonders dankbar bin ich meiner Mutter Monika Hirschmann, für die großzügige Unterstützung in jeglicher Hinsicht während meines gesamten Studiums, ohne ihre Hilfe meine Ausbildung in dieser Form wohl nicht möglich gewesen wäre.

Für eine unvergessliche und wunderschöne Studienzeit danke ich all meinen Freunden und meiner Schwester Julia, die mich durch diese Zeit begleitet haben und die maßgeblich daran beteiligt sind, dass mir meine Studienzeit für immer in schöner Erinnerung bleiben wird.

Glossar und Abkürzungen

AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
APC	anaphase promoting complex
ARF	apoptosis-released factor
AT	Ataxia teleangiectatica
BAX	B cell leukemia/lymphoma-2 associated X protein
Bcl	B cell leukemia/lymphoma
BMI	body-mass-index
BRCA	breast cancer gene
BUB	budding uninhibited by benzimidazole
CCD-Kamera	charge-coupled-device-Kamera
Cdc	cell division cycle
Cdk	cyclin-dependent kinase
c-erbB-2	cellular avian erythroblastosis homologue B2
CIS	carcinoma in situ
DCIS	Ductales carcinoma in situ
DNA	deoxyribonucleic acid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EGFR	Epidermal-Growth-Factor-Rezeptor
EZM	Extrazelluläre Matrix
FAS	fibroblast-associated
GDR	German Democratic Republic
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis-C-Virus
Her-2/neu	human epidermal growth factor receptor
HHV	Humanes Herpesvirus
HPV	Humane Papillomviren
kB	Kilobase
LCIS	lobuläres carcinoma in situ
MAD2	mitotic arrest defective

MMAC1	mutated in multiple advanced cancers 1
MMP	Matrix-Metallo-Proteinasen
NSW	New South Wales
OR	Odds Ratio
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGFR	platelet-derived growth factor receptor
pRB	Retinoblastomaprotein
pTEN	phosphatase and tensin homolog deleted on chromo some
ras	rat sarcoma
RET	rearranged transforming, Protoonkogen
RNA	ribonucleic acid
RR	Relatives Risiko
SEER	Surveillance Epidemiology and End Results
SNPs	single nucleotide polymorphism
SPSS	standardised mortality for breast cancer in different countries
src-TK	sarcoma tyrosinkinase
TNF	Tumornekrosefaktor
TIMPs	tissue inhibitors of metalloproteinases
TNM	Tumor, Nodes, Metastasen
TP 53	Tumor Protein 53
u.a	unter anderem
USA	United States of Amerika
UK	United Kingdom
WHI	women´s health initiative
WHO	world health organisation
z. T.	zum Teil

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	10
1.1	Mammakarzinom	10
1.1.1	Definition	10
1.1.2	Klassifikation	10
1.1.3	Lokalisation	12
1.1.4	Epidemiologie	12
1.1.4.1	Prävalenz	12
1.1.4.2	Inzidenz und Mortalität	12
1.1.5	Ätiologie und Risikofaktoren	15
1.1.5.1	Höheres Lebensalter	16
1.1.5.2	Größe	16
1.1.5.3	Ethnische und peristatische Faktoren	16
1.1.5.4	Westliche Lebensweise	17
1.1.5.5	Familiäre Dispositon und genetische Faktoren	18
1.1.5.6	Strahlenexposition	19
1.1.5.7	Hormonelle Faktoren	20
1.1.5.8	Atypische Hyperplasie	24
1.1.5.9	Brustdichte in der Mammographie	24
1.1.5.10	Positive Auswirkung	24
1.1.5.11	Rauchen	25
1.2	Prinzipien der Tumorbologie	26
1.2.1	Einführung	26
1.2.1.1	Typen der genetischen Veränderungen	27
1.2.2	Zellproliferation, Zellzyklus und Apoptose	28
1.2.2.1	Zellzyklus	29
1.2.2.2	Apoptose	32
1.2.3	Onkogene und Tumorsuppressorgene	35
1.2.3.1	Onkogene und Protoonkogene	35

1.2.3.2	Tumorsuppressorgene	38
1.2.4	Virusätiologie	39
1.2.4.1	Humane Papillomviren und Cervixkarzinom	40
1.2.4.2	Hepatitis-B-Virus und Hepatozelluläreskarzinom.....	40
1.2.4.3	Epstein-Barr-Virus und Burkittlymphom.....	40
1.2.4.4	Humanes Herpesvirus 8 und Kaposisarkom	41
1.3	Genetische Polymorphismen	41
1.3.1	Was sind Genpolymorphismen und SNIPS?.....	44
1.4	Matrix-Metallo-Proteinase.....	46
1.5	Studienziele.....	49
2	METHODEN	50
2.1	Beschreibung der verwendeten Untersuchungsmethoden	50
2.1.1	Polymerasekettenreaktion.....	50
2.1.1.1	PCR Grundlagen und Verfahren.....	50
2.1.1.2	Ablauf	51
2.2	Studienpopulation	54
2.2.1	Beschreibung der verwendeten Methoden in dieser Studie	54
2.2.2	Statistische Methoden.....	55
3	ERGEBNISSE	56
3.1	MMP1 Genotypen und Allelfrequenzverteilungen	56
3.1.1	MMP1 Genotypenverteilung: Entstehungsrisiko	56
3.1.2	MMP1 Genotypen: Metastasierungsrisiko.....	57
3.1.3	Tumorcharakteristika.....	60
4	DISKUSSION	61
5	LEBENS LAUF	64

6	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	68
7	TABELLENVERZEICHNIS	71
8	LITERATURLISTE	72

Zusammenfassung

Einleitung: Brustkrebs als häufigste maligne Tumorerkrankung der Frau, ist multifaktoriell bedingt. Einer der wichtigsten Prozesse in der Karzinogenese sowie im Tumorwachstum stellt die Fähigkeit der Gewebeeinfiltration dar. Diese wiederum wird entscheidend von Matrix-Metallo-Proteinasen (MMP) beeinflusst. Zwischen der Aggressivität eines Tumors und seiner Expression an MMPs besteht eine positive Korrelation. Einige Mitglieder dieser MMP-Familie sind bei Mammakarzinomen in hohem Ausmaß überexprimiert. Zu ihnen gehört auch die interstitielle Kollagenase (MMP-1). Genetische Polymorphismen in den MMP Genen spielen eine wichtige Rolle für die MMP Expression. Ziel dieser Studie ist es daher einen Genpolymorphismus im MMP-1 Gen als möglichen Risikofaktor für Brustkrebs bzw. als Modulator der Tumorprogredienz zu untersuchen.

Methoden: Zwischen Jänner und Juli 2002, wurden 500 prävalente Patientinnen mit histologisch verifizierten Mammakarzinom an der Klinischen Abteilung für Onkologie, der Medizinischen Universitätsklinik Graz in die Studie eingebracht. Für jede dieser Patientinnen, ohne synchrone und/oder metachrone maligne Zweitneoplasie konnte eine gesunde, altersgleiche (± 1 Jahr) Probandin aus zwei populationsbasierten Screeningprogrammen rekrutiert werden. Zur Bestimmung der MMP Genotypen wurde aus Vollblut genomische DNA isoliert. Die Bereiche mit den Polymorphismen wurden mittels PCR vervielfältigt und anschließend mit spezifischen Restriktionsendonukleasen geschnitten. Die Schnittprodukte wurden auf einem Agarose-Gel aufgetrennt, durch eine CCD-Kamera dokumentiert und ausgewertet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels SPSS.

Ergebnisse: Die Patientinnen waren bei Diagnosestellung im Alter zwischen 28 und 84 Jahren, wobei das Durchschnittsalter 57 ± 11 Jahre betrug. Die MMP-1 Genotypen konnten bei den Patientinnen in 499 sowie bei den Kontrollen in 482 Fällen bestimmt werden. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied in den Verteilungen der einzelnen MMP Genotypen 2G/2G, 1G/2G, 1G/1G zwischen den Patientinnen (25.3, 51.9, 22.8%) und den Kontrollen (25.1, 50.0, 24.9%, $p=0,738$). Auch konnte kein statistisch signifikanter Unterschied in Bezug auf die Tumorcharakteristika (Tumorgröße und -grading, primäre Lymphknoten-

beteiligung, Hormonrezeptorexpression und dem Patientenalter bei Erstdiagnose) sowie in der Metastasierungswahrscheinlichkeit aufgezeigt werden.

Schlussfolgerung: Dieser von uns untersuchte MMP-1 Genpolymorphismus stellt keinen generellen Risikofaktor für die Entstehung beziehungsweise Metastasierung von Brustkrebs dar.

Abstract

Introduction: The matrix metalloproteinase 1 (MMP-1), also known as interstitial collagenase is a key-player for carcinogenesis and tumour growth. A gene polymorphism is associated with differences in MMP-1 activity and has been linked to cancer susceptibility in some studies. In the present study we evaluated the role of this polymorphism for breast cancer risk and the risk for metastases.

Methods: MMP-1 genotype (1607 1G/2G) was determined in 500 women with breast cancer and 500 sex- and age-matched healthy control subjects.

Results: MMP-1 genotype frequencies were similar among patients and controls. The MMP genotype was furthermore not associated with tumour characteristics and the risk for metastases.

Conclusion: The MMP-1 gene polymorphism does not appear to influence breast cancer susceptibility and the risk for metastasizing among breast cancer patients.

1 Einleitung

1.1 Mammakarzinom

1.1.1 Definition

Als Mammakarzinom bezeichnet man einen malignen epithelialen Tumor des Brustdrüsenparenchyms. Die maligne Entartung kann sowohl von den Drüsengängen als auch von den Läppchen der Brust ausgehen.¹



1.1.2 Klassifikation

Mammakarzinome werden laut World Health Organisation (WHO) in 2 histologische Gruppen eingeteilt:

- Invasive Karzinome (Tumore, die in das umliegende nicht-neoplastische Gewebe einwachsen oder einen Gefäßeinbruch verursachen)
- Nichtinvasive Karzinome, sog. Carcinoma in situ (Läsion infiltriert nicht in die Umgebung)



Abb. 1 Mammakarzinomklassifikation

Weiters können diese in ductale und lobuläre Karzinome eingeteilt werden.²⁻⁵

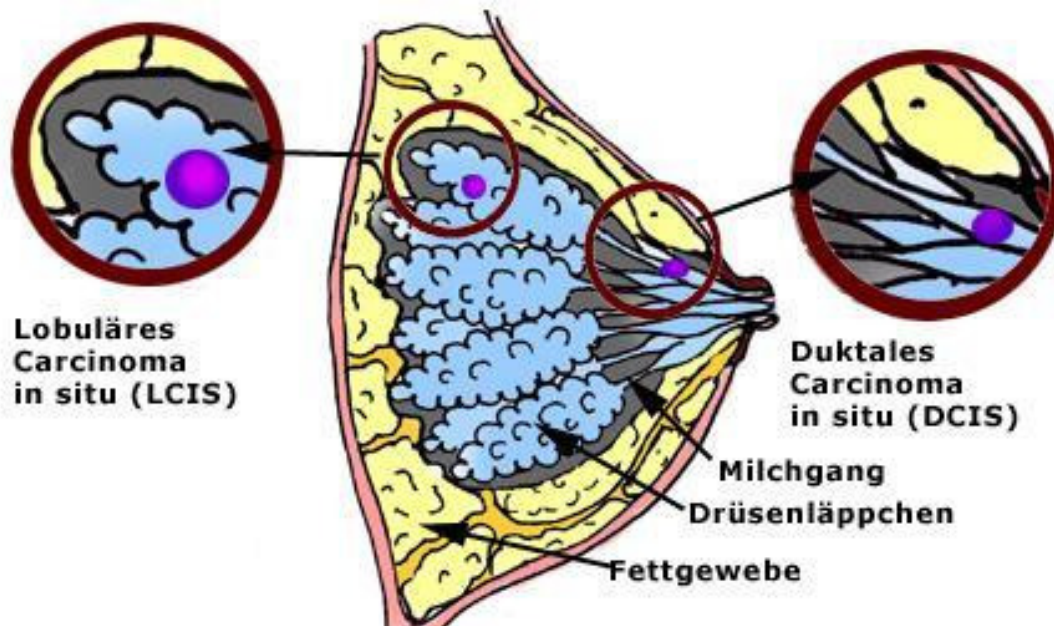


Abb. 2 Nichtinvasive Karzinome

Histologische Einteilung der Mammakarzinome	
Typ	Häufigkeit
invasive Karzinome	80-85%
• invasiv-duktales	>70%
• invasiv-lobuläres	10%
• Sonderformen	<5%
u.a. tubulär, muzinös, szirrhös, medullär	
nicht invasive Karzinome (CIS)	15-20%
• duktales	ca. 95% aller CIS
• lobuläres	ca. 5% aller CIS
CIS = Carcinoma in situ	

Tab. 1 Histologische Einteilung der Mammakarzinome

1.1.3 Lokalisation

Der größte Teil der Mammakarzinome (50%) entsteht im äußeren oberen Quadranten, 20% im Mamillenbereich und 10% findet man in den restlichen Quadranten.¹

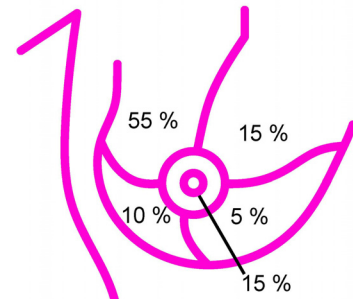


Abb. 3 Lokalisationshäufigkeit

1.1.4 Epidemiologie

1.1.4.1 Prävalenz

Das Mammakarzinom ist weltweit mit 23% aller Karzinome die häufigste maligne Tumorerkrankung der Frau, wobei es einen Unterschied zwischen der westlichen Welt und den Entwicklungsländern gibt, zugunsten der letzteren.⁶⁻⁹

In den sogenannten „more developed countries“ erkrankt ca. jede 9. Frau im Laufe ihres Lebens an diesem Tumor.⁷ Am häufigsten entwickeln sich Mammakarzinome im 5. und 6. Lebensjahrzehnt.¹

1.1.4.2 Inzidenz und Mortalität

Die Neuerkrankungsrate pro Jahr des Mammakarzinoms liegt bei 70-80 pro 100000 Frauen.¹ In den Industrieländern ist das Mammakarzinom bei Frauen die häufigste Todesursache aller malignen Erkrankungen. Die größte altersstandardisierte Inzidenz ist 99,4 pro 100,000 in Nordamerika, die niedrigste Inzidenz ist in Zentralafrika mit 16,5 pro 100,000. 2002 werden geschätzt 1.15 Millionen neue Fälle diagnostiziert, davon 361.000 in Europa (27,3% der Krebserkrankungen bei Frauen) und 230.000 in Nordamerika (31,3%).⁶

Obwohl die Inzidenz seit 1983 steigt, ist die Mortalität rückläufig, was auf das häufigere Screeningverfahren zurückgeführt wird, das in der Frühdiagnostik eine wichtige Rolle spielt.¹⁰ (Abb.4) Das Mammakarzinom ist die häufigste Todesursache bei Frauen zwischen 40 und 55 Jahren.¹¹

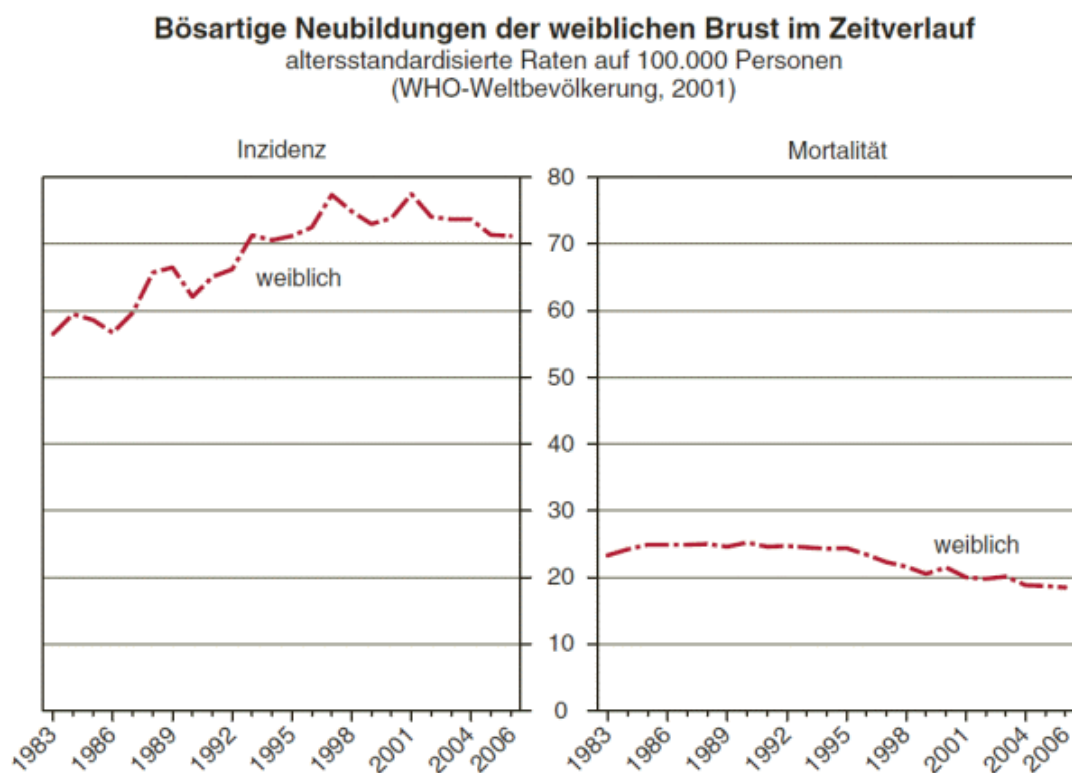


Abb. 4 Bösartige Neubildungen der weiblichen Brust im Zeitverlauf

Den Vorteil nicht an einem Mammakarzinom zu erkranken scheinen Frauen in Südeuropa zu haben, da hier die Inzidenz- und Mortalitätsraten deutlich geringer sind als in Nordeuropa. Studien haben gezeigt, dass Auswanderer von Japan nach Hawaii, die Brustkrebsrate des Gastlandes innerhalb von 1 oder 2 Generationen annehmen und somit Umweltfaktoren eine größere Rolle spielen als genetische.¹² Interessanterweise ist die Inzidenz in Japan sehr niedrig, trotz des hohen Industrialisierungsgrades.¹³

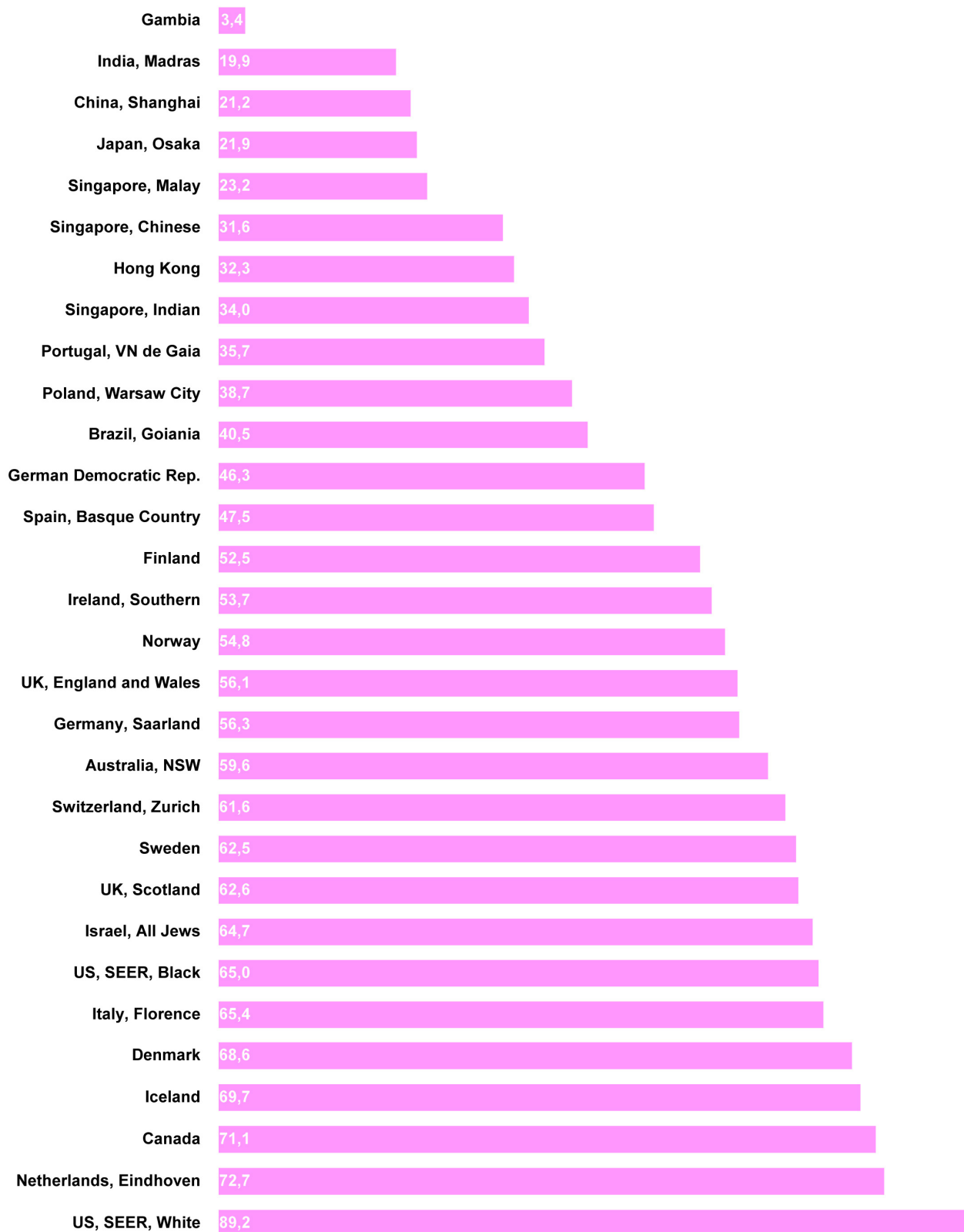


Abb. 5 Standardisierte Mortalität für Brustkrebs in verschiedenen Ländern

1.1.5 Ätiologie und Risikofaktoren

So wie bei vielen anderen Karzinomen ist die Entstehung vom Mamma-
karzinom multifaktoriell, endogene und exogene Faktoren erhöhen das Risiko.^{14, 15}

Es gibt eine Reihe von Einflussfaktoren, die die Entstehung eines Mamma-
karzinoms begünstigen und somit die Wahrscheinlichkeit erhöhen. Man kann sie
in allgemeine und determinierende Risikofaktoren einteilen.

Established and probable risk factors for breast cancer

Factor	RR	High risk group
Age	>10	Elderly
Geographical location	5	Developed country
Age at menarche	3	Menarche before age 11
Age at menopause	2	Menopause after age 54
Age at first full pregnancy	3	First child in early 40s
Family history	≥2	Breast cancer in first degree relative when young
Previous benign disease	4-5	Atypical hyperplasia
Cancer in other breast	>4	
Socioeconomic group	2	Groups I and II
Diet	1.5	High intake of saturated fat
Body weight:		
• Premenopausal	0.7	Body mass index >35
• postmenopausal	2	Body mass index >35
Alcohol consumption	1.3	Excessive intake
Exposure to ionising radiation	3	Abnormal exposure in young females after age 10
Taking exogenous hormones:		
• Oral contraceptives	1.24	Current use
• Hormone replacement therapy	1.35	Use for ≥10 years
Diethylstilbestrol	2	Use during pregnancy

Tab. 2 Mammakarzinomrisikofaktoren

1.1.5.1 Höheres Lebensalter

Das Alter ist der Hauptrisikofaktor für die Mammakarzinomentstehung.⁹ Die Inzidenz der Erkrankung steigt kontinuierlich vom 29. bis circa 50. Lebensjahr; nach der Menopause nimmt sie in den USA und Nordeuropa weiter bis zum 75. Lebensjahr zu, während es in Japan nach dem 45. Lebensjahr zu einer langsamen Abnahme der Inzidenz kommt.¹³

Mit zunehmendem Alter steigt auch die Neuerkrankungsrate an und verdoppelt sich in etwa alle 10 Jahre bis zur Menopause.¹²

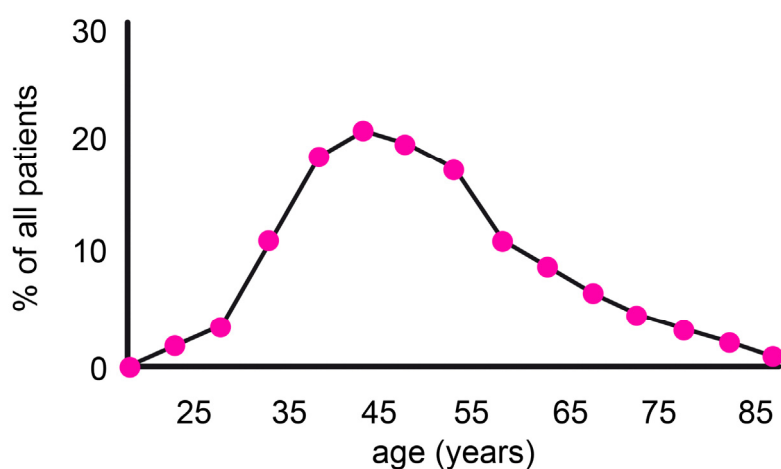


Abb. 6 Prozentualer Anteil aller Todesfälle von Brustkrebspatientinnen

1.1.5.2 Größe

Kleine Frauen haben eine geringere Wahrscheinlichkeit an Brustkrebs zu erkranken als Frauen mit einer Größe $>1,67\text{m}$, weil die Körpergröße und rasches Wachstum parallel mit dem Eintreten der Menarche einhergehen.⁷

1.1.5.3 Ethnische und peristatische Faktoren

Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass weiße Frauen Nordamerikas, Nord- und Mitteleuropas ca. 5mal häufiger ein Mammakarzinom bekommen, als in Südamerika und Asien. Angehörige höherer sozialer Schichten erkranken häufiger als Mitglieder aus der ärmeren Bevölkerung.⁷

1.1.5.4 Westliche Lebensweise

1.1.5.4.1 Adipositas und hoher Body-Mass-Index

Es besteht ein großer Zusammenhang zwischen Gewicht und Brustkrebsrisiko, das vom Alter der Frau abhängig ist. Für 50-jährige Frauen ist das Risiko nur minimal, hingegen haben Frauen über 60 Jahre, bei einer Gewichtszunahme von 10kg eine 80%-ige Steigerung des Brustkrebsrisikos.¹⁶

In einer prospektiven Studie von Calle et al. an über 900.000 Männern und Frauen wurde der Einfluss von Körpergewicht und Krebsinzidenz analysiert.¹⁷ Es stellte sich für das Mammakarzinom heraus, dass es mit steigendem BMI, zu einem signifikanten Anstieg von Inzidenz und Mortalität kommt.

Gewichtszunahme steigert das Risiko eines postmenopausalen Mammakarzinoms.¹⁸ Das relative Risiko von Übergewicht vor allem in der Postmenopause beträgt 1,2.¹⁹ Es wurde berechnet, dass circa 10-16% aller Mammakarzinome bei postmenopausalen Frauen auf Adipositas und Gewichtszunahme zurückzuführen sind.²⁰

1.1.5.4.2 Alkoholkonsum

Viele Studien beschreiben eine positive Korrelation zwischen Alkoholkonsum und Brustkrebsrisiko.^{21, 22} Es besteht ein linearer Anstieg der Mammakarzinominzidenz, abhängig von der täglich konsumierten Alkoholmenge.²³ Die Risikoerhöhung von nur moderatem Alkoholkonsum konnte nachgewiesen werden.^{24, 25}

Eine große Metaanalyse beschrieb ein relatives Risiko von 1,1 bei einem Getränk pro Tag, ein relatives Risiko von 1,2 bei 2 Getränken und ein relatives Risiko von 1,4 bei 3 Getränken pro Tag.²⁵ Zusätzliche Daten von prospektiven Studien bestätigen diesen Anstieg.²⁶ Der Effekt von Alkoholkonsum, der eine Erhöhung des Östrogenspiegels verursacht²⁷, kann durch Einnahme von Folsäure vermindert werden.²⁸

Weiters konnte gezeigt werden, dass postmenopausale Frauen, die einen höheren Alkoholkonsum und einen Mangel an Folsäure haben, das Risiko für die Entwicklung Östrogen-Rezeptor-negativer Tumoren gesteigert ist.²³

In mehreren Studien konnte nachgewiesen werden, dass Alkohol entweder indirekt Einfluss auf die Karzinomentstehung nehmen kann, durch seinen ersten Metaboliten Acetaldehyd, ein bekanntes Karzinogen und Mutagen, oder er kann ein Tumorpromoter sein, der zu gesteigerter prokarzinogener Aktivität führt.^{29, 30}

Es wird geschätzt, dass circa 2% aller Mammakarzinome in den USA³¹ und bis zu 15% in Italien²⁰ auf Alkoholkonsum zurückzuführen sind.

Es scheint weiters einen Zusammenhang zu geben, zwischen Brustkrebsrisiko und Ernährung. Man nimmt an, dass das Brustkrebsrisiko steigt, bei Mangel an Früchten und Gemüse.^{32, 33}

1.1.5.5 Familiäre Dispositon und genetische Faktoren

Bei 10% der Mammakarzinome in den westlichen Ländern liegt eine genetische Prädisposition vor.^{7, 12, 34} Es wurden, wie bei vielen anderen Tumoren auch, bei Brustkrebs Dysfunktionen und Mutationen von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen gefunden, die zu einem Teil an der Entstehung der Mammakarzinome beteiligt sind. Von den Onkogenen ist die Amplifikation des HER-2/neu (Synonyme: c-erbB-2, p185) und des Epidermal-Growth-Factor-Rezeptor-Gens (EGFR; Synonym: erbB-1) und von den Tumorsuppressorgenen Mutationen von p53, BRCA-1, BRCA-2, AT (Ataxia teleangiectatica) und pTEN/MMAC1 relevant.^{7, 35, 36} Allerdings lässt sich der Großteil der hereditären Mammakarzinome durch die vererbten Mutationen im BRCA-1 und BRCA-2 Gen erklären.³⁷ Die Mutationen in einem oder beiden dieser Gene sind auch für weitere Tumorerkrankungen verantwortlich wie z.B. für das Prostatakarzinom, das maligne Melanom und das Pankreaskarzinom.³⁸⁻⁴⁰

BRCA-1 und BRCA-2 sind zwei Brustkrebsgene, die auf dem langen Arm von Chromosom 17 und 13 lokalisiert sind, auf die 50% der genetisch prä-determinierten Brustkrebsfälle zurückgehen.¹² Die Mutationen erstrecken sich bei beiden über das gesamte Gen.⁴¹ Bei Existenz einer BRCA-1 Mutation, steigt die Wahrscheinlichkeit, bis zum 70. Lebensjahr einen Brustkrebs zu entwickeln, von

7,3% (Normalbevölkerung) auf circa 87% (BRCA-1-Mutationsträgerinnen).⁴² Es wird geschätzt, dass eine von 800 Frauen BRCA-1-Mutation-Trägerin ist.⁴³ Frauen mit einer Mutation im BRCA-1 Gen haben auch eine höhere Wahrscheinlichkeit vor dem 50. Lebensjahr einen Brustkrebs zu entwickeln.⁴⁴ Das BRCA-1 Gen wurde von Miki⁴⁵ 1994 identifiziert und das BRCA-2 Gen 1995 von Wooster⁴⁶. Sie sind Tumorsuppressorgene, die für Stabilität und Reparatur der DNS mitverantwortlich sind.⁴⁷ Findet eine Mutation im BRCA-1 und BRCA-2 Gen statt, führt das zu fehlerhaften Reparaturvorgängen von DNA-Doppelstrangbrüchen, die beispielsweise durch ionisierende Strahlen hervorgerufen werden.⁴⁸ Frauen mit BRCA-1 und BRCA-2 Keimbahnmutationen haben ein deutlich höheres Risiko an Brust- und Ovarialkrebs zu erkranken, verglichen mit der Normalbevölkerung.^{49, 50} Hartmann et al.⁵¹ untersuchten die Wirksamkeit der bilateralen prophylaktischen Mastektomie in einer retrospektiven Kohortenstudie mit 639 Mittel- bis Hochrisiko Frauen, die eine bilaterale prophylaktische Mastektomie in der Mayo Klinik zwischen 1960 und 1993 erhalten haben. Daten dieser Studie ergaben einen Vorteil der prophylaktischen Mastektomie, da sie mit einer 90%igen Reduktion von Brustkrebsinzidenz und –mortalität einhergeht. Im Nachhinein konnte nachgewiesen werden, dass 18 Frauen BRCA-1/-2 Mutationsträgerinnen waren.⁵²

Das Li-Fraumeni Syndrom ist eine seltene Erkrankung, bei dem Kinder anfällig für Gehirntumore und Nebennierenkarzinome sind. Dieses Syndrom ist assoziiert mit dem hohen Risiko einer Entstehung eines Mammakarzinoms bei jungen Frauen.⁵³ Keimbahnmutationen im Tumorsuppressorgen p53 wurde bei Patienten mit Li-Fraumeni Syndrom entdeckt.⁵³⁻⁵⁵ In einer Studie von Coles et al. konnte nachgewiesen werden, dass bei 40% der Mammatumore eine p53 Mutation vorliegt.⁵⁵

1.1.5.6 Strahlenexposition

Die Einwirkung von ionisierender Strahlung auf die Brustdrüse ist ein bekannter Risikofaktor.^{9, 56}

Es konnte nachgewiesen werden, dass strahlenexponierte Frauen, wie z.B. durch häufige Durchleuchtungen bei Lungentuberkulose oder nach den

Atombombenabwürfen auf Hiroshima, signifikant häufiger an einem Mammakarzinom erkrankten.⁷

In Studien an der Bevölkerung, die die Atombombenexplosionen von Hiroshima und Nagasaki überlebt haben, konnte gezeigt werden, dass sich bei der Strahlenbelastung die Beziehung zwischen Alter und Risiko invers verhält. Weiters ist das Risiko dosisabhängig und neigt dazu, mit der Zeit stufenweise abzunehmen.⁵⁷

Ein besonders hohes Risiko haben Frauen, die vor dem 15. Lebensjahr aufgrund eines Hodgkin Lymphoms bestrahlt werden.^{58, 59}

1.1.5.7 Hormonelle Faktoren

Die Korrelation zwischen Östrogenen und Brustkrebs ist schon lange bekannt. Östrogene begünstigen das Wachstum und die Progression von Tumorzellen in vitro. Frauen, die einer längeren Östrogenexposition ausgesetzt sind, wie z.B. durch frühere Menarche und spätere Menopause, haben ein erhöhtes Brustkrebsrisiko.⁶⁰

Man unterscheidet exogene und endogene Hormone.

1.1.5.7.1 Endogene Hormone

Epidemiologische Studien haben eine Zahl von Brustkrebsrisikofaktoren kenntlich gemacht, die durch einen höheren endogenen Östrogenspiegel zustande kommen.⁶¹⁻⁶³ Zu diesen Faktoren, die das Krebsrisiko erhöhen, zählen z. B. frühe Menarche, Nullipara, späte Erstgebärende und späte Menopause.^{62, 63}

Adipositas⁶⁴ und postmenopausale Hormontherapie,⁶⁵ bei postmenopausalen Frauen haben beide eine positive Korrelation mit den Plasmaöstrogen- und -östradiolspiegeln.^{66, 67}

1.1.5.7.1.1 Zeitpunkt Menarche / Menopause

Das frühe Einsetzen der 1. Regelblutung⁶⁸ vor dem 12. Lebensjahr und die letzte Menstruation nach dem 55. Lebensjahr ist dafür verantwortlich, dass durch die längere Dauer der natürlichen Östrogenproduktion^{69, 70} das Krebsrisiko auf das 1,3 bis 2-fache ansteigt.¹² Das relative Risiko einer Frau, die mit 45 Jahren in die Menopause kommt, hat das halbe Risiko für die Entstehung eines Brustkrebs verglichen mit einer Frau, die ihre Menopause erst mit 55 Jahren bekommt.⁷¹

Der frühe Beginn der Menarche ist assoziiert mit einem gesteigerten Brustkrebsrisiko von 10-20%.⁷² Das Risiko für die Mammakarzinomentstehung sinkt mit jedem Jahr verspätet eintretender Menarche um 20%.⁷³

1.1.5.7.1.2 Nullipara / späte Erstgebärende

Beides erhöht die Inzidenz von Brustkrebs. Nullipara haben ein ca. 1,4-fach höheres relatives Risiko.⁷⁴ Eine 30-jährige Erstgebärende hat ein 2mal so hohes Risiko als eine 20-jährige Erstgebärende. Das größte Risiko hat eine Frau, die ihr erstes Kind nach dem 35. Lebensjahr auf die Welt bringt.¹²

Da die Auswirkung einer Schwangerschaft einen Effekt auf die Differenzierung der Brustdrüsenzelle hat, ist eine frühe Schwangerschaft protektiv.^{75, 76}

Ergebnisse von Studien bei Frauen mit BRCA-1 Mutationen empfehlen eine frühe Oophorektomie zur Verhinderung einer Brustkrebsentstehung.⁷⁷

1.1.5.7.2 Exogene Hormone

Die Effekte von exogenen Hormonen, wie Hormonersatztherapie und orale Kontrazeptiva wurden ausgiebig untersucht.

1.1.5.7.2.1 Hormonersatztherapie

Metaanalysen vom Effekt der Hormonersatztherapie beweisen eine kleine, aber statistisch signifikante Erhöhung des Risikos.^{65, 78, 79} Eine Kombination von Östrogenen und Gestagenen hat ein statistisch signifikantes höheres Risiko als die alleinige Einnahme von Östrogen.^{80, 81} In der WHI Östrogen-plus-Progestin-Studie konnte gezeigt werden, dass das Risiko an einem invasiven Brustkrebs zu erkranken, unter der Einnahme von Östrogen und Progestin gesteigert ist. Nach einem Follow-up von 5 Jahren, zeigte sich bei Frauen, die diese Hormonersatztherapie eingenommen hatten, dass sie ein um 24% höheres Risiko hatten, an Brustkrebs zu erkranken, verglichen mit der Placebogruppe.⁸²

Das Risiko wird nach Beendigung der Hormonersatztherapie wieder verringert und nach 5 Jahren kann es verschwunden sein.⁸³

1.1.5.7.2.2 Kontrazeptiva

Die Einnahme von Kontrazeptiva ist für das Brustkrebsrisiko unbedeutend.^{84, 85} Das relative Risiko liegt, in einer Analyse von 54 Studien bei 1,24.⁸⁶ In manchen Studien wird ein kleines Risiko für Frauen beschrieben, die jünger als 35 Jahre sind und orale Kontrazeptiva einnehmen, abhängig von der Dauer der Einnahme.^{84, 87}

Übersicht von hormonvermittelten Brustkrebsrisikofaktoren in der Tabelle 3.⁶⁰

Indicator	Risk Group		RR	Reference
	Low	High		
Sex	male	female	150.0	Hulka
Age (yr)	30-34	70-74	17.0	Madigan et al.
Age at menarche (yr)	>14	<12	1.5	Hulka
Age at birth of first child (yr)	<20	>30	1.9- 3.5	Hulka, Leon et al., Madigan et al., Ramon et al., Lambe et al.
Use of oral contraceptives	never	current	1.07- 1.2	Hulka, Ursin et al.,
Breast feeding (mo)	>16	0	1.37	Enger et al.
Parity	>5	0	1.4	Hulka, Madigan et al.
Age at oophorectomy (yr)	<35	-	3.0	Hulka
Age at natural menopause (yr)	<45	>55	2.0	Hulka
Estrogen therapy	never	current	1.2- 1.4	Hulka, Grodstein et al.
Estrogen-progestin therapy	never	current	1.4	Grodstein et al.
Postmenopausal body-mass-index	<22.9	>30.7	1.6	Hulka
Family history of breast cancer	no	yes	2.6	Madigan et al.
Serum estradiol concentration	l.q.	h.q.	1.8- 5.0	Toniolo et al., Thomas et al.
Breast density on mammography (%)	0	>75	6.0	Boyd et al.
Bone density	l.q.	h.q.	2.7- 3.5	Cauley et al., Zhang et al.

Tab. 3 Hormonvermittelte Indikatoren des Brustkrebsrisikos

1.1.5.8 Atypische Hyperplasie

In einer Studie von London et al.⁸⁸ konnte nachgewiesen werden, dass Frauen mit einer atypischen Hyperplasie ein deutlich erhöhtes Risiko für eine Mammakarzinomentwicklung haben.⁸⁹

1.1.5.9 Brustdichte in der Mammographie

Ebenfalls ein Risikofaktor ist eine hohe Brustdichte in der Mammographie.⁹⁰⁻⁹⁴ Die Dichte der Brust nimmt mit steigendem Alter, postmenopausalen Status, gesteigerter Geburtenzahl und sinkendem Körpergewicht, ab. Es wird angenommen, dass die Gewebeveränderungen, die für die Brustdichte verantwortlich sind, unter hormoneller Kontrolle stehen.^{95, 96}

Beide Studien von Byrne und Boyd kamen zu dem Ergebnis, dass ungefähr 10% der Frauen mit einer >75% hohen Brustdichte, ein 4-5 mal höheres Risiko haben, als Frauen mit keiner erhöhten Brustdichte.^{92, 97, 98}

1.1.5.10 Positive Auswirkung

1.1.5.10.1 Stillen

Eine verlängerte Stillzeit soll sich protektiv gegenüber einer Brustkrebsentwicklung verhalten.⁹⁹ Für alle 12 Monate stillen, sinkt das RR um 4,3% außerdem nimmt es um 7% pro Geburt ab.¹⁰⁰

1.1.5.10.2 Körperliche Aktivität

Sport und körperliche Betätigung in der Freizeit oder während der Arbeit reduzieren das Brustkrebsrisiko.^{70, 101} In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass körperliche Aktivität einen günstigen Einfluss auf das Brustkrebsrisiko hat.^{102, 103} Dafür gibt es etliche Gründe wie z.B. eine Abnahme der Östrogenproduktion, eine Reduktion des Körpergewichts, Optimierung des Lipidstatus, Zunahme der Glukosemetabolisierung durch „Verlust“ der peripheren Insulinresistenz, Steigerung der Immunität sind nur ein paar, z.T. direkt mit dem

Insulinstoffwechsel verknüpfte Gesichtspunkte, die in der Mammakarzinomentstehung eine relevante Funktion haben können und Ausdauersport einen entscheidenden Einfluss auf diese Faktoren hat.¹⁰⁴

In Folge dessen konnte in etlichen Studien neben einer Abnahme des BMI, eine Senkung des relativen Risikos bis zu einem Faktor $RR=0,53$ nachgewiesen werden.^{101, 105-108}

Verschiedene Studien konnten auch die Brustkrebsrisikosenkung durch gesteigerte körperliche Aktivität bei postmenopausalen Frauen feststellen.¹⁰⁹⁻¹¹¹

1.1.5.11 Rauchen

Viele durchgeführte Studien konnten keine relevante Beziehung zwischen Rauchen und Brustkrebsrisiko feststellen.

Mehrere Studien haben gezeigt, dass Rauchen in jungen Jahren (vor dem 16. Lebensjahr) das Brustkrebsrisiko um circa 20% erhöht, abhängig von der Dauer des Zigarettenkonsums.¹¹²⁻¹¹⁴ Eine große Fall-Kontroll-Studie, die 17000 Brustkrebsfälle inkludiert hat, kam zu dem Ergebnis, dass postmenopausale Frauen, die vor dem 16. Lebensjahr zu Rauchen begonnen haben, das Risiko gering erhöht ist.¹¹³

Der Effekt von Passivrauchen wird noch immer diskutiert; manche Autoren berichten über eine positive Korrelation,¹¹⁵⁻¹¹⁷ während andere keinen Zusammenhang finden können.^{114, 118}

1.2 Prinzipien der Tumorbiologie

1.2.1 Einführung

Die Zellen aller Lebewesen liegen in einem präzise geregelten homöostatischen Gleichgewicht von Wachstum (Proliferation), Differenzierung (zelluläre Spezialisierung) und Zelltod (Apoptose bzw. Nekrose). Diese zellulären Erscheinungsformen basieren auf exakt definierten genetischen Anleitungen, die das Wachstumsverhalten von Zellen und den präzisen Prozess der Zellteilung (Zellzyklus) regeln. Solche genetischen Abläufe werden maßgeblich durch extrazelluläre Signale beeinflusst, die die Aktivität der Zelle festlegen. Fehlregulation der Genaktivität, durch DNS-Schädigungen (Mutationen), kann zu unkontrollierter Zellproliferation führen.¹¹⁹ Die Interaktion von genetischen Veränderungen, die die Zellproliferation aktivieren und die Apoptose unterdrücken, ist von entscheidender Relevanz für die Entstehung von Tumoren.¹²⁰

Die Verhinderung der Apoptose, wodurch das Überleben DNS-geschädigter Zellen erhöht wird, trägt zum karzinogenen Prozess bei.¹²¹

Auslöser jeder Tumorerkrankung sind Veränderungen im Erbmateriale der primären Tumorzelle (Mutationen oder Virusinfektionen).¹²²

Zum überwiegenden Teil erfolgen tumoraktivierende Mutationen in Somazellen, allerdings können auch vererbte genetische Defekte im Genom von Keimzellen eine erhebliche Prädisposition für das Tumorrisiko determinieren.^{123, 124}

1.2.1.1 Typen der genetischen Veränderungen

Man kann bei den genetischen Veränderungen von Tumorzellen einige Arten unterscheiden:¹²⁵

- Punktmutationen (Einzelbasenveränderung)

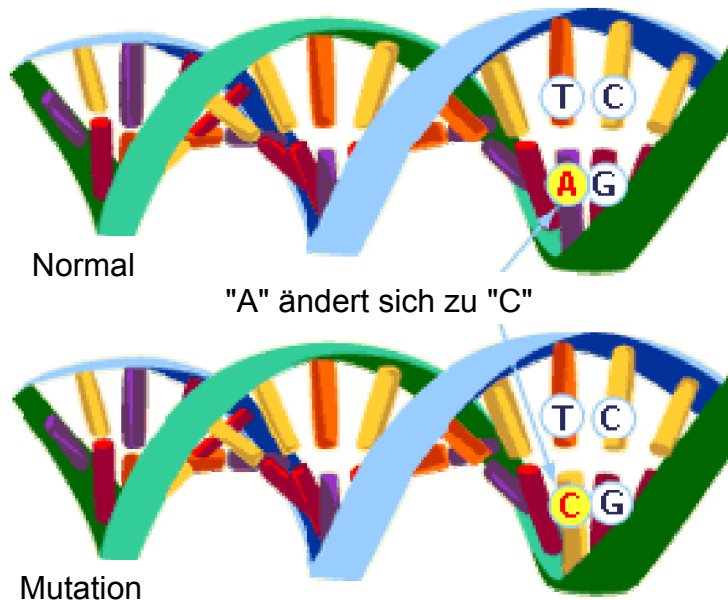


Abb. 7 Punktmutation

- Deletion (Verlust größerer DNS- Abschnitte)

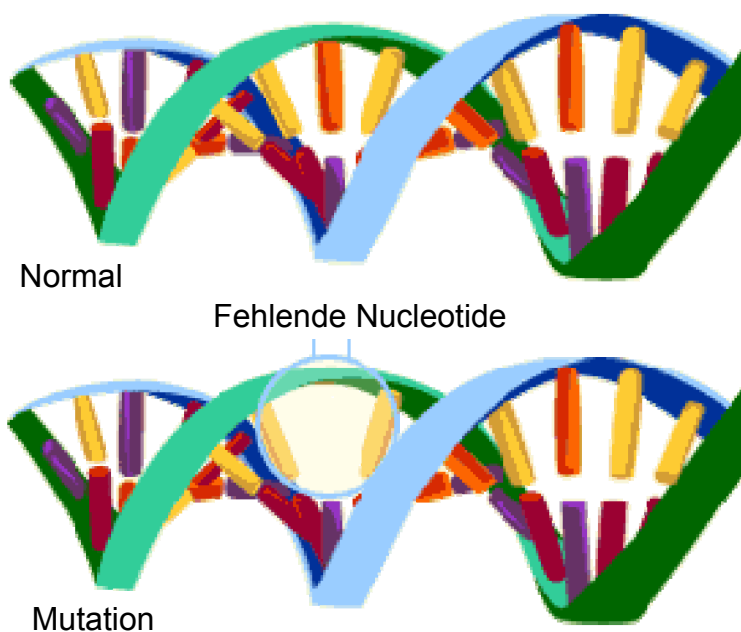


Abb. 8 Deletion

- Insertion (Integration von Fremd-DNS)

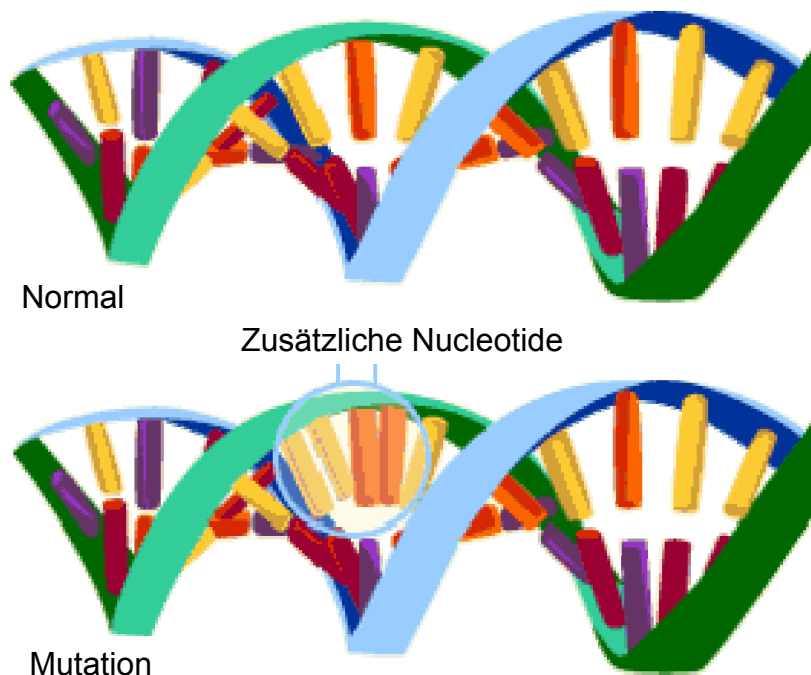


Abb. 9 Insertion

- Amplifikation (Vermehrung einzelner DNS-Teile)
- Rekombination (chromosomales Rearrangement) oder
- Viraler Befall

Diese genetischen Abänderungen können unterschiedliche Auswirkungen auf die Genaktivität und Proteinfunktion in einer Zelle haben, z.B. Beschädigung eines Gens oder kodierten Proteins, Herstellung eines funktionell veränderten Proteins oder Fehlregulation eines Gens und in Folge dessen Erzeugung einer unphysiologischen Anzahl des zugehörigen Proteins.¹¹⁹

1.2.2 Zellproliferation, Zellzyklus und Apoptose

Um das Gleichgewicht von Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose zu erhalten sind bestimmte Regulationsmechanismen notwendig, die im Zellzyklus wirksam werden und involvieren zum einen exogene Einflüsse (z.B. Wachstumsfaktoren) wie auch endogene Mechanismen (z.B. Zyklin/cdc Proteine, Kontrollpunktregulatoren)¹²⁶

1.2.2.1 Zellzyklus

1.2.2.1.1 Zellzyklusphasen

Der Zellzyklus kann in 5 verschiedene Stadien unterteilt werden.¹¹⁹

- G₁-Phase
- S-Phase
- G₂-Phase
- M-Phase
- G₀-Phase

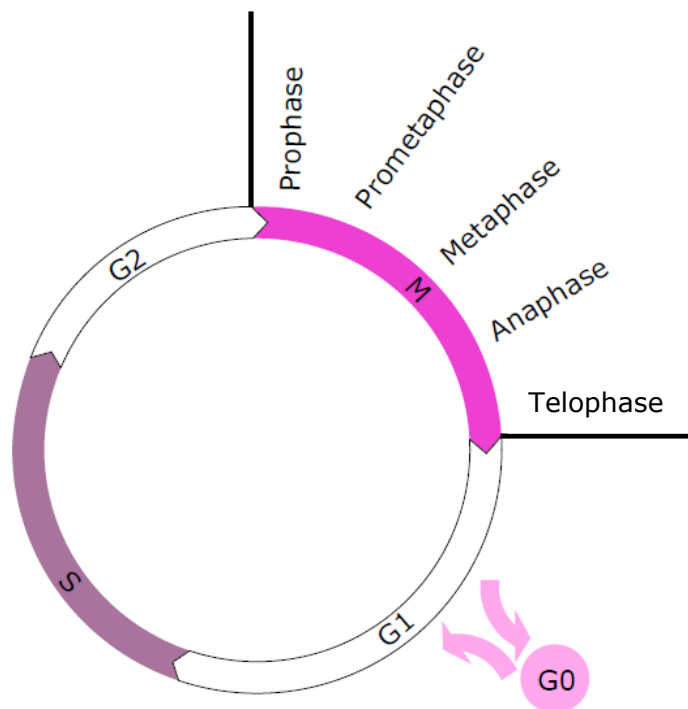


Abb. 10 Zellzyklus

G₁-Phase:

Das ist die Wachstumsphase der Zelle und dient der Vorbereitung der S-Phase.¹²⁷

S-Phase:

Hier erfolgt die Replikation (Verdopplung) der DNA.¹²⁷

G₂-Phase:

Es finden Kontrollmechanismen statt und die replizierte DNA wird geprüft, bevor sie in die Mitose übergeht.¹¹⁹

M-Phase:

Hier läuft die Kernteilung ab. Die beiden Tochterzellen verfügen aufgrund genauer Chromatidenverteilung über die gleiche genetische Information.¹²⁷

Sie besteht aus:¹²⁷

- Prophase
- Prometaphase
- Metaphase
- Anaphase
- Telophase
- Zytokinese

G₀-Phase:

Das ist die sogenannte Ruhephase. Hier befinden sich nicht-proliferierende Zellen, die somit den Zellzyklus nicht durchlaufen.¹¹⁹

Wird diese Rhythmusabfolge (S-M)_n gestört und unterbrochen, werden Zellen gebildet, die über eine veränderte genetische Information verfügen, mit modifizierten Proliferations- und/oder Apoptoseverhalten bis hin zu tumorösen Zellen.¹²⁸

1.2.2.1.2 Kontrolle des Zellzyklus

Das Zellwachstum wird durch extrazelluläre Signale gesteuert, die zum einen aktivierende als auch hemmende Effekte haben können und größtenteils auf die G₁-Phase einwirken.

Der Zellzyklus läuft unter strikter Kontrolle ab und Kontrollmechanismen sorgen dafür, dass die Erbinformation gleich, fehlerfrei und ungeschädigt an die Tochterzelle weitergegeben wird.

Mutationsbedingte Fehlsteuerung der Wachstumskontrolle und der Apoptose sind die primären Ursachen der Tumorentwicklung. Mutationen sind aus diesem Grunde tumorfördernd, wenn ein erhöhtes Proliferationspotential vorliegt und die gegensteuernde Wirkung des programmierten Zelltods durch die Apoptose^{129, 130} wegfällt.

Die Übergänge von einer Zellzyklusphase in die nächste wird durch sogenannte check points (Kontrollpunkte) reguliert.^{119, 126, 127, 131, 132}

Man unterscheidet 3 verschiedene Kontrollpunkte:

- G₂-Kontrollpunkt am Übergang von der G₂-Phase zur Mitose
- Metaphasekontrollpunkt am Übergang von der Mitose zur G₁-Phase
- G₁-Kontrollpunkt am Übergang von G₁-Phase zur S-Phase (Restriktionspunkt)^{133, 134}

Diese Kontrollpunkte werden durch Cyclin/CDK-Kinasen überwacht^{119, 126} und können somit an den Punkten bei Schädigung der DNA den Zellzyklus anhalten. Zykline sind Proteine und verbinden sich mit der Serin/Threonin Proteinkinase (cdc)¹³⁵ zu Komplexen.¹³⁶

Es fallen relevante Kontrollsysteme in Tumorzellen aus, die durch unzählige Gendefekte und chromosomale Instabilitäten charakterisiert sind.¹²⁶

1.2.2.1.3 Reparatur von DNS-Schäden und genetische Stabilität

Eine wesentliche Rolle spielt hier ein Tumorsuppressor, das p53-Protein, das bei Schädigungen der DNA oder anderer Arten zellulären Stresses aktiviert wird und am G₁-Kontrollpunkt einen Zellzyklusblock oder wenn der Schaden für eine Reparatur zu groß ist, kann p53 den Zelltod durch Apoptose auslösen.¹¹⁹ p53 ist bei vielen Karzinomformen mutiert. Aus diesem Grund spielt p53 eine wichtige Rolle in der Bewahrung der genetischen Stabilität und wird deswegen auch „Wächter des Genoms“ genannt.

Ein weitere wichtige Rolle für die genetische Stabilität spielt der Metaphase-Anaphase-Kontrollpunkt,¹³⁷ weil z.B. eine veränderte Zahl von Zentrosomen oft in Tumorzellen nachgewiesen werden kann, was zu einer Dissegregation der Chromosomen führen kann und damit zur genetischen Instabilität beiträgt.¹³⁸

Etlche Proteine, die an diesem Kontrollpunkt mitwirken, wie z.B. BUB-Proteine oder MAD2,^{122, 139} wurden in verschiedenen Tumoren in mutiertem Zustand gefunden, was zu chromosomaler Instabilität führt.¹²² Diese Proteine und die cyclin-abhängigen Kinasen kontrollieren die Aktivität des APC (anaphase promoting complex).¹⁴⁰

1.2.2.2 Apoptose

Die Apoptose, der programmierte Zelltod,^{129, 141, 142} ist ein streng geregelter natürlicher Vorgang, der durch extrazelluläre Signale veranlasst wird. Bei gesunden Menschen z.B. sterben pro Stunde im Darm oder Knochenmark Milliarden von Zellen.¹²⁷ Auch in der Embryonalentwicklung, z.B. bei Entstehung der Finger oder Zehen und bei der Erneuerung alter Zellen spielt die Apoptose eine wichtige Rolle. Eine unvollständige Beseitigung mutierter Zellen bei gestörter Apoptose, trägt entscheidend zur Tumorentstehung bei.¹¹⁹ Der programmierte Zelltod ist somit bei normalen Abläufen in der Homöostase von Geweben und Zellpopulationen, als auch bei pathologischen Ereignissen, wie sie bei degenerativen Syndromen, Autoimmunerkrankungen, ischämischer Gewebeschädigung oder Tumoren vorkommen, von zentraler Bedeutung.^{1, 119}

Auslöser der Apoptose^{1, 119, 143}

- Hormonähnliche Faktoren (TNF- α oder FAS-Liganden)
- Zellschädigungen (Toxine, Hypoxie, Radikale, Chemotherapeutika,¹⁴⁴ Strahlentherapie)
- Osmotischer Schock
- Oxidativer Stress
- Bestrahlung
- Glucocorticoide
- Entzug von Wachstumsfaktoren
- P53

Die besonderen Kennzeichen der Apoptose sind:

- das Schrumpfen der Zelle,
- Membranausstülpungen („membrane blebbing“)
- die Kondensierung des Chromatins und
- die Fragmentierung der DNS.

Am Ende wird die Zelle in einzelne Teile (apoptotic bodies) zerlegt und von benachbarten Zellen oder Makrophagen im Gewebe phagozytiert.

Die Apoptose findet über eine Signalkaskade statt. Zuerst Stimulation bestimmter Rezeptoren (durch z.B. TNF- α oder CD95-Ligand) und dann Aktivierung von Caspasen¹⁴² (Enzyme, die Proteine spalten), wird der programmierte Zelltod eingeleitet. Ein wichtiger Apoptoseauslöser ist BAX (bcl-2-Antagonist).

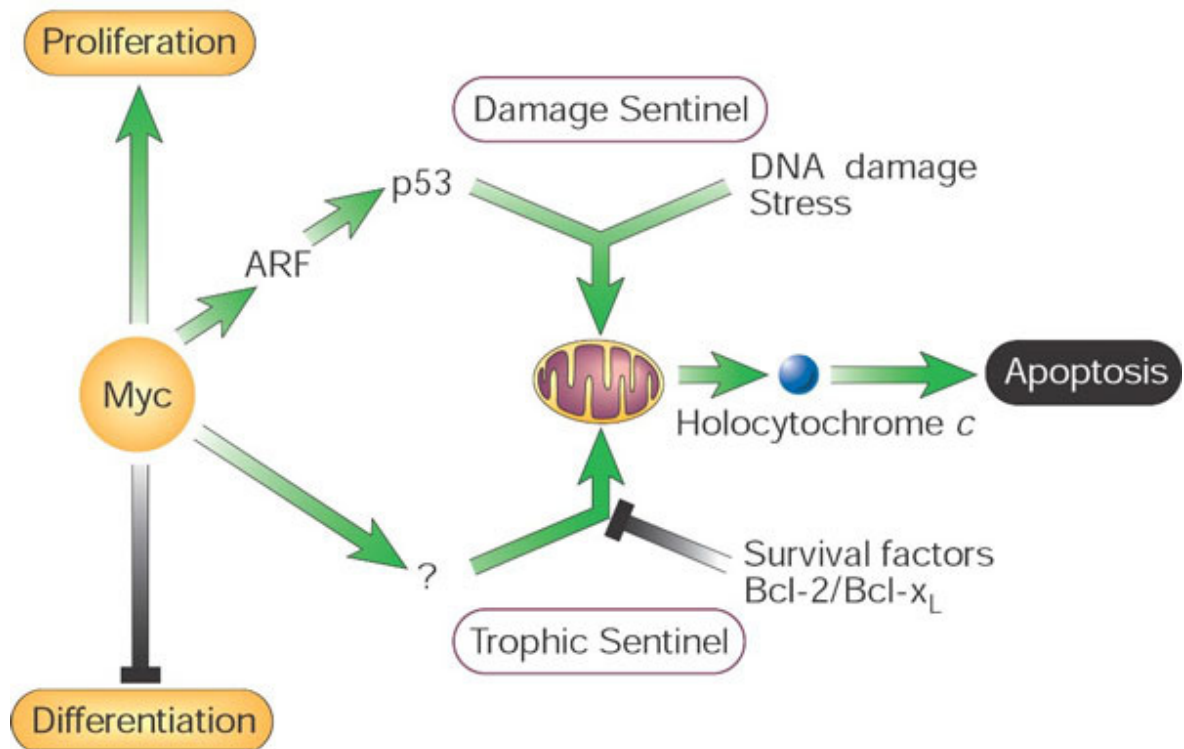


Abb. 11 Aktivierung von wachstumsregulierenden Läsionen triggern Wächterfunktionen, die, die Zelle vor Mutationen schützen.

1.2.2.2.1 Apoptose und Tumorentstehung

Zu einer pathologisch herabgesetzten Apoptose kommt es, wenn es einen Überschuss an antiapoptotisch wirksamen Wachstumsfaktoren gibt.¹⁴³ Bei vielen Krebsarten liegt eine Überexpression von Apoptose hemmenden Genen (z. B. bcl-2) oder Mutationen in den entsprechenden Genen (z.B. p53) vor.

1.2.3 Onkogene und Tumorsuppressorgene

Grundsätzlich kann man zwei unterschiedliche Arten von genetischen Veränderungen in menschlichen Tumoren vorfinden.¹⁴⁵ Auf der einen Seite können Gene aktiv, durch Mutationen oder Fehlregulation verändert, in der Onkogenese mitwirken. Diese werden Onkogene genannt. Oder auf der anderen Seite gibt es Gene, sogenannte Tumorsuppressorgene oder Antionkogene, die durch Schädigung einer oder beider Allele zur malignen Transformation einer Zelle beitragen. Ein gemeinsames Kennzeichen aller Tumore ist die Fehlregulation der Zellproliferation.

1.2.3.1 Onkogene und Protoonkogene

Onkogene sind Gene, die unter gewissen Bedingungen eine nicht-neoplastische Zelle in einen tumorigenen Phänotyp umwandeln können.¹²⁶ Inaktivierte Onkogene, die Teil des normalen Genoms sind, werden als Protoonkogene bezeichnet und sind die Vorstufen der Onkogene. Aktivierte Onkogene verursachen über eine Kette von Signalübertragungen eine Stimulation auf das zelluläre Wachstum, weil sie den Zellzyklus stimulieren, die Differenzierung hemmen oder die Apoptose verhindern, und führen daher zur Bildung von Zellen mit einem tumorigenen Phänotyp. Sie haben einen dominanten Einfluss, das heißt, es genügt die Änderung in einem Allel um eine veränderte Genexpression auszulösen. Bei der Umwandlung einer normalen Zelle in eine Tumorzelle kommt es zu einer Aktivierung von Onkogenen und gleichzeitig Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen.¹²¹

1.2.3.1.1 Funktion der Onkogenprodukte

Man kann die Onkogene funktionell in 4 Gruppen einteilen:

- Wachstumsfaktoren (sis)
- Rezeptoren für Wachstumsfaktoren (EGFR, c-erbB-2)
- Signalübermittler von der Zellmembran zum Zellkern (RET; src-TK; bcr-abl; ras-G-Protein)
- Transkriptionsfaktoren

1.2.3.1.1.1 Wachstumsfaktoren

Die typischen Eigenschaften von Wachstumsfaktoren sind:

- Wachstumsfaktoren sind Eiweißmoleküle, die als Polypeptide, Oligopeptide oder Steroide existieren können
- Die Bindung findet an eigenen Rezeptoren statt
- Durch den Liganden-Rezeptor-Komplex wird ein Signal in der Zelle ausgelöst
- Dieser Komplex wird durch Endozytose in die Zelle eingeschleust

1.2.3.1.1.2 Onkoproteine als Rezeptoren für Wachstumsfaktoren: EGFR und c-erbB-2 Onkogen

Wachstumsfaktoren verbinden sich mit dem Rezeptor und aktivieren eine Signalkaskade, die letztendlich zur Mitose der Zelle führt.

Es werden 4 Gruppen von Wachstumsfaktorrezeptoren unterschieden:

- Membranproteine mit Tyrosin-Kinase-Aktivität (EGFR¹⁴⁶, c-erbB-2, c-erbB-3, c-erbB-4, PDGFR)
- Membranproteine mit Tyrosin-Kinase-Aktivität entsprechend Hormonrezeptoren (Adrenalin, Glukagon etc.)
- Intrazelluläre Signalübermittler (Transducer) entsprechend src- oder ras-Proteinen
- Nukleäre Transkriptionsfaktoren

1.2.3.1.1.2.1 EGFR:

Es wurde eine vermehrte Anzahl an EGF-Rezeptoren bei vielen menschlichen Tumoren, wie Mamma-, Bronchial-, Kopf-Hals-Tumoren, Glioblastomen und kolorektalen Karzinomen gefunden.¹⁴⁷⁻¹⁴⁹

Etliche Studien haben bewiesen, dass die Überexpression des EGFR bei einer Reihe von Tumoren mit einer schlechten Prognose der Patienten einhergeht¹⁵⁰⁻¹⁵² Diese Überexpression ist in autokrin regulierten Karzinom- und Gliomzellen oft mit einer Expression mutierter EGFR Variationen verbunden.¹⁵³⁻¹⁵⁷

EGFRvIII ist die häufigste Variation von EGFR, die in einem Normalgewebe nicht zu finden ist, aber auf etlichen Tumoren exprimiert wird, wie z.B. bei 50% aller malignen Gliome, weiterhin in Prostatakarzinomen, nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen und Ovarialkarzinomen.^{153, 155}

Es ließ sich ein signifikanter Zusammenhang von EGFR-Expression und verkürztem Überleben bzw. verkürztem rezidivfreien Intervall für Ovarial- und Larynxtumoren sowie Lymphknoten-positive Mamma- und Plattenepithelkarzinome der Lunge feststellen.^{151, 152, 158}

1.2.3.1.1.2.2 c-erbB-2 (HER2/neu):

Her2/neu (human epidermal growth factor receptor 2, erb-B2, c-erbB2) zählt zu den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren,¹⁵⁹ aktiviert die Zellproliferation und inhibiert die Apoptose.^{160, 161} Eine Überexpression des Wachstumsfaktors HER-2 ist häufig mit einem aggressiven Wachstum,¹⁶² einem geringeren rezidivfreien Intervall und einer verminderten Gesamtüberlebenszeit assoziiert.¹⁶³

Carlomagno et al. konnten bei 30% von Lymphknoten-negativen Patientinnen eine c-erbB-2-Überexpression feststellen, die direkt mit der Tumorgroße und indirekt mit der Konzentration des Östrogenrezeptors zusammenhängt.¹⁶⁴

Eine erfolgversprechende Möglichkeit bietet der humanisierte monoklonale Antikörper Trastuzumab, der gegen den Oberflächenrezeptor HER2/neu gerichtet ist und bei circa 20-25% aller Mammakarzinompatientinnen überexprimiert ist.¹⁶³

Es wird empfohlen, dass Trastuzumab nur bei Patientinnen mit einer HER2/neu-Überexpression im Primärtumor verwendet wird.¹⁶⁵⁻¹⁶⁷

1.2.3.2 Tumorsuppressorgene

Eine relevante Voraussetzung der Tumorentstehung ist auch der Ausfall der Tumorsuppressorgene, die die geregelte Zellteilung im Zellzyklus kontrollieren.¹²⁶ Eine Tumorzelle verliert durch einen genetischen Defekt die Tumorsuppressoraktivität, die in einer normalen Zelle vorhanden ist.¹⁶⁸ Diese Aktivität wird als „Bremse“ des Zellzyklus beschrieben.

Da Tumorsuppressorgenmutationen rezessiv sind, reicht ein normales Allel aus, um die normale Funktion beizubehalten.¹⁶⁹ Erst durch eine 2. Mutation im 2. Allel verliert das Tumorsuppressorgen seine Funktion.

Diese Zweisrittetheorie der Tumorentstehung wurde 1971 von Knudson¹⁷⁰ anhand des Retinoblastoms beschrieben, das entweder in der familiären Form oder der sporadischen Form auftritt. Durch die epidemiologische Studie von Knudson und anschließende Zellfusionsstudien¹⁷¹ wurde später das Retinoblastomgen entdeckt und die Rolle des p53 Gens erstmalig beschrieben.

1.2.3.2.1 Retinoblastomprotein pRB

Das Rb-Gen ist auf Chromosom 13 lokalisiert. Das Rb-Protein befindet sich im Zellkern und hat eine entscheidende Aufgabe in der Regulation der Genaktivität im Verlauf des Zellzyklus. pRB wirkt direkt auf Transkriptionsfaktoren, z.B. E2F-Faktor, und überprüft somit deren Aktivität in der Regulation zellzyklusabhängiger Genexpression.¹⁷²

pRB beeinflusst die zeitliche Ausdehnung der G₁-Phase des Zellzyklus und legt somit auch den Eintritt in die S-Phase fest. Aus diesem Grund hat das pRB eine relevante Überwachungsfunktion über den Zellzyklus. Dysfunktionen führen zu ungehemmten Zellwachstum und trägt damit zur Tumorentwicklung bei.¹¹⁹

1.2.3.2.2 Tumorsuppressorprotein p53

Das p53 Gen befindet sich am kurzen Arm des Chromosoms 17. Der am häufigsten nachweisbare molekulare Schaden in Tumorzellen ist eine Dysfunktion des Tumorsuppressorproteins p53.¹⁷³ In bis zu 50% aller humanen Malignome zeigt sich ein p53-Genlocus-Defekt.¹⁷⁴⁻¹⁷⁶ Keimbahnmutationen sind mit dem hohen Risikofaktor einer Tumorentstehung verbunden, wie an Beispielen des Li-Fraumeni-Syndroms oder zahlreicher Gliome demonstriert wurde.¹⁷⁷ Das p53-Protein hat viele Funktionen,^{169, 178} aber die Hauptaufgabe ist der Einfluss auf das Proliferationsverhalten von Zellen. Es hat die Fähigkeit, den Zellzyklus in der G1-Phase anzuhalten, wenn Defekte in der DNS vorliegen und hat somit eine proliferationshemmende Wirkung. Mutationen im TP53 sind verbunden mit einem hohen Risiko einer Brustkrebsentstehung bzw. auch anderer Karzinome.¹⁷³

1.2.4 Virusätiologie

Circa 15-20% aller Karzinome sind durch einen Virus verursacht.¹⁷⁹⁻¹⁸² Diese Tumoviren sind in der Lage sich in das Wirtsgenom einzubauen und haben die Möglichkeit zu ihrer eigenen Replikation. Die infizierte Zelle exprimiert die viralen Gene, die imstande sind, das Zellwachstum und Proliferation zu induzieren und die Apoptose zu hemmen.¹⁸³

Es gibt onkogene RNA- und DNA-Viren.

Zu den DNA-Viren gehören:^{119, 184}

- Humane Papillomviren der High-risk-Gruppe (z.B. HPV16, 18, 31, 33 und 45)
- Hepatitis-B-Virus
- Epstein-Barr-Virus
- Humanes Herpesvirus 8

1.2.4.1 Humane Papillomviren und Cervixkarzinom

15 verschiedene humane Papillomviren können ein Cervixkarzinom hervorrufen. HPV16 ist in 50% der Fälle an der Entstehung des Zervixkarzinoms beteiligt.¹⁸⁵ Der Weg der Tumorentwicklung geht von der HPV Infektion, Viruspersistenz über Weiterentwicklung zur Präkanzerose und schlussendlich zur Invasion. HPV ist die häufigste Geschlechtskrankheit.¹⁸⁶

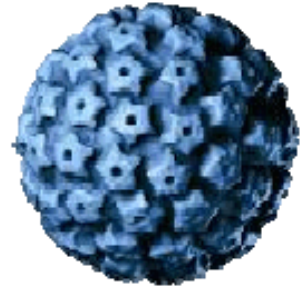


Abb. 12 HPV

Das Zervixkarzinom zählt zu den häufigsten Krebserkrankungen bei Frauen weltweit¹⁸⁷ (nach dem Mammakarzinom). Die HPV-Impfungen, Gardasil und Cervarix, die vor Infektion mit HPV16 und 18 schützen und die in 70% der Fälle für die Karzinomentstehung verantwortlich sind, könnten die Karzinomfälle reduzieren.^{187, 188}

1.2.4.2 Hepatitis-B-Virus und Hepatozelläreskarzinom

Das hepatozelluläre Karzinom ist weltweit an dritter Stelle der Krebstodesursachen, 600.000 Patienten sterben jährlich an diesem Tumor.¹⁸⁹ Chronische HBV Infektion kann zu HCC führen.¹⁹⁰

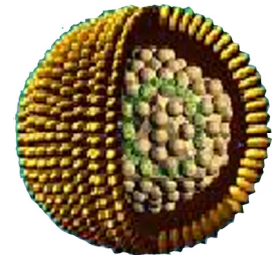


Abb. 13 HBV

Es wird geschätzt, dass die Ursache für das HCC weltweit in 53% das Hepatitis-B-Virus ist.¹⁹¹ In 70-90% entsteht ein HCC aus einer Zirrhose oder Entzündung.¹⁸⁹

1.2.4.3 Epstein-Barr-Virus und Burkittlymphom

Das Epstein-Barr-Virus wurde vor über 40 Jahren aus einer Burkitt-Lymphom-Biopsie entdeckt und war das erste Virus, das direkt mit einem Karzinom assoziiert war.¹⁹² Das Burkittlymphom, ein hochaggressives Lymphom, wurde das erste mal von Dennis Burkitt in Afrika 1958 beschrieben.^{193, 194, 195}

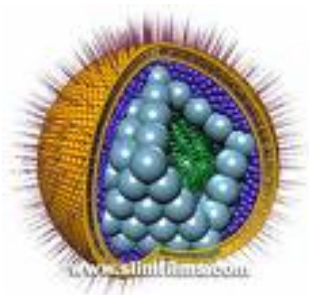


Abb. 14 EBV

1.2.4.4 Humanes Herpesvirus 8 und Kaposisarkom

Das humane Herpesvirus 8 (HHV-8),¹⁹⁶ auch bekannt unter Kaposi-Sarkom-assoziiertes-Herpesvirus, wurde 1994 entdeckt. HHV-8 ist stark assoziiert mit allen Subtypen des Kaposisarkoms und Castleman-Syndroms.¹⁹⁷ Das Kaposisarkom ist der am häufigsten vorkommende Krebs bei AIDS.¹⁹⁸⁻²⁰⁰

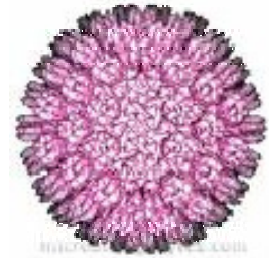


Abb. 15 HHV-8

Zu den RNA-Viren gehören:

- Hepatitis-C-Virus
- Humanes T-Zell-Leukämie-Virus-1

HCV Infektion ist ein Risikofaktor für die Entstehung eines Hepatozellulärenkarzinoms.²⁰¹

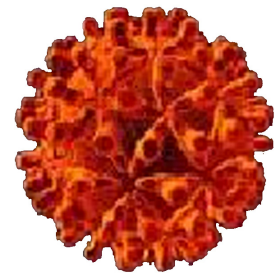


Abb. 16 HCV

1.3 Genetische Polymorphismen

Unsere im Zellkern lokalisierten Gene enthalten die Baupläne für unsere Proteine, die unser Leben regulieren und kennzeichnen. Obwohl alle Menschen prinzipiell die gleichen Informationen in ihren Genen tragen, ist trotzdem jeder Mensch individuell. Die Einzigartigkeit wird durch kleine Unterschiede in unserer Erbinformation gewährleistet. In der Tat sind es genau jene speziellen Variationen (Genpolymorphismen), die uns für gewisse Krankheiten anfälliger oder auch widerstandsfähiger machen können.

Die DNA (Desoxyribonukleinsäure) ist die Trägerin der Erbinformation und liegt normalerweise als schraubenförmige Doppelhelix in Form von Chromosomen im Zellkern vor. Sie ist ein langes Kettenmolekül und aus vielen Bausteinen, den sogenannten Nukleotiden aufgebaut. Jedes Nukleotid besteht aus einer Phosphorsäure, dem Zucker Desoxyribose sowie einer Base. Bei der Base kann man zwischen Purinen (Adenin oder Guanin) und Pyrimidinen (Thymin oder Cytosin) unterscheiden.²⁰²

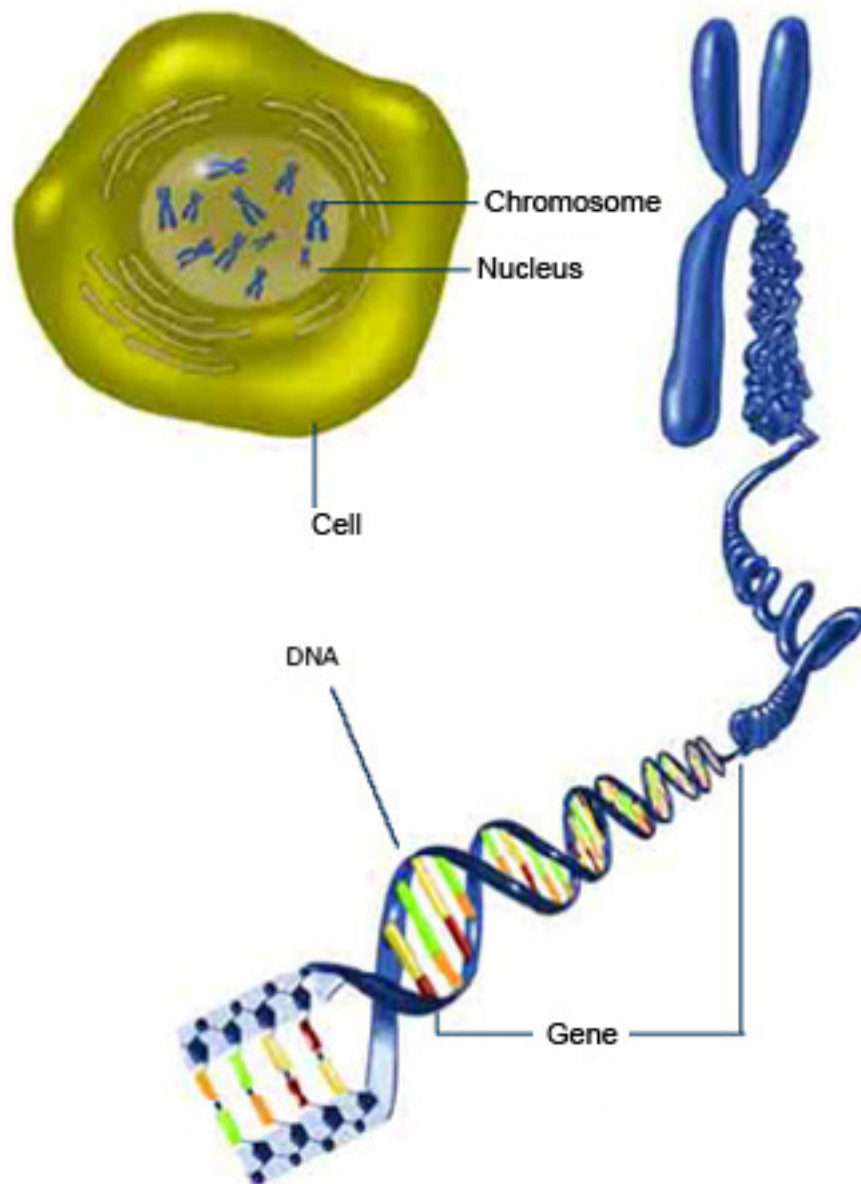


Abb. 17 Zellkern, Chromosom, Gene

Die lange DNA bildet Gene, die aufgespult in den Chromosomen sind und im Zellkern liegen.

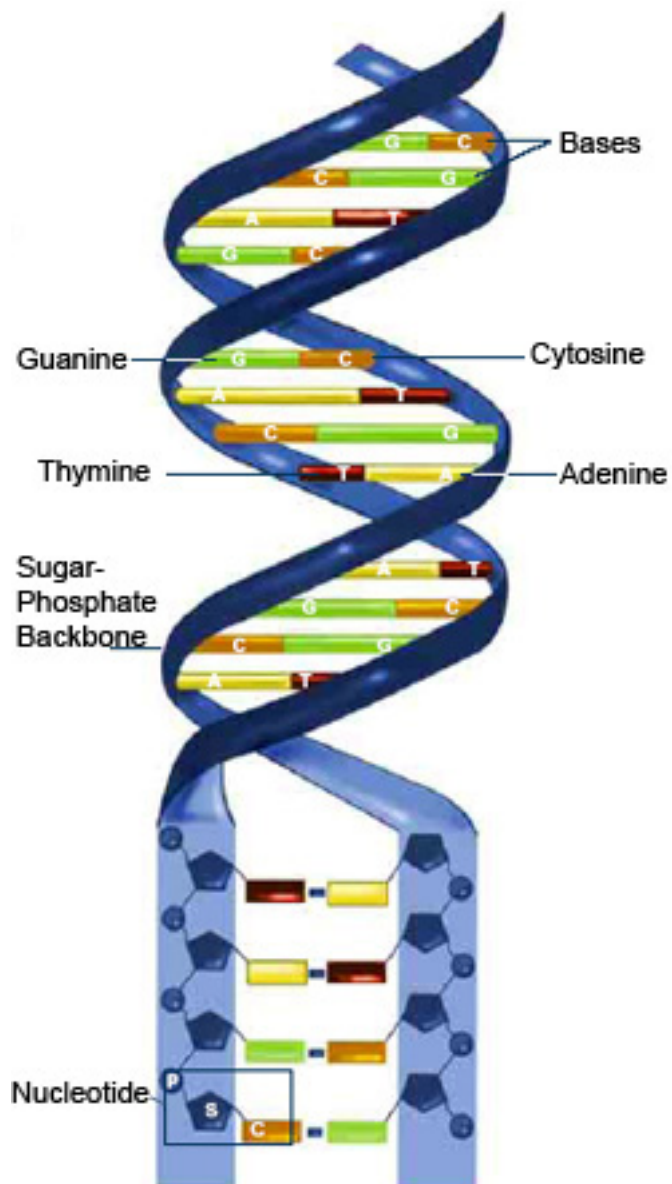


Abb. 18 DNA

Die Gesamtheit des genetischen Materials oder der vererbaren Information einer Zelle, die als Desoxyribonukleinsäure vorliegt, wird als Genom bezeichnet.²⁰²

Genetische Polymorphismen stellen Unterschiede in der Basenpaarsequenz der DNA dar und kommen bei Individuen oder Bevölkerungsgruppen vor. Sie können verschiedene Genotypen und/oder Phänotypen zur Folge haben.²⁰³ Beispiele für Phänotyp polymorphismen beinhalten den Arzneimittelmetabolismus, sowie auch Karzinogenaktivierung und Detoxifikation. Diese Phänotyp polymorphismen werden oft durch Ergebnisse klinischer Beobachtungen, mit Unterschieden in der therapeutischen Antwort oder Nebenwirkungen verschiedener Behandlungsformen, in Zusammenhang gebracht.²⁰⁴⁻²⁰⁶ Im Gegensatz dazu, sind genetische Polymorphismen, die unterschiedliche Nukleotidsequenzen repräsentieren, nur durch Gensequenzierungstechniken nachweisbar. Die Beziehung zwischen Polymorphismen und Krebsprävention kann durch eine Anzahl von Perspektiven in Zusammenhang gebracht werden, unter Einbeziehung der Untersuchung von Enzymklassen und Rezeptoren, wie auch der genetischen Variation in „cancer-susceptibility-genes“ und der Aussetzung verschiedener karzinogener Risiken.²⁰⁷⁻²¹¹

Das menschliche Genom ist die Gesamtheit des genetischen Materials einer Zelle oder eines Organismus,²¹² dessen Größe circa 3 Milliarden²¹³⁻²¹⁵ (3×10^{10}) Basenpaare ausmacht und etwa 25.000 Gene kodiert. Im Durchschnitt ist alle 1000-2000 Basenpaare ein Baustein unseres Genoms gegen einen anderen ausgetauscht. Diese Veränderungen werden als Polymorphismus bezeichnet. (meistens ist es ein Austausch einer einzelnen Nukleotid-Base)²¹⁴ Dieser Unterschied wird Mutation genannt, wenn er in <1% der Bevölkerung vorkommt bzw. als Genpolymorphismus bei einem Auftreten >1%. 99,9% der DNA-Sequenzen der Menschen sind identisch, nur 0,1% sind unterschiedlich.²¹⁶ Es sind mehr als 10 Millionen SNPs im Genom identifiziert worden.²¹⁷⁻²¹⁹

1.3.1 Was sind Genpolymorphismen und SNIPS?

Als genetischen Polymorphismus bezeichnet man die Existenz eines Genes in mehreren Zustandsstrukturen (=Allelen), z.B. durch Auswechseln einer Base der DNA durch eine andere oder auch durch Dasein oder Abwesenheit ganzer Sequenzen. Dadurch kann es zu verschiedenen phänotypischen Ergebnissen des Genprodukts kommen. Liegt der Polymorphismus innerhalb einer protein-

kodierenden Sequenz, können strukturell und funktionell unterschiedliche Proteine entstehen, liegt er außerhalb, können in diesem Bereich gelegene Komponenten verfälscht sein, die für die Überwachung der Aktivität des Genes bedeutend sind, z.B. in der Promoter-Region.

Die Untersuchung der SNIPS im menschlichen Genom ist der Schlüssel zum Verständnis der Wichtigkeit der menschlichen genetischen Variation.^{215, 220, 221}

SNIPS, oder auch Einzel-Nukleotid-Polymorphismus genannt,²¹² sind singuläre kleine Nukleotidaustausche in der DNA von Genen, die viel öfter vorkommen (mindestens 1% der Bevölkerung)²²² als Genmutationen und meist keinen Krankheitswert haben, aber ein Merkmal bestimmen.²²³

SNIPS sind für eine Reihe von Eigenschaften verantwortlich, durch die sich Menschen voneinander unterscheiden, wie beispielsweise Körpergröße, Blutgruppe, Augen-, Haut- und Haarfarbe. Viele dieser Variationen spielen sich auf molekularer Ebene ab.²²⁴

Genpolymorphismen können aus verschiedenen physikalischen Ereignissen entstehen wie z.B. durch Transitionen (Austausch zwischen Purinen), Transversionen (Ersatz der Purine durch Pyrimidine, oder Pyrimidine durch Purine), Missense-Mutationen (Veränderung in einem Einzelbasenpaar der DNA, das die Aminosäure ändert), nonsense-Mutationen (Basenpaaraustausch, der ein Stop-codon erzeugt, das zu einer vorzeitigen Termination der Proteinsynthese führt) oder durch andere Veränderungen. Jede beliebige Veränderung der genetischen Information im Verhältnis zum „Wild-typ“-Genom wird als Mutation angesehen. Diese Veränderungen können sich im Phänotyp bemerkbar machen oder es kann zu positivem oder negativem Überlebensvorteil kommen.²⁰³

1.4 Matrix-Metallo-Proteinasen

Die Extrazelluläre Matrix haltet Zellen und den dreidimensionalen Körperbau zusammen. Sie spielt auch eine große Rolle beim Wachstum, Differenzierung, Überleben und Bewegung von Zellen. Für eine Metastasierung ist es essenziell, dass die Tumorzelle die Extrazelluläre Matrix-Komponenten umbaut, die das physikalische Hindernis für die Zellmigration darstellen. Die Schlüsselenzyme, die für den Abbau der extrazellulären Matrix zuständig sind, werden als Matrix-Metallo-Proteinasen bezeichnet.²²⁵

Matrix-Metallo-Proteinasen gehören zur Familie der Zink-abhängigen Endoproteinasen,²²⁶ deren enzymatische Aktivität sich gegen Komponenten der extrazellulären Matrix richtet.²²⁷ Beim Menschen, sind circa 23 Mitglieder durch klonen und sequenzialisieren identifiziert worden, und viele sind an Krebserkrankungen beteiligt.²²⁵ Diese Proteinasen haben einen direkten Zusammenhang mit Domainstrukturen und stehen mit einer Familie der Proteinaseninhibitoren in Beziehung, die TIMPs genannt werden (tissue inhibitors of metalloproteinases).^{227, 228} 4 Mitglieder der TIMP Familie wurden beim Menschen geklont und sequenziert. Sie inhibieren MMPs durch Bildung fester, nicht-kovalenter Verbindungen mit der aktiven Stelle der MMPs. MMPs erleichtern Tumorzellinvasion und Metastasierung durch zumindest drei verschiedene Mechanismen:

1. Zuerst beseitigt die Proteinasewirkung organische Hindernisse durch Abbau der Extrazellulären Matrix-Makromoleküle wie Kollagen, Laminin, und Proteoglykane.

2. MMPs haben die Möglichkeit, die Zelladhäsion zu regulieren. Zellen die durch die extrazelluläre Matrix wandern, müssen im Stande sein, neue Zell-Matrix und Zell-Zell-Bindungen zu bilden und bestehende zu trennen.²²⁷

3. MMPs könnten auf extrazelluläre Matrixkomponenten oder andere Proteine einwirken, um versteckte biologische Aktivitäten zu enthüllen.

Matrix-Metallo-Proteinase sind bestätigte Schlüsselfiguren in der Regulation von Zell-Zell- und Zell-Extrazellulärer-Matrix-Interaktionen. Sie sind involviert in Matrixstrukturänderungen, Verfügbarkeit von Wachstumsfaktoren und die Funktion von Zelloberflächensignalsystemen, mit daraus resultierenden Effekten bei der Zelldifferenzierung, Proliferation und Apoptose.²²⁹ Sie spielen eine zentrale Rolle in der Morphogenese, Wundheilung, Gewebereparatur und Umformung als Reaktion auf eine Schädigung oder Verletzung. In der Entwicklung von Krankheiten, wie Arthritis, Krebs oder kardiovaskuläre Erkrankungen sind sie ebenfalls bedeutend.^{228, 229} Abbau der Extrazellulären Matrix steigert nicht nur die Tumorinvasion, sondern beeinflusst das Tumorzellverhalten und führt zur Krebsprogression.²²⁵

Metastasen sind häufig verantwortlich dafür, an einem Krebs zu sterben, da der Tumor entweder entscheidende Organe befällt oder aufgrund der Komplikationen einer Therapie, die das Wachstum und die Ausbreitung versucht einzuschränken. Den Mechanismus der Tumorzellinvasion und Metastasierung zu verstehen, wäre von großer Wichtigkeit für die Entwicklung einer gezielten Therapie, zur Verhinderung einer Streuung.²²⁷

Ein früher Hinweis auf die Wichtigkeit der MMPs in der Tumorbilogie, war die Charakterisierung einer sekretierten MMP im Jahr 1980 aus einer Melanomzelllinie, die im Stande war, Basalmembrankollagen abzubauen.^{230, 231}

MMP-1: wurde erstmals von Fullmer und Gibson 1966 in menschlichem Zahnfleisch nachgewiesen.²³²

Die Matrix-Metallo-Proteinase 1 (MMP-1) ist an der Tumorinvasion und Metastasierung beteiligt. Es wurde bewiesen, dass das 2G Allel von der polymorphen Stelle im MMP-1 Promoter eine größere Transkriptionsaktivität hat als das 1G Allel. Allelimbalancen im 11q22 Locus wird häufig in verschiedenen Krebsarten beobachtet und könnte mit einer fortschreitenden Erkrankung verbunden sein.²³³

Matrix-Metallo-Proteinase (MMPs) spielen eine wichtige Rolle bei diversen physiologischen und pathologischen Prozessen. Die Aktivität der MMPs wird auf

verschiedenen Ebenen geregelt. Die Regulation der Transkription, scheint den Schlüsselschritt in der MMP Regulation darzustellen. Es gibt verschiedene Arten der MMPs, die sich in Struktur und Funktion unterscheiden. MMP-1, eine interstitielle Kollagenase, hat eine herausragende Rolle in der Spaltung der EZM. Die Höhe der MMP-1 Expression kann durch verschiedene Single-nucleotide-polymorphismen in der Promoterregion beeinflusst werden. Ein funktioneller Polymorphismus auf der Position -1607 konnte die Transkriptionsaktivität von MMP-1 verändern und ist assoziiert mit verschiedenen pathologischen Vorgängen.²²⁶

In einer in diesem Jahr veröffentlichten Studie von Kohrmann et al. konnte im Brustkrebsgewebe eine stärkere Expression einiger MMPs identifiziert werden, verglichen mit einem Normalgewebe. Einige MMPs (wie z.B.: MMP-1, -2, -8, -9, -10, -11, -12, -13, -15, -19, -23, -24, -27, -28) könnten mit der Brustkrebsentwicklung und Tumorprogression verbunden sein. Daher, sind die MMPs angemessene Kandidaten, um weitere funktionelle Analysen in Bezug auf ihre Rolle bei Brustkrebs durchzuführen.²³⁴

Die Matrix-Metallo-Proteinase 3 (MMP-3), auch bekannt als Stromelysin-1, ist ein Schlüsselenzym für die Karzinogenese und das Tumorwachstum. Es konnte in manchen Studien ein direkter Zusammenhang nachgewiesen werden, dass der 5A/6A Promoter Polymorphismus eine unterschiedliche MMP-3-Aktivität verursacht und mit der Anfälligkeit für eine Krebsentstehung assoziiert ist. In einer Studie von Krippel et al. konnte gezeigt werden, dass der MMP-3 5A/6A Promoter Polymorphismus nicht die Empfänglichkeit einer Brustkrebsentstehung beeinflusst, aber es könnte mit einem erhöhten Risiko für eine Metastasierung bei Brustkrebspatientinnen verbunden sein.²³⁵

1.5 Studienziele

- Besteht ein genereller Zusammenhang zwischen dem MMP-1-Genpolymorphismus (1607 1G/2G) und Brustkrebsrisiko?
- Gibt es einen Unterschied im Vorkommen des obengenannten Genpolymorphismus zwischen metastasierten und nicht metastasierten Brustkrebspatientinnen?
- Hat der obengenannte Genpolymorphismus einen Einfluss auf den Entstehungszeitpunkt des malignen Tumors (Patientenalter bei Tumor-erstmanifestation), oder auf den Metastasierungszeitpunkt?
- Besteht ein Zusammenhang zwischen dem MMP-1-Genotypen und dem primären Tumorstadium (TNM-Staging, Östrogen/Progesteron-Rezeptor-status, HER2-neu Expression)

2 Methoden

2.1 Beschreibung der verwendeten Untersuchungsmethoden

2.1.1 Polymerasekettenreaktion

Die Einführung der Polymerasekettenreaktion (PCR) stellte einen Durchbruch für die Gentechnik dar und war somit ein Meilenstein für den Fortschritt der molekularen Genetik. Diese häufig angewendete Methode und dieses unverzichtbare Verfahren wurde 1984 von Kary Mullis entwickelt, der für diese Erfindung 1993 den Nobelpreis erhalten hat.²³⁶⁻²³⁹

Die Anwendung dieser Methode hat bereits beinahe alle Gebiete der Medizin und Wissenschaft, zusammen mit der forensischen Medizin, pränataler Diagnostik genetischer Erkrankungen, Gewebetypisierung für Organtransplantation, Onkologie, und die mikrobiologische Diagnostik revolutioniert.^{240, 241}

Der Einsatz molekularer Techniken für die Bestimmung von Krankheiten wird außerordentlich durch die Einführung der PCR erleichtert.²⁴²⁻²⁴⁴

Die PCR gewährt die Produktion großer Mengen spezieller DNA von einer DNA-Komplex-Vorlage in einer einfachen enzymatischen Reaktion. Dieser Prozess dient der in vitro DNA-Amplifikation.²⁴⁵

Für die DNA-Amplifikation in der PCR wird eine thermostabile DNA-Polymerase benötigt, das ist ein Enzym, das auch bei Temperaturen von nahezu 100 °C die Polymeraseaktivität behält²⁴⁶ und wurde vom *Thermus Aquaticus*, einem thermophilen, grampositiven Bakterium isoliert.^{238, 247}

2.1.1.1 PCR Grundlagen und Verfahren

Die meisten PCR Methoden amplifizieren typischerweise DNA-Fragmente bis zu 10 Kilo Basenpaare (kb), obwohl manche Techniken eine Vervielfältigung von Fragmenten mit einer Länge bis zu 40 kb erlauben.²⁴⁸

Die PCR benötigt folgende grundlegende Komponenten:²⁴⁹

- Die Original-DNA
- Zwei Primer
- Taq-Polymerase
- Desoxyribonucleosidtriphosphate
- Mg^{2+} -Ionen
- Pufferlösungen

2.1.1.2 Ablauf

Bei der Polymerasekettenreaktion wird DNA in vitro in immer wiederkehrenden Polymerisationszyklen amplifiziert, die aus drei temperaturabhängigen Schritten bestehen:

- DNA-Denaturierung
- Primerhybridisierung
- Elongation

Die Reinheit und das Ergebnis der Reaktionsprodukte hängen von mehreren Parametern ab, einer davon ist die Anlagerungstemperatur.²⁵⁰

Die drei Schritte eines PCR-Zyklus:^{251, 252}

1. **Denaturierung:** Das ist der erste reguläre Zyklusschritt und erhitzt die doppelsträngige DNA auf 94-96 °C für 20-30 Sekunden, damit es zur Trennung der Stränge kommt. Es werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen aufgebrochen, damit man die DNA-Einzelstränge erhält.

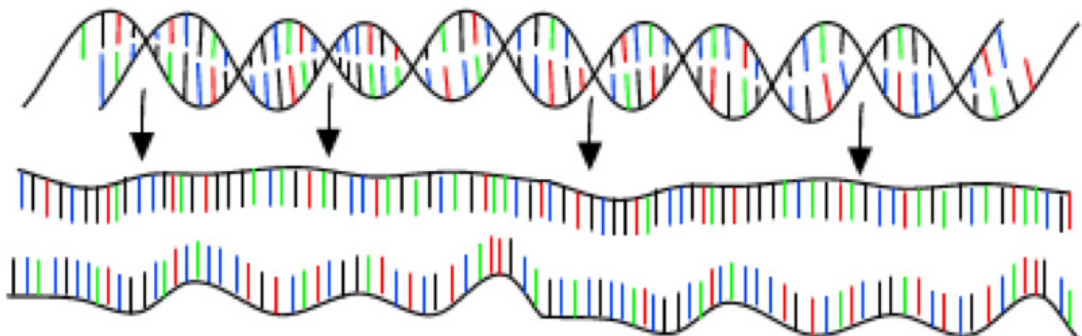


Abb. 19 Denaturierung

- 2. Annealing:** Nach erfolgter Denaturierung, liegt die DNA in Einzelsträngen vor und somit sind die einzelsträngigen Primer in der Lage sich komplementär an die entsprechende DNA-Zielsequenz anzulagern. Das Annealing erfolgt zumeist 5-10 °C unter dem Schmelzpunkt der Primersequenzen, dies entspricht häufig einer Temperatur zwischen 55 und 65 °C.

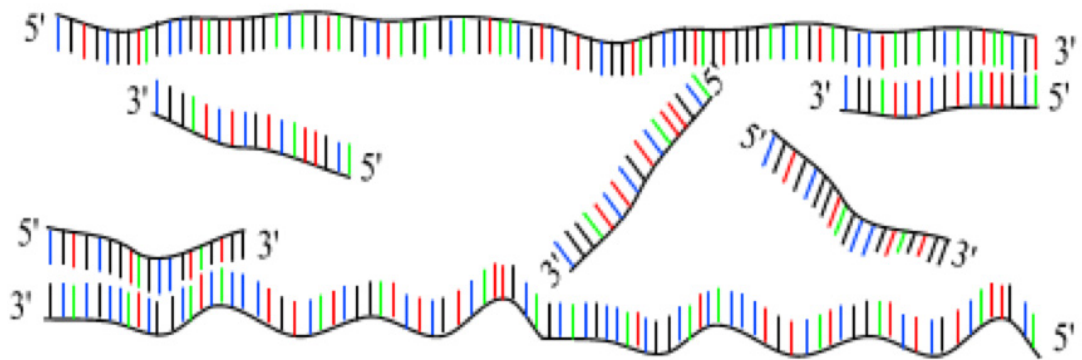


Abb. 20 Annealing

- 3. Elongation:** Die Temperatur hängt von der verwendeten Polymerase ab; die Taq-Polymerase hat die optimale Aktivität bei 68-72 °C und meistens wird eine Temperatur von 72 °C verwendet.^{247, 253}

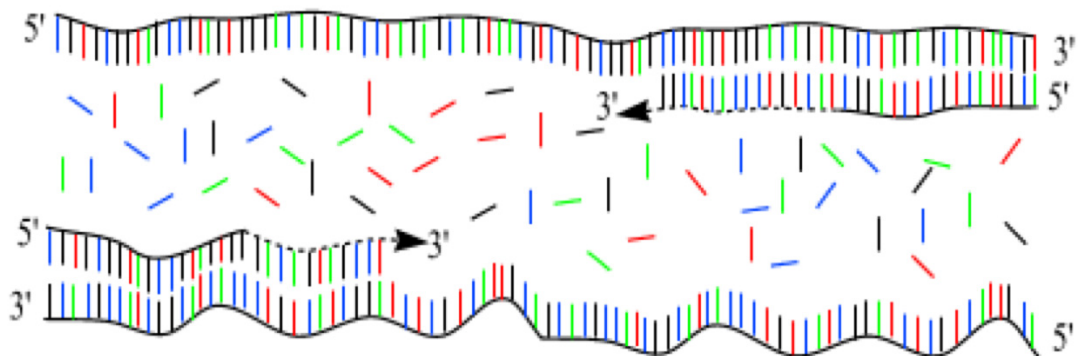


Abb. 21 Elongation

Schematische Darstellung des PCR-Zyklus

1. Denaturierung bei ca. 96 °C
2. Primerhybridisierung bei ca. 68 °C
3. Elongation bei ca. 72 °C

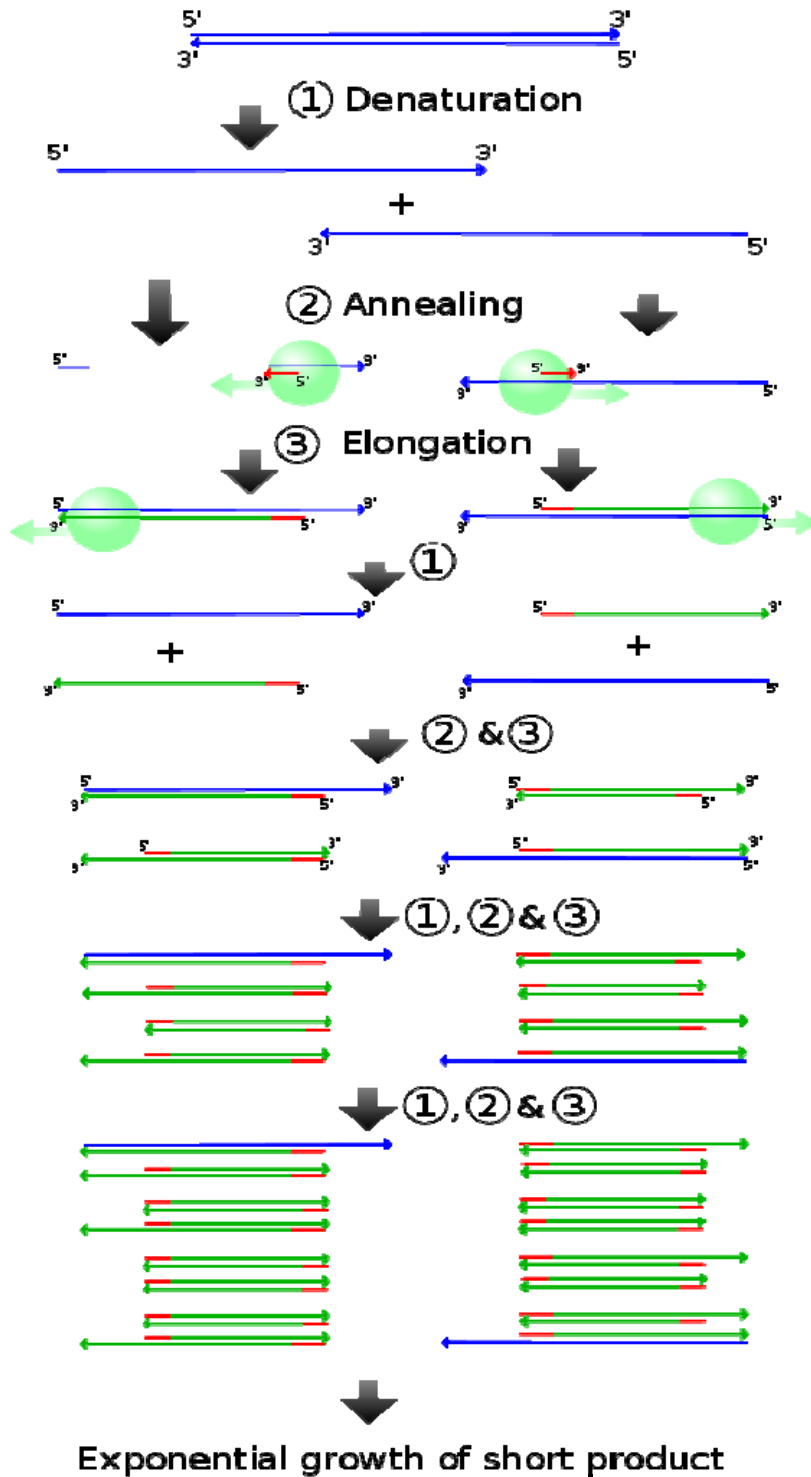


Abb. 22 Schematische Darstellung des PCR-Zyklus

2.2 Studienpopulation

Zwischen Jänner und Juli 2002, wurden 500 weibliche prävalente Patientinnen mit einem histologisch nachgewiesenen Mammakarzinom ohne synchrone und / oder metachrone maligne Zweitneoplasie an der Klinischen Abteilung für Onkologie, der Medizinischen Universitätsklinik Graz rekrutiert. Während der gesamten Rekrutierungszeit waren 2 Patienten nicht bereit, an der Studie teilzunehmen. (Partizipationsrate 99,6%)

Für jede Patientin wurde eine gesunde Probandin, altersgematched (± 1 Jahr) ohne malignen Tumor in der Anamnese aus dem Grazer Diabetes Screening Programm rekrutiert, einer populationsbasierten Screening-Studie.

Die Studie wurde in Übereinstimmung mit dem Österreichischen Gentechnikgesetz, der Ethikkommission der Universitätsklinik Graz vorgeführt, überprüft und zugelassen.

2.2.1 Beschreibung der verwendeten Methoden in dieser Studie

1. Aus statistischen Gründen wurden 500 weibliche Mammakarzinompatientinnen in die Studie eingeschlossen, im Speziellen annähernd gleich große Gruppen von Patienten im metastasierten und nicht metastasierten Stadium.
2. Nach Abnahme eines Vollblutröhrchens (ca. 9ml) wurde nach Entfernung des Serums mittels Zentrifuge, das übrige Blutkoagel vorerst in einem Kühlschranks bis zur weiteren Bearbeitung gelagert. Anschließend wurden diese gesammelten Röhrchen mit Kennnummern versehen, und auf Tauglichkeit für die Einbringung in die Studie überprüft. Sodann wurden die erhobenen klinischen Daten archiviert. Im Anschluss wurden die blutkoagelgefüllten Röhrchen zur gentechnologischen Untersuchung weiterverarbeitet.

3. Methode der gentechnischen Untersuchung:

Zur Bestimmung der MMP Genotypen wurde aus 0,2 ml Vollblut genomische DNA isoliert. Die Bereiche mit den Polymorphismen wurden mittels PCR vervielfältigt und anschließend mit spezifischen Restriktionsendonukleasen geschnitten. Die Schnittprodukte wurden auf einem Agarose-Gel aufgetrennt, durch eine CCD-Kamera dokumentiert und ausgewertet.

2.2.2 Statistische Methoden

Für die statistischen Analysen wurde SPSS 11.0 für Windows verwendet. Der Grenzwert für die Signifikanz war $p < 0,05$. Die Odds Ratio (OR) wurde für die Ermittlung des Mammakarzinomrisikos verwendet.

3 Ergebnisse

Die Patientinnen waren bei Diagnosestellung im Alter zwischen 28 und 84 Jahren, wobei das Durchschnittsalter 57 ± 11 Jahre betrug. Die Patientinnen der Kontrollgruppe waren altersgematched (± 1 Jahr), daher lag das durchschnittliche Patientinnenalter auch hier bei 57 ± 11 Jahre und die Kontrollen waren zwischen 28 und 84 Jahre alt.

Die MMP-1 Genotypen konnten bei den Patientinnen in 499 sowie bei den Kontrollen in 482 Fällen bestimmt werden.

Wie in der Tabellen 4 und 5 angeführt, zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied in den Verteilungen der einzelnen Genotypen.

3.1 MMP1 Genotypen und Allelfrequenzverteilungen

3.1.1 MMP1 Genotypenverteilung: Entstehungsrisiko

			Kontrollen	Patientinnen	Gesamt
MMP1 Genotyp	2G/2G	Anzahl	121	126	247
		in %	25,1%	25,3%	25,2%
	1G/2G	Anzahl	241	259	500
		in %	50,0%	51,9%	51,0%
1G/1G	Anzahl	120	114	234	
	in %	24,9%	22,8%	23,9%	
Gesamt	Anzahl	482	499	981	
	in %	100,0%	100,0%	100,0%	

Tab. 4 Gesamtrisiko für eine Mammakarzinomentstehung

Chi-Quadrat-Tests: Entstehungsrisiko

	Wert	df	p
Chi-Quadrat nach Pearson	,609 ^a	2	,738
Likelihood-Quotient	,609	2	,738
Zusammenhang linear-mit-linear	,241	1	,623
Anzahl der gültigen Fälle	981		

Tab. 5 Chi-Quadrat-Tests

3.1.2 MMP1 Genotypen: Metastasierungsrisiko

			Metastasierung		
			nein	ja	Gesamt
MMP1 Genotyp	2G/2G	Anzahl	64	62	126
		in %	25,6%	24,9%	25,3%
	1G/2G	Anzahl	126	133	259
		in %	50,4%	53,4%	51,9%
	1G/1G	Anzahl	60	54	114
		in %	24,0%	21,7%	22,8%
	Gesamt	Anzahl	250	249	499
		in %	100,0%	100,0%	100,0%

Tab. 6 Risiko einer Metastasierung

Chi-Quadrat-Tests: Metastasierungsrisiko

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	,535 ^a	2	,765
Likelihood-Quotient	,535	2	,765
Zusammenhang linear-mit-linear	,067	1	,795
Anzahl der gültigen Fälle	499		

Tab. 7 Chi-Quadrat-Tests

Wie aus den Tabellen 6 und 7 zu entnehmen ist, haben vom MMP-1 Genotyp 2G/2G 62, vom Genotyp 1G/2G 133 und vom Genotyp 1G/1G 54 Patientinnen Metastasen entwickelt. Insgesamt waren bei 249 Patientinnen Metastasen nachweisbar. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den metastasierten und nicht metastasierten Fällen.

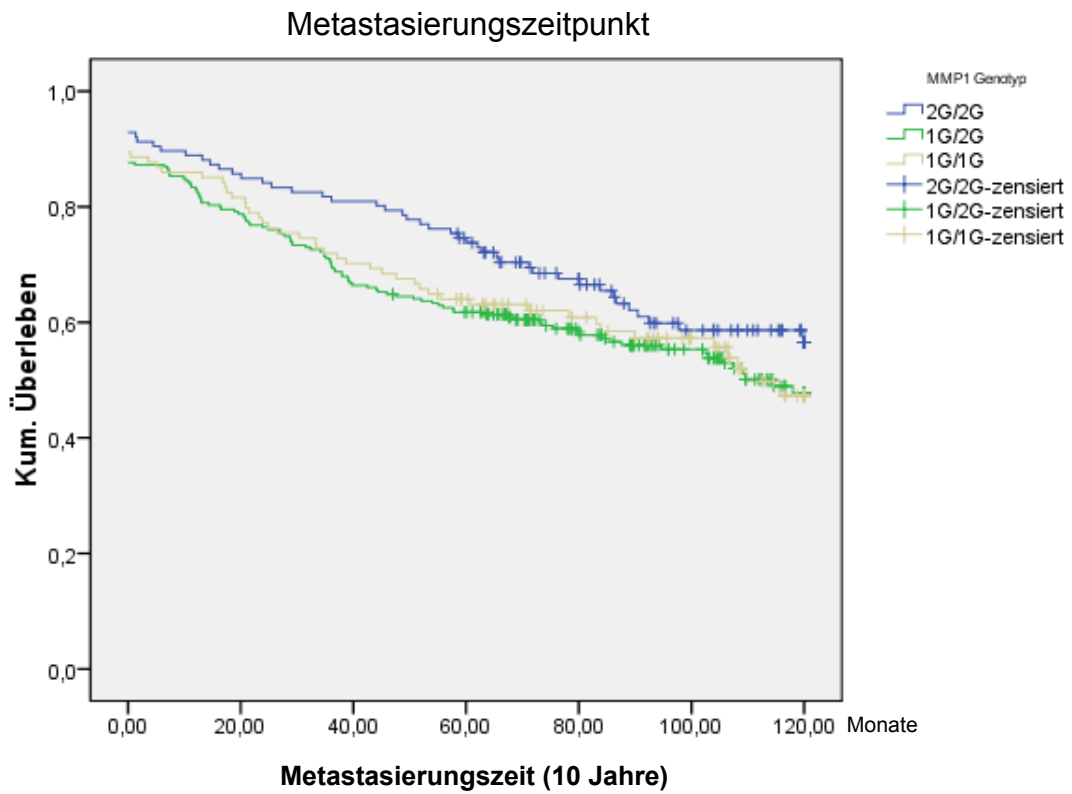


Abb. 23 Kaplan Mayer Kurve zu Metastasierungszeitpunkt

Variablen/Risikofaktoren für Metastasierung in der Gleichung

	Signifikanz	Exp(B)	95,0% Konfidenzinterv. für Exp(B)	
			Untere	Obere
MMP1	,320	1,107	,906	1,351
Grading	,224	1,196	,896	1,596
Tumorgröße	,000	1,954	1,451	2,632
Lymphknoten	,006	1,503	1,122	2,016
Rezeptoren	,494	,886	,626	1,254

Tab. 8 Multivariatanalyse zu Metastasierung

3.1.3 Tumorcharakteristika

Der potentielle Kontext zwischen MMP-1 Genotypen und den Tumorcharakteristika, sowie die Assoziation zum Patientinnenalter sind in der Tab. 9 dargestellt.

		2G/2G	1G/2G	1G/1G	P
Tumorgröße	<2cm	65 (53,3)	122 (48,4)	65 (57,5)	0,25
	>2cm	57 (46,7)	130 (51,6)	48 (42,5)	
Histologischer Grad	1 & 2	64 (53,3)	112 (45,2)	61 (55,0)	0,14
	3 & 4	56 (46,7)	136 (54,8)	50 (45,0)	
Lymphknotenmetastasen	Neg.	56 (45,9)	117 (46,6)	52 (46,5)	0,99
	Pos.	66 (54,1)	134 (53,4)	59 (53,2)	
Östrogenrezeptor	Neg.	31 (25,8)	57 (22,4)	32 (29,1)	0,37
	Pos.	89 (74,2)	198 (77,6)	78 (70,9)	
Progesteronrezeptor	Neg.	37 (31,1)	94 (37,0)	37 (33,9)	0,52
	Pos.	82 (68,9)	160 (63,0)	72 (66,1)	
Alter bei Diagnose	Jahre	56,9±10,9	56,7±10,7	56,4±11,2	0,9

Tab. 9 Tumorcharakteristika

4 Diskussion

Der Vorgang der Gewebeeinfiltration, das angrenzende Gewebe zu penetrieren und in weiterer Folge zu metastasieren wird unter anderem maßgeblich von Matrix-Metalloproteinasen beeinflusst. Da einige Mitglieder der MMP-Familie, wie z.B. die interstitielle Kollagenase in verschiedenen Karzinomtypen, wie auch bei Mammakarzinomen überexprimiert sind und Polymorphismen in den MMP Genen eine wesentliche Rolle für die MMP-Expression darstellen, war das Ziel dieser Studie die Überprüfung der Beeinflussung eines MMP-1 Genpolymorphismus auf die Krankheitsentstehung und Metastasierung von Brustkrebs.

In dieser Studie konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang, zwischen den Matrix-Metalloproteinasen 1 Genotypen und einem Risiko an Mammakarzinom zu erkranken, nachgewiesen werden.

Mittels einer Multivariatanalyse konnte auch keine signifikante Assoziation zwischen den MMP-1 Genotypen und der Metastasierungswahrscheinlichkeit beobachtet werden. Tumorgrading, Rezeptorstatus, Tumorgröße und Lymphknotenstatus wurden dabei als zusätzliche Variablen in die Berechnung miteinbezogen.

Es konnte auch kein Überlebensvorteil zwischen den Genotypen festgestellt werden.

In einer Studie konnte der MMP-1-1607 1G/2G Polymorphismus mit einem gesteigerten Risiko für die Entstehung eines Nasopharyngealkarzinoms,²⁵⁴ sowie in einer zweiten mit erhöhtem Lungenkrebsrisiko²⁵⁵ assoziiert werden.

Der Grund warum in der vorliegenden Studie, im Gegensatz zu den beiden oben genannten Assoziationsstudien, kein signifikanter Unterschied zu diversen Mammakarzinomcharakteristika beziehungsweise zu den Überlebenszeiten bei Erkrankung gesehen werden konnte, könnte am Tumortyp selbst liegen.

Das heißt im Speziellen, dass Matrixmetalloproteinasen unter Umständen bei Nasopharyngealkarzinomen eine größere Bedeutung haben könnten als beim Mammakarzinom. Dort spielen möglicherweise Wachstumsfaktoren wie der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor oder hormonabhängige Prozesse eine bedeutendere Rolle.

Auch kann es natürlich am Design der Studie selbst liegen. In unserer Studie haben wir es mit inzidenten Patientinnen zu tun. Das heißt, dass durch dieses retrospektive Design ein Überlebensnachteil vorhanden sein könnte. Im Speziellen wäre die Möglichkeit, dass Patientinnen mit einem gewissen Genotyp kürzer leben und daher nie in unsere Studie, aufgrund der kürzeren Lebenszeit, eingebracht werden konnten.

Ein weiterer Grund für dieses Nullergebnis könnte auch darin liegen, dass klassische Risikofaktoren für die Entstehung von Brustkrebs wie Menarche, Anzahl der Schwangerschaften, Östrogensubstitutionstherapie, Alkohol, Nikotin und dergleichen nicht erhoben wurden und aufgrund des retrospektiven Designs auch nicht erhebbar sind.

Einige Mitglieder der MMP-Familie sind in vielen Karzinomtypen, sowie auch bei Mammakarzinomen in hohem Ausmaß überexprimiert. Zu ihnen gehören Stromelysin-3 (MMP-11), Gelatinase-A (MMP-2), Gelatinase-B (MMP-9), interstitielle Kollagenase (MMP-1) und Stromelysin-1 (MMP-3).

MMP-1, -9, -12, -14 und -15 sind mit einem ungünstigeren outcome bei Brustkrebspatientinnen assoziiert.²⁵⁶ Diese MMPs sind wahrscheinlich in die Mammakarzinomprogression involviert und könnten gute Ziele für spezielle MMP-Inhibitoren in der Brustkrebsbehandlung sein.

Umfangreichere Daten über die Rolle der MMP Polymorphismen für Brustkrebs könnten helfen, das individuelle Brustkrebsrisiko genauer zu bestimmen und gegebenenfalls vorsorgende Maßnahmen zu ergreifen.

Da eine stärkere Expression der MMPs im Brustkrebsgewebe in mehreren Studien nachgewiesen wurde und das wiederum mit einer Tumorprogression in Zusammenhang stehen könnte, sind die MMPs hervorragende Kandidaten, um weitere Studien bezüglich der Auswirkungen auf Brustkrebs durchzuführen.

Der Protease-aktivierte Rezeptor (PAR1) ist ein G Protein-gekoppelter Rezeptor, der im normalen Brustepithel nicht vorkommt, aber im invasiven Brustkrebsgewebe überexprimiert wird. MMP-1 aktiviert äußerst stark die PAR1-Akt Überlebensdauer in Mammakarzinomzellen. In einer Studie konnte der Vorteil von der Blockade der MMP1-PAR1-Signalisierung bei fortgeschrittenen, metastasierten Mammakarzinom gezeigt werden, im Gegensatz zur Taxoteretherapie allein.²⁵⁷

Zurzeit werden MMP-Inhibitoren in klinischen Phase 1-3 Studien getestet. Die Bestimmung von MMP Genotypen könnte daher weiters eines Tages helfen, eine „maßgeschneiderte“ Therapie mit MMP-Inhibitoren zu ermöglichen.

5 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Katharina Hirschmann
Geburtsdatum	23. Februar 1985 in Leoben
Staatsbürgerschaft	Österreich
Adresse	Laimburggasse 16/8, 8010 Graz
Email	kathi_hirschmann@gmx.at

Schulische Ausbildung

1995 – 2003	Bundesgymnasium und Bundesrealgymnasium Fürstenfeld
07/2003	Reifeprüfung

Praktika

2002	Im Altenheim Augustinerhof in Fürstenfeld – 4 Wochen
07/2004	Praktikum beim Allgemeinmediziner Dr. Zechner in Großwilfersdorf – 4 Wochen

Universitäre Ausbildung

Seit Oktober 2003	Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Universität Graz 1.Studienabschnitt: Abschluss im September 2004 2.Studienabschnitt: Abschluss im Februar 2009 3.Studienabschnitt: seit März 2009, voraussichtlicher Abschluss April 2010
--------------------------	--

Zusatzausbildungen

- 2009** Sonographiekurs Innere Medizin
- 2009** EKG-Fallbeispiele
- 2009** Schilddrüsensonographiekurs
- 2009** Lungenfunktion
- 2009** Praktische Gastroenterologie und Hepatologie
- 2009** Seminar der Inneren Medizin mit besonderer Berücksichtigung von Kreislauf- und Stoffwechselerkrankungen
- 2008** EKG - Seminar
- 2007** Seminar der Inneren Medizin bei Prof. Skrabal
- 2006** Ernährung und Krebsentstehung
- 2005** Intubationskurs
- 2005** Ringvorlesung Schmerz
- 2005** Ringvorlesung Notfallmedizin

+spez. Track „Kommunikation, Supervision, Reflexion“
(entspricht „Psy-1“ Diplom im alten Curriculum)

+Im Rahmen von Famulaturen und Praktischem Jahr hatte ich auch die Möglichkeit am Notarztwagen bei der Erstversorgung von Patienten mitzuhelfen und mein Wissen über Notfallmedizin zu vertiefen.

Famulaturen

- Allgemeinchirurgie** Landeskrankenhaus Fürstenfeld
(3 Wochen – 2005)
- Anästhesie** Universitätsklinik Graz,
(3 Wochen – 2006)
- Innere Medizin** Landeskrankenhaus Feldbach,
(3 Wochen – 2007)

Innere Medizin	Landeskrankenhaus Fürstenfeld, (5 Wochen – 2007)
Radiologie	Westmead-Hospital in Sydney, Australien (3 Wochen – 2007)
Anästhesie	Universitätsklinik von La Laguna, Spanien (3 Wochen – 2008)
Kardiologie	Universitätsklinik von La Laguna, Spanien (2 Wochen – 2008)
Innere Medizin	Landeskrankenhaus Fürstenfeld, (4 Wochen – 2008)
Innere Medizin & Pädiatrie	Nyakato Health Center in Tansania, Afrika (4 Wochen – 2009)
Gynäkologie & Geburtshilfe	Sekou Toure Hospital in Mwanza, Tansania, Afrika (4 Tage – 2009)

Praktisches Studienjahr (11. und 12. Semester)

Abteilung für Innere Medizin	Landeskrankenhaus Fürstenfeld 10 Wochen
Abteilung für Pädiatrie	Landeskrankenhaus Leoben 5 Wochen
Allgemeinmedizinfamulatur	Dr. Ederer, Weiz
Abteilung für Anästhesiologie	Landeskrankenhaus Graz West 10 Wochen (+Notarzdienste am NEF)

Auslandsaufenthalte

10/2007	Westmead Hospital in Sydney
02-08/2008	Auslandsemester an der Universität von La Laguna, Spanien
03/2009	Public Health Projekt und Famulatur in Mwanza, Tansania

Sonstiges

Englisch

fließend in Sprache und Schrift

Spanisch

gut

EDV

Microsoft Office, Endnote

6 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Mammakarzinomklassifikation

<http://vitanet.docmed.tv/index.php?id=273> [15.12.2009]

Abb. 2 Nichtinvasive Karzinome

www.bkk-heilberufe.de/Inhalt/Netdokter/krankheiten/showContent.html?name=010305
[15.12.2009]

Abb. 3 Lokalisationshäufigkeit

<http://www.fernseminare.ch/schnupperseminar-krebstherapie-nach-breuss> [15.12.2009]

Abb. 4 Bösartige Neubildungen der weiblichen Brust im Zeitverlauf

http://www.statistik.at/web_de/statistiken/gesundheit/krebserkrankungen/brust/020511.html
[15.12.2009]

Abb. 5 Standardisierte Mortalität für Brustkrebs in verschiedenen Ländern

McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics.[see comment]. BMJ. 2000;321(7261):624-628.

Abb. 6 Prozentualer Anteil aller Todesfälle von Brustkrebspatientinnen

McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics.[see comment]. BMJ. 2000;321(7261):624-628.

Abb. 7 Punktmutation

http://www.intelihealth.com/IH/ihtIH/WSWMD001/32193/32195/353894.html?d=dmGenetics_BasicContent [15.12.2009]

Abb. 8 Deletion

http://www.intelihealth.com/IH/ihtIH/WSWMD001/32193/32195/353894.html?d=dmGenetics_BasicContent [15.12.2009]

Abb. 9 Insertion

http://www.intelihealth.com/IH/ihtIH/WSWMD001/32193/32195/353894.html?d=dmGenetics_BasicContent [15.12.2009]

Abb. 10 Zellzyklus

<http://blog.cacophonie.de/2008/06/08/blogprojekt-scienceblog-the-regulation-of-chromosome-and-chromatid-seperation-is-dependent-on-the-apcc-oder-was-ich-eigentlich-grade-mache/>
[15.12.2009]

Abb. 11 Aktivierung von wachstumsderegulierenden Läsionen triggern

Wächterfunktionen, die, die Zelle vor Mutationen schützen.

Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. Nature. 2001;411(6835):342-348

Abb. 12 HPV

<http://www.tellsomeone.de/Humanes-Papillomavirus.aspx> [15.12.2009]

Abb. 13 HBV

http://www.planet-wissen.de/alltag_gesundheit/krankheiten/hepatitis/hepatitis_alphabet.jsp
[15.12.2009]

Abb. 14 EBV

<http://stanford.wellsphere.com/wellpage/adult-acute-necrotizing-encephalitis-herpetic>
[15.12.2009]

Abb. 15 HHV-8

<http://www.microbiologybytes.com/virology/HHV8.html> [15.12.2009]

Abb. 16 HCV

http://www.sflorg.com/sciencenews/scn110806_02.html [15.12.2009]

Abb. 17 Zellkern, Chromosom, Gene

<http://publications.nigms.nih.gov/thenewgenetics/chapter1.html> [15.12.2009]

Abb. 18 DNA

<http://publications.nigms.nih.gov/thenewgenetics/chapter1.html> [15.12.2009]

Abb. 19 Denaturierung

<http://www.nymphenburger-gymnasium.de/gkbio/gentech/gentech.html>
[15.12.2009]

Abb. 20 Annealing

<http://www.nymphenburger-gymnasium.de/gkbio/gentech/gentech.html> [15.12.2009]

Abb. 21 Elongation

<http://www.nymphenburger-gymnasium.de/gkbio/gentech/gentech.html> [15.12.2009]

Abb. 22 Schematische Darstellung des PCR-Zyklus

<http://de.wikipedia.org/wiki/Polymerase-Kettenreaktion> [15.12.2009]

Abb. 23 Kaplan Mayer Kurve zu Metastasierungszeitpunkt

.

7 Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Histologische Einteilung der Mammakarzinome

http://www.onkodin.de/zms/content/e2/e32345/e32485/index_ger.html [15.12.2009]

Tab. 2 Mammakarzinomrisikofaktoren

McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics.[see comment]. *BMJ*. 2000;321(7261):624-628.

Tab. 3 Hormonvermittelte Indikatoren des Brustkrebsrisikos

Clemons M, Goss P. Estrogen and the risk of breast cancer.[erratum appears in *N Engl J Med* 2001 Jun 7;344(23):1804]. *New England Journal of Medicine*. 2001;344(4):276-285.

Tab. 4 Gesamtrisiko für eine Mammakarzinomentstehung

Tab. 5 Chi-Quadrat-Tests

Tab. 6 Risiko einer Metastasierung

Tab. 7 Chi-Quadrat-Tests

Tab. 8 Multivariatanalyse zu Metastasierung

8 Literaturliste

1. Böcker Werner DH, Heitz Philipp U. *Pathologie*. Vol 3. Auflage. München: Elsevier GmbH; 2004. S. 987
2. van Bogaert LJ. Recent progress in the histological typing of human breast tumours. *Diagnostic Histopathology*. 1981;4(4):349-353.
3. Sainsbury JR, Anderson TJ, Morgan DA. ABC of breast diseases: breast cancer. *BMJ*. 2000;321(7263):745-750.
4. Rosen PP, Braun DW, Jr., Kinne DE. The clinical significance of pre-invasive breast carcinoma. *Cancer*. 1980;46(4 Suppl):919-925.
5. Page DL, Dupont WD, Rogers LW, Landenberger M. Intraductal carcinoma of the breast: follow-up after biopsy only. *Cancer*. 1982;49(4):751-758.
6. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*. 2005;55(2):74-108.
7. Schmoll H HK, Possinger K, . *Kompendium internistische Onkologie*. Vol 4. Auflage. Heidelberg: Springer; 2006. S. 4215-4220
8. Untch M SH. *Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms*. Vol 5. Auflage. München, Wien, New York: Zuckschwerdt; 2008. S. 19
9. Biglia N, Defabiani E, Ponzone R, Mariani L, Marengo D, Sismondi P. Management of risk of breast carcinoma in postmenopausal women. *Endocrine-Related Cancer*. 2004;11(1):69-83.
10. <http://www.statistik.at/>.
11. Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 2000. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*. 2000;50(1):7-33.
12. McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics.[see comment]. *BMJ*. 2000;321(7261):624-628.
13. Hulka BS, Moorman PG. Breast cancer: hormones and other risk factors.[reprint in *Maturitas*. 2008 Sep-Oct;61(1-2):203-13; discussion 213; PMID: 19434892]. *Maturitas*. 2001;38(1):103-113; discussion 113-106.

14. Bilimoria MM, Morrow M. The woman at increased risk for breast cancer: evaluation and management strategies. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*. 1995;45(5):263-278.
15. Nkondjock A, Ghadirian P. [Risk factors and risk reduction of breast cancer]. *M S-Medecine Sciences*. 2005;21(2):175-180.
16. De Waard F, Cornelis JP, Aoki K, Yoshida M. Breast cancer incidence according to weight and height in two cities of the Netherlands and in Aichi prefecture, Japan. *Cancer*. 1977;40(3):1269-1275.
17. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults.[see comment]. *New England Journal of Medicine*. 2003;348(17):1625-1638.
18. Trentham-Dietz A, Newcomb PA, Egan KM, Titus-Ernstoff L, Baron JA, Storer BE, Stampfer M, Willett WC. Weight change and risk of postmenopausal breast cancer (United States). *Cancer Causes & Control*. 2000;11(6):533-542.
19. Hunter DJ, Spiegelman D, Adami HO, Beeson L, van den Brandt PA, Folsom AR, Fraser GE, Goldbohm RA, Graham S, Howe GR, et al. Cohort studies of fat intake and the risk of breast cancer--a pooled analysis.[see comment]. *New England Journal of Medicine*. 1996;334(6):356-361.
20. Mezzetti M, La Vecchia C, Decarli A, Boyle P, Talamini R, Franceschi S. Population attributable risk for breast cancer: diet, nutrition, and physical exercise.[see comment][erratum appears in J Natl Cancer Inst 2000 May 17;92(10):845]. *Journal of the National Cancer Institute*. 1998;90(5):389-394.
21. Howe G, Rohan T, Decarli A, Iscovich J, Kaldor J, Katsouyanni K, Marubini E, Miller A, Riboli E, Toniolo P, et al. The association between alcohol and breast cancer risk: evidence from the combined analysis of six dietary case-control studies. *International Journal of Cancer*. 1991;47(5):707-710.
22. Singletary KW, Gapstur SM. Alcohol and breast cancer: review of epidemiologic and experimental evidence and potential mechanisms. *JAMA*. 2001;286(17):2143-2151.
23. 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.[see comment]. *JAMA*. 1998;279(7):535-540.
24. Li Y, Baer D, Friedman GD, Udaltsova N, Shim V, Klatsky AL. Wine, liquor, beer and risk of breast cancer in a large population. *European Journal of Cancer*. 2009;45(5):843-850.

25. Longnecker MP. Alcoholic beverage consumption in relation to risk of breast cancer: meta-analysis and review. *Cancer Causes & Control*. 1994;5(1):73-82.
26. Gapstur SM, Potter JD, Sellers TA, Folsom AR. Increased risk of breast cancer with alcohol consumption in postmenopausal women.[see comment]. *American Journal of Epidemiology*. 1992;136(10):1221-1231.
27. Reichman ME, Judd JT, Longcope C, Schatzkin A, Clevidence BA, Nair PP, Campbell WS, Taylor PR. Effects of alcohol consumption on plasma and urinary hormone concentrations in premenopausal women.[see comment]. *Journal of the National Cancer Institute*. 1993;85(9):722-727.
28. Zhang S, Hunter DJ, Hankinson SE, Giovannucci EL, Rosner BA, Colditz GA, Speizer FE, Willett WC. A prospective study of folate intake and the risk of breast cancer. *JAMA*. 1999;281(17):1632-1637.
29. Poschl G, Seitz HK. Alcohol and cancer. *Alcohol & Alcoholism*. 2004;39(3):155-165.
30. Onland-Moret NC, Peeters PHM, van der Schouw YT, Grobbee DE, van Gils CH. Alcohol and endogenous sex steroid levels in postmenopausal women: a cross-sectional study. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2005;90(3):1414-1419.
31. Tseng M, Weinberg CR, Umbach DM, Longnecker MP. Calculation of population attributable risk for alcohol and breast cancer (United States). *Cancer Causes & Control*. 1999;10(2):119-123.
32. Freudenheim JL, Marshall JR, Vena JE, Laughlin R, Brasure JR, Swanson MK, Nemoto T, Graham S. Premenopausal breast cancer risk and intake of vegetables, fruits, and related nutrients. *Journal of the National Cancer Institute*. 1996;88(6):340-348.
33. Glade MJ. Food, nutrition, and the prevention of cancer: a global perspective. American Institute for Cancer Research/World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research, 1997. *Nutrition*. 1999;15(6):523-526.
34. Szabo CI, King MC. Population genetics of BRCA1 and BRCA2.[comment]. *American Journal of Human Genetics*. 1997;60(5):1013-1020.
35. Campeau PM, Foulkes WD, Tischkowitz MD. Hereditary breast cancer: new genetic developments, new therapeutic avenues. *Human Genetics*. 2008;124(1):31-42.

36. Walsh T, Casadei S, Coats KH, Swisher E, Stray SM, Higgins J, Roach KC, Mandell J, Lee MK, Ciernikova S, Foretova L, Soucek P, King M-C. Spectrum of mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2, and TP53 in families at high risk of breast cancer.[see comment]. *JAMA*. 2006;295(12):1379-1388.
37. Lynch HT, Silva E, Snyder C, Lynch JF. Hereditary breast cancer: part I. Diagnosing hereditary breast cancer syndromes. *Breast Journal*. 2008;14(1):3-13.
38. Struewing JP, Hartge P, Wacholder S, Baker SM, Berlin M, McAdams M, Timmerman MM, Brody LC, Tucker MA. The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews.[see comment]. *New England Journal of Medicine*. 1997;336(20):1401-1408.
39. Thompson D, Easton DF, Breast Cancer Linkage C. Cancer Incidence in BRCA1 mutation carriers.[see comment]. *Journal of the National Cancer Institute*. 2002;94(18):1358-1365.
40. Debniak T, Scott RJ, Gorski B, Cybulski C, van de Wetering T, Serrano-Fernandez P, Huzarski T, Byrski T, Nagay L, Debniak B, Kowalska E, Jakubowska A, Gronwald J, Wokolorczyk D, Maleszka R, Kladny J, Lubinski J. Common variants of DNA repair genes and malignant melanoma. *European Journal of Cancer*. 2008;44(1):110-114.
41. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, Collins N, Gregory S, Gumbs C, Micklem G. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2.[see comment][erratum appears in Nature 1996 Feb 22;379(6567):749]. *Nature*. 1995;378(6559):789-792.
42. Ford D, Easton DF, Bishop DT, Narod SA, Goldgar DE. Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. *Lancet*. 1994;343(8899):692-695.
43. Hogervorst FB, Cornelis RS, Bout M, van Vliet M, Oosterwijk JC, Olmer R, Bakker B, Klijn JG, Vasen HF, Meijers-Heijboer H, et al. Rapid detection of BRCA1 mutations by the protein truncation test. *Nature Genetics*. 1995;10(2):208-212.
44. Biesecker BB, Boehnke M, Calzone K, Markel DS, Garber JE, Collins FS, Weber BL. Genetic counseling for families with inherited susceptibility to breast and ovarian cancer.[erratum appears in JAMA 1993 Aug 18;270(7):832]. *JAMA*. 1993;269(15):1970-1974.
45. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*. 1994;266(5182):66-71.

46. Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D, Collins N, Nguyen K, Seal S, Tran T, Averill D, et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science*. 1994;265(5181):2088-2090.
47. Boulton SJ. Cellular functions of the BRCA tumour-suppressor proteins. *Biochemical Society Transactions*. 2006;34(Pt 5):633-645.
48. Chen JJ, Silver D, Cantor S, Livingston DM, Scully R. BRCA1, BRCA2, and Rad51 operate in a common DNA damage response pathway. *Cancer Research*. 1999;59(7 Suppl):1752s-1756s.
49. Ford D, Easton DF, Stratton M, Narod S, Goldgar D, Devilee P, Bishop DT, Weber B, Lenoir G, Chang-Claude J, Sobol H, Teare MD, Struwing J, Arason A, Scherneck S, Peto J, Rebbeck TR, Tonin P, Neuhausen S, Barkardottir R, Eyfjord J, Lynch H, Ponder BA, Gayther SA, Zelada-Hedman M, et al. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *American Journal of Human Genetics*. 1998;62(3):676-689.
50. Easton DF, Narod SA, Ford D, Steel M. The genetic epidemiology of BRCA1. Breast Cancer Linkage Consortium. *Lancet*. 1994;344(8924):761.
51. Hartmann LC, Schaid DJ, Woods JE, Crotty TP, Myers JL, Arnold PG, Petty PM, Sellers TA, Johnson JL, McDonnell SK, Frost MH, Jenkins RB. Efficacy of bilateral prophylactic mastectomy in women with a family history of breast cancer.[see comment]. *New England Journal of Medicine*. 1999;340(2):77-84.
52. Hartmann LC, Sellers TA, Schaid DJ, Frank TS, Soderberg CL, Sitta DL, Frost MH, Grant CS, Donohue JH, Woods JE, McDonnell SK, Vockley CW, Deffenbaugh A, Couch FJ, Jenkins RB. Efficacy of bilateral prophylactic mastectomy in BRCA1 and BRCA2 gene mutation carriers.[see comment]. *Journal of the National Cancer Institute*. 2001;93(21):1633-1637.
53. Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF, Jr., Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA, et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms.[see comment][erratum appears in Science. 1993 Feb 12;259(5097):878; PMID: 8438145]. *Science*. 1990;250(4985):1233-1238.
54. Sidransky D, Tokino T, Helzlsouer K, Zehnbauer B, Rausch G, Shelton B, Prestigiacomo L, Vogelstein B, Davidson N. Inherited p53 gene mutations in breast cancer. *Cancer Research*. 1992;52(10):2984-2986.
55. Coles C, Condie A, Chetty U, Steel CM, Evans HJ, Prosser J. p53 mutations in breast cancer. *Cancer Research*. 1992;52(19):5291-5298.

56. Boice JD, Jr., Preston D, Davis FG, Monson RR. Frequent chest X-ray fluoroscopy and breast cancer incidence among tuberculosis patients in Massachusetts. *Radiation Research*. 1991;125(2):214-222.
57. Tokunaga M, Land CE, Tokuoka S, Nishimori I, Soda M, Akiba S. Incidence of female breast cancer among atomic bomb survivors, 1950-1985. *Radiation Research*. 1994;138(2):209-223.
58. Gervais-Fagnou DD, Girouard C, Laperriere N, Pintillie M, Goss PE. Breast cancer in women following supradiaphragmatic irradiation for Hodgkin's disease. *Oncology*. 1999;57(3):224-231.
59. Aisenberg AC, Finkelstein DM, Doppke KP, Koerner FC, Boivin JF, Willett CG. High risk of breast carcinoma after irradiation of young women with Hodgkin's disease. *Cancer*. 1997;79(6):1203-1210.
60. Clemons M, Goss P. Estrogen and the risk of breast cancer.[erratum appears in N Engl J Med 2001 Jun 7;344(23):1804]. *New England Journal of Medicine*. 2001;344(4):276-285.
61. Henderson BE, Ross R, Bernstein L. Estrogens as a cause of human cancer: the Richard and Hinda Rosenthal Foundation award lecture. *Cancer Research*. 1988;48(2):246-253.
62. Gail MH, Brinton LA, Byar DP, Corle DK, Green SB, Schairer C, Mulvihill JJ. Projecting individualized probabilities of developing breast cancer for white females who are being examined annually.[see comment]. *Journal of the National Cancer Institute*. 1989;81(24):1879-1886.
63. Rosner B, Colditz GA, Iglehart JD, Hankinson SE. Risk prediction models with incomplete data with application to prediction of estrogen receptor-positive breast cancer: prospective data from the Nurses' Health Study. *Breast Cancer Research*. 2008;10(4):R55.
64. Huang Z, Hankinson SE, Colditz GA, Stampfer MJ, Hunter DJ, Manson JE, Hennekens CH, Rosner B, Speizer FE, Willett WC. Dual effects of weight and weight gain on breast cancer risk.[see comment]. *JAMA*. 1997;278(17):1407-1411.
65. Cancer CGoHFiB. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer.[see comment][erratum appears in Lancet 1997 Nov 15;350(9089):1484]. *Lancet*. 1997;350(9084):1047-1059.

66. Hankinson SE, Willett WC, Manson JE, Colditz GA, Hunter DJ, Spiegelman D, Barbieri RL, Speizer FE. Plasma sex steroid hormone levels and risk of breast cancer in postmenopausal women.[see comment]. *Journal of the National Cancer Institute*. 1998;90(17):1292-1299.
67. Cauley JA, Lucas FL, Kuller LH, Stone K, Browner W, Cummings SR. Elevated serum estradiol and testosterone concentrations are associated with a high risk for breast cancer. Study of Osteoporotic Fractures Research Group.[see comment]. *Annals of Internal Medicine*. 1999;130(4 Pt 1):270-277.
68. Kelsey JL, Gammon MD, John EM. Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiologic Reviews*. 1993;15(1):36-47.
69. Okobia MN, Bunker CH. Epidemiological risk factors for breast cancer--a review. *Nigerian Journal of Clinical Practice*. 2005;8(9):35-42.
70. Bernstein L. Epidemiology of endocrine-related risk factors for breast cancer. *Journal of Mammary Gland Biology & Neoplasia*. 2002;7(1):3-15.
71. Trichopoulos D, MacMahon B, Cole P. Menopause and breast cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute*. 1972;48(3):605-613.
72. Titus-Ernstoff L, Longnecker MP, Newcomb PA, Dain B, Greenberg ER, Mittendorf R, Stampfer M, Willett W. Menstrual factors in relation to breast cancer risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 1998;7(9):783-789.
73. MacMahon B, Cole P, Brown J. Etiology of human breast cancer: a review. *Journal of the National Cancer Institute*. 1973;50(1):21-42.
74. MacMahon B, Cole P, Lin TM, Lowe CR, Mirra AP, Ravnihar B, Salber EJ, Valaoras VG, Yuasa S. Age at first birth and breast cancer risk. *Bulletin of the World Health Organization*. 1970;43(2):209-221.
75. Pathak DR, Osuch JR, He J. Breast carcinoma etiology: current knowledge and new insights into the effects of reproductive and hormonal risk factors in black and white populations. *Cancer*. 2000;88(5 Suppl):1230-1238.
76. Russo J, Hu YF, Yang X, Russo IH. Developmental, cellular, and molecular basis of human breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2000;Monographs.(27):17-37.
77. Rebbeck TR, Levin AM, Eisen A, Snyder C, Watson P, Cannon-Albright L, Isaacs C, Olopade O, Garber JE, Godwin AK, Daly MB, Narod SA, Neuhausen SL, Lynch HT, Weber BL. Breast cancer risk after bilateral prophylactic oophorectomy in BRCA1 mutation carriers.[see comment]. *Journal of the National Cancer Institute*. 1999;91(17):1475-1479.

78. Steinberg KK, Thacker SB, Smith SJ, Stroup DF, Zack MM, Flanders WD, Berkelman RL. A meta-analysis of the effect of estrogen replacement therapy on the risk of breast cancer.[see comment][erratum appears in JAMA 1991 Sep 11;266(10):1362]. *JAMA*. 1991;265(15):1985-1990.
79. Sillero-Arenas M, Delgado-Rodriguez M, Rodigues-Canteras R, Bueno-Cavanillas A, Galvez-Vargas R. Menopausal hormone replacement therapy and breast cancer: a meta-analysis. *Obstetrics & Gynecology*. 1992;79(2):286-294.
80. Schairer C, Lubin J, Troisi R, Sturgeon S, Brinton L, Hoover R. Menopausal estrogen and estrogen-progestin replacement therapy and breast cancer risk.[see comment][erratum appears in JAMA 2000 Nov 22-29;284(20):2597]. *JAMA*. 2000;283(4):485-491.
81. Ross RK, Paganini-Hill A, Wan PC, Pike MC. Effect of hormone replacement therapy on breast cancer risk: estrogen versus estrogen plus progestin.[see comment]. *Journal of the National Cancer Institute*. 2000;92(4):328-332.
82. Chlebowski RT, Hendrix SL, Langer RD, Stefanick ML, Gass M, Lane D, Rodabough RJ, Gilligan MA, Cyr MG, Thomson CA, Khandekar J, Petrovitch H, McTiernan A, Investigators WHI. Influence of estrogen plus progestin on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women: the Women's Health Initiative Randomized Trial.[see comment]. *JAMA*. 2003;289(24):3243-3253.
83. Gapstur SM, Morrow M, Sellers TA. Hormone replacement therapy and risk of breast cancer with a favorable histology: results of the Iowa Women's Health Study.[see comment]. *JAMA*. 1999;281(22):2091-2097.
84. Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer.[see comment]. *Lancet*. 1996;347(9017):1713-1727.
85. Hankinson SE, Colditz GA, Manson JE, Willett WC, Hunter DJ, Stampfer MJ, Speizer FE. A prospective study of oral contraceptive use and risk of breast cancer (Nurses' Health Study, United States). *Cancer Causes & Control*. 1997;8(1):65-72.
86. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast C. Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease.[see comment][comment]. *Lancet*. 2002;360(9328):187-195.
87. Wingo PA, Lee NC, Ory HW, Beral V, Peterson HB, Rhodes P. Age-specific differences in the relationship between oral contraceptive use and breast cancer. *Obstetrics & Gynecology*. 1991;78(2):161-170.

88. London SJ, Connolly JL, Schnitt SJ, Colditz GA. A prospective study of benign breast disease and the risk of breast cancer.[erratum appears in JAMA 1992 Apr 1;267(13):1780]. *JAMA*. 1992;267(7):941-944.
89. Dupont WD, Page DL. Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. *New England Journal of Medicine*. 1985;312(3):146-151.
90. Byrne C, Schairer C, Brinton LA, Wolfe J, Parekh N, Salane M, Carter C, Hoover R. Effects of mammographic density and benign breast disease on breast cancer risk (United States). *Cancer Causes & Control*. 2001;12(2):103-110.
91. Fabian CJ, Kimler BF. Mammographic density: use in risk assessment and as a biomarker in prevention trials. *Journal of Nutrition*. 2006;136(10):2705S-2708S.
92. Boyd NF, Lockwood GA, Byng JW, Tritchler DL, Yaffe MJ. Mammographic densities and breast cancer risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 1998;7(12):1133-1144.
93. Brisson J, Sadowsky NL, Twaddle JA, Morrison AS, Cole P, Merletti F. The relation of mammographic features of the breast to breast cancer risk factors. *American Journal of Epidemiology*. 1982;115(3):438-443.
94. Saftlas AF, Hoover RN, Brinton LA, Szklo M, Olson DR, Salane M, Wolfe JN. Mammographic densities and risk of breast cancer.[see comment]. *Cancer*. 1991;67(11):2833-2838.
95. Knight JA, Martin LJ, Greenberg CV, Lockwood GA, Byng JW, Yaffe MJ, Tritchler DL, Boyd NF. Macronutrient intake and change in mammographic density at menopause: results from a randomized trial. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 1999;8(2):123-128.
96. Greendale GA, Reboussin BA, Sie A, Singh HR, Olson LK, Gatewood O, Bassett LW, Wasilaukas C, Bush T, Barrett-Connor E. Effects of estrogen and estrogen-progestin on mammographic parenchymal density. Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Investigators. *Annals of Internal Medicine*. 1999;130(4 Pt 1):262-269.
97. Byrne C, Schairer C, Wolfe J, Parekh N, Salane M, Brinton LA, Hoover R, Haile R. Mammographic features and breast cancer risk: effects with time, age, and menopause status. *Journal of the National Cancer Institute*. 1995;87(21):1622-1629.
98. Boyd NF, Byng JW, Jong RA, Fishell EK, Little LE, Miller AB, Lockwood GA, Tritchler DL, Yaffe MJ. Quantitative classification of mammographic densities and breast cancer risk: results from the Canadian National Breast Screening Study. *Journal of the National Cancer Institute*. 1995;87(9):670-675.

99. Hsieh C, Pavia M, Lambe M, Lan SJ, Colditz GA, Ekblom A, Adami HO, Trichopoulos D, Willett WC. Dual effect of parity on breast cancer risk. *European Journal of Cancer*. 1994;30A(7):969-973.
100. Helewa M, Levesque P, Provencher D, Lea RH, Rosolowich V, Shapiro HM, Breast Disease Committee and Executive Committee and Council SoOaGoC. Breast cancer, pregnancy, and breastfeeding. *Journal of Obstetrics & Gynaecology Canada: JOGC*. 2002;24(2):164-180; quiz 181-164.
101. Thune I, Brenn T, Lund E, Gaard M. Physical activity and the risk of breast cancer.[see comment]. *New England Journal of Medicine*. 1997;336(18):1269-1275.
102. Chen CL, White E, Malone KE, Daling JR. Leisure-time physical activity in relation to breast cancer among young women (Washington, United States). *Cancer Causes & Control*. 1997;8(1):77-84.
103. Pieta B, Samulak D, Opala T, Iwanowicz-Palus G, Wilczak M, Grodecka-Gazdecka S, Wieznowska-Maczynska K. Women's lifestyle and the risk of breast tumors. *European Journal of Gynaecological Oncology*. 2009;30(2):186-189.
104. Kaaks R. Nutrition, hormones, and breast cancer: is insulin the missing link?[see comment]. *Cancer Causes & Control*. 1996;7(6):605-625.
105. Albanes D, Blair A, Taylor PR. Physical activity and risk of cancer in the NHANES I population. *American Journal of Public Health*. 1989;79(6):744-750.
106. Bernstein L, Henderson BE, Hanisch R, Sullivan-Halley J, Ross RK. Physical exercise and reduced risk of breast cancer in young women.[see comment]. *Journal of the National Cancer Institute*. 1994;86(18):1403-1408.
107. D'Avanzo B, Nanni O, La Vecchia C, Franceschi S, Negri E, Giacosa A, Conti E, Montella M, Talamini R, Decarli A. Physical activity and breast cancer risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 1996;5(3):155-160.
108. Gammon MD, John EM, Britton JA. Recreational and occupational physical activities and risk of breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 1998;90(2):100-117.
109. Lee IM, Rexrode KM, Cook NR, Hennekens CH, Burin JE. Physical activity and breast cancer risk: the Women's Health Study (United States). *Cancer Causes & Control*. 2001;12(2):137-145.
110. Friedenreich CM. Review of anthropometric factors and breast cancer risk. *European Journal of Cancer Prevention*. 2001;10(1):15-32.

111. Dirx MJ, Voorrips LE, Goldbohm RA, van den Brandt PA. Baseline recreational physical activity, history of sports participation, and postmenopausal breast carcinoma risk in the Netherlands Cohort Study. *Cancer*. 2001;92(6):1638-1649.
112. 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(3):271-278.
113. Baron JA, Newcomb PA, Longnecker MP, Mittendorf R, Storer BE, Clapp RW, Bogdan G, Yuen J. Cigarette smoking and breast cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 1996;5(5):399-403.
114. Egan KM, Stampfer MJ, Hunter D, Hankinson S, Rosner BA, Holmes M, Willett WC, Colditz GA, Nurses' Health S. Active and passive smoking in breast cancer: prospective results from the Nurses' Health Study.[see comment]. *Epidemiology*. 2002;13(2):138-145.
115. Lash TL, Aschengrau A. Active and passive cigarette smoking and the occurrence of breast cancer. *American Journal of Epidemiology*. 1999;149(1):5-12.
116. Johnson KC, Hu J, Mao Y, Canadian Cancer Registries Epidemiology Research G. Passive and active smoking and breast cancer risk in Canada, 1994-97. *Cancer Causes & Control*. 2000;11(3):211-221.
117. Khuder SA, Simon VJ, Jr. Is there an association between passive smoking and breast cancer? *European Journal of Epidemiology*. 2000;16(12):1117-1121.
118. Wartenberg D, Calle EE, Thun MJ, Heath CW, Jr., Lally C, Woodruff T. Passive smoking exposure and female breast cancer mortality.[see comment]. *Journal of the National Cancer Institute*. 2000;92(20):1666-1673.
119. Schmoll H HK, Possinger K,. *Kompendium internistische Onkologie*: Springer; 2006. S. 1-45
120. Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*. 2001;411(6835):342-348.
121. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
122. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature*. 1998;396(6712):643-649.
123. Balmain A, Gray J, Ponder B. The genetics and genomics of cancer. *Nature Genetics*. 2003;33 Suppl:238-244.

124. Löffler G. *Basiswissen Biochemie*: Springer; 2003. S. 729-741
125. Loeb LA, Loeb KR, Anderson JP. Multiple mutations and cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(3):776-781.
126. Wrba F. *Grundlagen der Tumorgenese*. Vol 2. Auflage. Wien: Facultas; 2001. S. 22-26
127. Buselmaier W. *Biologie für Mediziner*. Vol 9. Auflage: Springer; 2003. S. 86-97
128. Tsihlias J, Kapusta L, Slingerland J. The prognostic significance of altered cyclin-dependent kinase inhibitors in human cancer. *Annual Review of Medicine*. 1999;50:401-423.
129. Wyllie AH. Apoptosis. Death gets a brake.[comment]. *Nature*. 1994;369(6478):272-273.
130. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell*. 2004;116(2):205-219.
131. Hartwell LH, Weinert TA. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*. 1989;246(4930):629-634.
132. Elledge SJ. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science*. 1996;274(5293):1664-1672.
133. Pardee AB. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science*. 1989;246(4930):603-608.
134. Zetterberg A, Larsson O, Wiman KG. What is the restriction point? *Current Opinion in Cell Biology*. 1995;7(6):835-842.
135. Sherr CJ. G1 phase progression: cycling on cue.[see comment]. *Cell*. 1994;79(4):551-555.
136. Morgan DO. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annual Review of Cell & Developmental Biology*. 1997;13:261-291.
137. Jallepalli PV, Lengauer C. Chromosome segregation and cancer: cutting through the mystery. *Nature Reviews*. 2001;Cancer. 1(2):109-117.
138. Nigg EA. Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression? *Nature Reviews*. 2002;Cancer. 2(11):815-825.

139. Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science*. 1994;266(5192):1821-1828.
140. Nasmyth K. Segregating sister genomes: the molecular biology of chromosome separation. *Science*. 2002;297(5581):559-565.
141. Green DR. Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell*. 1998;94(6):695-698.
142. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis.[see comment]. *Nature*. 2000;407(6805):770-776.
143. Silbernagl S FL. *Taschenatlas der Pathophysiologie*: Thieme; 2005. S. 12
144. Rich T, Allen RL, Wyllie AH. Defying death after DNA damage. *Nature*. 2000;407(6805):777-783.
145. Weinberg RA. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Research*. 1989;49(14):3713-3721.
146. Wells A. EGF receptor. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 1999;31(6):637-643.
147. Klijn JG, Berns PM, Schmitz PI, Foekens JA. The clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer: a review on 5232 patients. *Endocrine Reviews*. 1992;13(1):3-17.
148. Bucci B, D'Agnano I, Botti C, Mottolise M, Carico E, Zupi G, Vecchione A. EGF-R expression in ductal breast cancer: proliferation and prognostic implications. *Anticancer Research*. 1997;17(1B):769-774.
149. Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Critical Reviews in Oncology-Hematology*. 1995;19(3):183-232.
150. Chow NH, Liu HS, Lee EI, Chang CJ, Chan SH, Cheng HL, Tzai TS, Lin JS. Significance of urinary epidermal growth factor and its receptor expression in human bladder cancer. *Anticancer Research*. 1997;17(2B):1293-1296.
151. Volm M, Rittgen W, Drings P. Prognostic value of ERBB-1, VEGF, cyclin A, FOS, JUN and MYC in patients with squamous cell lung carcinomas.[erratum appears in Br J Cancer 1998 Apr;77(7):1198]. *British Journal of Cancer*. 1998;77(4):663-669.

152. Maurizi M, Almadori G, Ferrandina G, Distefano M, Romanini ME, Cadoni G, Benedetti-Panici P, Paludetti G, Scambia G, Mancuso S. Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in laryngeal squamous cell carcinoma. *British Journal of Cancer*. 1996;74(8):1253-1257.
153. Frederick L, Wang XY, Eley G, James CD. Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas. *Cancer Research*. 2000;60(5):1383-1387.
154. Huang HS, Nagane M, Klingbeil CK, Lin H, Nishikawa R, Ji XD, Huang CM, Gill GN, Wiley HS, Cavenee WK. The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272(5):2927-2935.
155. Moscatello DK, Holgado-Madruga M, Godwin AK, Ramirez G, Gunn G, Zoltick PW, Biegel JA, Hayes RL, Wong AJ. Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer Research*. 1995;55(23):5536-5539.
156. Nagane M, Coufal F, Lin H, Bogler O, Cavenee WK, Huang HJ. A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis. *Cancer Research*. 1996;56(21):5079-5086.
157. Nishikawa R, Ji XD, Harmon RC, Lazar CS, Gill GN, Cavenee WK, Huang HJ. A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91(16):7727-7731.
158. Torregrosa D, Bolufer P, Lluch A, Lopez JA, Barragan E, Ruiz A, Guillem V, Munarriz B, Garcia Conde J. Prognostic significance of c-erbB-2/neu amplification and epidermal growth factor receptor (EGFR) in primary breast cancer and their relation to estradiol receptor (ER) status. *Clinica Chimica Acta*. 1997;262(1-2):99-119.
159. King CR, Kraus MH, Aaronson SA. Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science*. 1985;229(4717):974-976.
160. Hudis CA. Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice.[see comment]. *New England Journal of Medicine*. 2007;357(1):39-51.
161. Olayioye MA. Update on HER-2 as a target for cancer therapy: intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members. *Breast Cancer Research*. 2001;3(6):385-389.

162. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987;235(4785):177-182.
163. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*. 1989;244(4905):707-712.
164. Carlomagno C, Perrone F, Gallo C, De Laurentiis M, Lauria R, Morabito A, Pettinato G, Panico L, D'Antonio A, Bianco AR, De Placido S. c-erb B2 overexpression decreases the benefit of adjuvant tamoxifen in early-stage breast cancer without axillary lymph node metastases. *Journal of Clinical Oncology*. 1996;14(10):2702-2708.
165. Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Jr., Davidson NE, Tan-Chiu E, Martino S, Paik S, Kaufman PA, Swain SM, Pisansky TM, Fehrenbacher L, Kutteh LA, Vogel VG, Visscher DW, Yothers G, Jenkins RB, Brown AM, Dakhil SR, Mamounas EP, Lingle WL, Klein PM, Ingle JN, Wolmark N. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer.[see comment]. *New England Journal of Medicine*. 2005;353(16):1673-1684.
166. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, Gianni L, Baselga J, Bell R, Jackisch C, Cameron D, Dowsett M, Barrios CH, Steger G, Huang C-S, Andersson M, Inbar M, Lichinitser M, Lang I, Nitz U, Iwata H, Thomssen C, Lohrisch C, Suter TM, Ruschoff J, Suto T, Grotzer T, Ward C, Strahle C, McFadden E, Dolci MS, Gelber RD, Herceptin Adjuvant Trial Study T. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer.[see comment]. *New England Journal of Medicine*. 2005;353(16):1659-1672.
167. Joensuu H, Kellokumpu-Lehtinen P-L, Bono P, Alanko T, Kataja V, Asola R, Utriainen T, Kokko R, Hemminki A, Tarkkanen M, Turpeenniemi-Hujanen T, Jyrkkio S, Flander M, Helle L, Ingalsuo S, Johansson K, Jaaskelainen A-S, Pajunen M, Rauhala M, Kaleva-Kerola J, Salminen T, Leinonen M, Elomaa I, Isola J, FinHer Study I. Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer.[see comment]. *New England Journal of Medicine*. 2006;354(8):809-820.
168. Sherr CJ. Principles of tumor suppression. *Cell*. 2004;116(2):235-246.
169. Levine AJ. The tumor suppressor genes. *Annual Review of Biochemistry*. 1993;62:623-651.
170. Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1971;68(4):820-823.

171. Stanbridge EJ. Suppression of malignancy in human cells. *Nature*. 1976;260(5546):17-20.
172. Harbour JW, Dean DC. The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes & Development*. 2000;14(19):2393-2409.
173. Borresen AL, Andersen TI, Garber J, Barbier-Piroux N, Thorlacius S, Eyfjord J, Ottestad L, Smith-Sorensen B, Hovig E, Malkin D, et al. Screening for germ line TP53 mutations in breast cancer patients. *Cancer Research*. 1992;52(11):3234-3236.
174. Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Bigner SH, Davidson N, Baylin S, Devilee P, et al. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature*. 1989;342(6250):705-708.
175. Olivier M, Eeles R, Hollstein M, Khan MA, Harris CC, Hainaut P. The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Human Mutation*. 2002;19(6):607-614.
176. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science*. 1991;253(5015):49-53.
177. Malkin D. Germline p53 gene mutations and cancer--Pandora's box or open sesame?[comment]. *Journal of the National Cancer Institute*. 1994;86(5):326-328.
178. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*. 1997;88(3):323-331.
179. Klein G. Perspectives in studies of human tumor viruses. *Frontiers in Bioscience*. 2002;7:d268-274.
180. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature Reviews*. 2002;Cancer. 2(5):342-350.
181. Kalland K-H, Ke X-S, Oyan AM. Tumour virology--history, status and future challenges. *APMIS*. 2009;117(5-6):382-399.
182. Javier RT, Butel JS. The history of tumor virology. *Cancer Research*. 2008;68(19):7693-7706.
183. Carrillo-Infante C, Abbadessa G, Bagella L, Giordano A. Viral infections as a cause of cancer (review). *International Journal of Oncology*. 2007;30(6):1521-1528.
184. Damania B. DNA tumor viruses and human cancer. *Trends in Microbiology*. 2007;15(1):38-44.

185. Schiffman M, Castle PE. Human papillomavirus: epidemiology and public health. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2003;127(8):930-934.
186. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide.[see comment]. *Journal of Pathology*. 1999;189(1):12-19.
187. Lowy DR, Schiller JT. Prophylactic human papillomavirus vaccines. *Journal of Clinical Investigation*. 2006;116(5):1167-1173.
188. Kahn JA. HPV vaccination for the prevention of cervical intraepithelial neoplasia. *New England Journal of Medicine*. 2009;361(3):271-278.
189. Schutte K, Bornschein J, Malfertheiner P. Hepatocellular carcinoma--epidemiological trends and risk factors. *Digestive Diseases*. 2009;27(2):80-92.
190. Szmuness W. Hepatocellular carcinoma and the hepatitis B virus: evidence for a causal association. *Progress in Medical Virology*. 1978;24:40-69.
191. Lupberger J, Hildt E. Hepatitis B virus-induced oncogenesis. *World Journal of Gastroenterology*. 2007;13(1):74-81.
192. Pattle SB, Farrell PJ. The role of Epstein-Barr virus in cancer. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2006;6(11):1193-1205.
193. Burkitt DP. Classics in oncology. A sarcoma involving the jaws in African children. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*. 1972;22(6):345-355.
194. Blum KA, Lozanski G, Byrd JC. Adult Burkitt leukemia and lymphoma. *Blood*. 2004;104(10):3009-3020.
195. Ferry JA. Burkitt's lymphoma: clinicopathologic features and differential diagnosis. *Oncologist*. 2006;11(4):375-383.
196. Feller L, Wood NH, Lemmer J. HIV-associated Kaposi sarcoma: pathogenic mechanisms. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology & Endodontics*. 2007;104(4):521-529.
197. Ablashi DV, Chatlynne LG, Whitman JE, Jr., Cesarman E. Spectrum of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, or human herpesvirus 8, diseases. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002;15(3):439-464.
198. Mallery SR, Pei P, Landwehr DJ, Clark CM, Bradburn JE, Ness GM, Robertson FM. Implications for oxidative and nitrative stress in the pathogenesis of AIDS-related Kaposi's sarcoma. *Carcinogenesis*. 2004;25(4):597-603.

199. Ensoli B, Barillari G, Gallo RC. Pathogenesis of AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Hematology - Oncology Clinics of North America*. 1991;5(2):281-295.
200. Ganem D. AIDS. Viruses, cytokines and Kaposi's sarcoma. *Current Biology*. 1995;5(5):469-471.
201. Yao F, Terrault N. Hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Current Treatment Options in Oncology*. 2001;2(6):473-483.
202. Alberts B BD, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Lehrbuch der molekularen Zellbiologie*. Vol 2. Auflage. Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto: WILEY-VCH; 2001. S. 199-201
203. Mahoney MC. Genetic polymorphisms and disease prevention. *Pediatric Blood & Cancer*. 2007;48(7):742-747.
204. Nowell SA, Ahn J, Rae JM, Scheys JO, Trovato A, Sweeney C, MacLeod SL, Kadlubar FF, Ambrosone CB. Association of genetic variation in tamoxifen-metabolizing enzymes with overall survival and recurrence of disease in breast cancer patients. *Breast Cancer Research & Treatment*. 2005;91(3):249-258.
205. Bosch TM, Meijerman I, Beijnen JH, Schellens JHM. Genetic polymorphisms of drug-metabolising enzymes and drug transporters in the chemotherapeutic treatment of cancer. *Clinical Pharmacokinetics*. 2006;45(3):253-285.
206. McIlwain CC, Townsend DM, Tew KD. Glutathione S-transferase polymorphisms: cancer incidence and therapy. *Oncogene*. 2006;25(11):1639-1648.
207. Thier R, Bruning T, Roos PH, Rihs H-P, Golka K, Ko Y, Bolt HM. Markers of genetic susceptibility in human environmental hygiene and toxicology: the role of selected CYP, NAT and GST genes. *International Journal of Hygiene & Environmental Health*. 2003;206(3):149-171.
208. Lippman SM, Spitz MR. Lung cancer chemoprevention: an integrated approach. *Journal of Clinical Oncology*. 2001;19(18 Suppl):74S-82S.
209. Spitz MR, Wu X, Mills G. Integrative epidemiology: from risk assessment to outcome prediction. *Journal of Clinical Oncology*. 2005;23(2):267-275.
210. Brockmoller J, Cascorbi I, Henning S, Meisel C, Roots I. Molecular genetics of cancer susceptibility. *Pharmacology*. 2000;61(3):212-227.
211. Furberg AH, Ambrosone CB. Molecular epidemiology, biomarkers and cancer prevention. *Trends in Molecular Medicine*. 2001;7(11):517-521.

212. Pschyrembel W. *Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch*. Vol 259.: de Gruyter; 2002. S. 585
213. Christensen K, Murray JC. What genome-wide association studies can do for medicine.[comment]. *New England Journal of Medicine*. 2007;356(11):1094-1097.
214. Stoneking M. Single nucleotide polymorphisms. From the evolutionary past...[comment]. *Nature*. 2001;409(6822):821-822.
215. Kruglyak L, Nickerson DA. Variation is the spice of life. *Nature Genetics*. 2001;27(3):234-236.
216. Collins FS, McKusick VA. Implications of the Human Genome Project for medical science.[see comment]. *JAMA*. 2001;285(5):540-544.
217. Holden AL. The SNP consortium: summary of a private consortium effort to develop an applied map of the human genome. *Biotechniques*.Suppl:22-24.
218. Bamshad M. Genetic influences on health: does race matter?[see comment][erratum appears in JAMA. 2005 Oct 5;294(13):1620]. *JAMA*. 2005;294(8):937-946.
219. Miller RD, Phillips MS, Jo I, Donaldson MA, Stuebaker JF, Addleman N, Alfisi SV, Ankener WM, Bhatti HA, Callahan CE, Carey BJ, Conley CL, Cyr JM, Derohannessian V, Donaldson RA, Elosua C, Ford SE, Forman AM, Gelfand CA, Grecco NM, Gutendorf SM, Hock CR, Hozza MJ, Hur S, In SM, Jackson DL, Jo SA, Jung S-C, Kim S, Kimm K, Kloss EF, Koboldt DC, Kuebler JM, Kuo F-S, Lathrop JA, Lee J-K, Leis KL, Livingston SA, Lovins EG, Lundy ML, Maggan S, Minton M, Mockler MA, Morris DW, Nachtman EP, Oh B, Park C, Park C-W, Pavelka N, Perkins AB, Restine SL, Sachidanandam R, Reinhart AJ, Scott KE, Shah GJ, Tate JM, Varde SA, Walters A, White JR, Yoo Y-K, Lee J-E, Boyce-Jacino MT, Kwok P-Y, The SNPCCAF. High-density single-nucleotide polymorphism maps of the human genome. *Genomics*. 2005;86(2):117-126.
220. Weiner MP, Hudson TJ. Introduction to SNPs: discovery of markers for disease. *Biotechniques*. 2002;Suppl:4-7.
221. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, Sherry S, Mullikin JC, Mortimore BJ, Willey DL, Hunt SE, Cole CG, Coggill PC, Rice CM, Ning Z, Rogers J, Bentley DR, Kwok PY, Mardis ER, Yeh RT, Schultz B, Cook L, Davenport R, Dante M, Fulton L, Hillier L, Waterston RH, McPherson JD, Gilman B, Schaffner S, Van Etten WJ, Reich D, Higgins J, Daly MJ, Blumenstiel B, Baldwin J, Stange-Thomann N, Zody MC, Linton L, Lander ES, Altshuler D, International SNPMPWG. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms.[see comment]. *Nature*. 2001;409(6822):928-933.

222. Pearson TA, Manolio TA. How to interpret a genome-wide association study.[erratum appears in JAMA. 2008 May 14;299(18):2150]. *JAMA*. 2008;299(11):1335-1344.
223. Velasquez JL, Lipkin SM. What are SNPs and haplotypes and how will they help us manage the prevention of adult cancer? *Current Oncology Reports*. 2005;7(6):475-479.
224. <http://www.internationale-praxis.de/genpolymorphismus-snips.html>
225. Itoh Y, Nagase H. Matrix metalloproteinases in cancer. *Essays in Biochemistry*. 2002;38:21-36.
226. Arakaki PA, Marques MR, Santos MCLG. MMP-1 polymorphism and its relationship to pathological processes. *Journal of Biosciences*. 2009;34(2):313-320.
227. Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases and metastasis. *Cancer Chemotherapy & Pharmacology*. 1999;43 Suppl:S42-51.
228. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research*. 2006;69(3):562-573.
229. Murphy G, Nagase H. Progress in matrix metalloproteinase research. *Molecular Aspects of Medicine*. 2008;29(5):290-308.
230. Salo T, Liotta LA, Tryggvason K. Purification and characterization of a murine basement membrane collagen-degrading enzyme secreted by metastatic tumor cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1983;258(5):3058-3063.
231. Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, Hart I, Foltz CM, Shafie S. Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature*. 1980;284(5751):67-68.
232. Fullmer HM, Gibson W. Collagenolytic activity in gingivae of man. *Nature*. 1966;209(5024):728-729.
233. Tsuchiya N, Narita S, Kumazawa T, Inoue T, Ma Z, Tsuruta H, Saito M, Horikawa Y, Yuasa T, Satoh S, Ogawa O, Habuchi T. Clinical significance of a single nucleotide polymorphism and allelic imbalance of matrix metalloproteinase-1 promoter region in prostate cancer. *Oncology Reports*. 2009;22(3):493-499.
234. Kohrmann A, Kammerer U, Kapp M, Dietl J, Anacker J. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer and breast cancer cell lines: New findings and review of the literature. *BMC Cancer*. 2009;9:188.

235. Krippel P, Langsenlehner U, Renner W, Yazdani-Biuki B, Koppel H, Leithner A, Wascher TC, Paulweber B, Samonigg H. The 5A/6A polymorphism of the matrix metalloproteinase 3 gene promoter and breast cancer. *Clinical Cancer Research*. 2004;10(10):3518-3520.
236. Bartlett JMS, Stirling D. A short history of the polymerase chain reaction. *Methods in Molecular Biology*. 2003;226:3-6.
237. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985;230(4732):1350-1354.
238. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988;239(4839):487-491.
239. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*. 1987;155:335-350.
240. Innis MA GD, Sninsky JJ, White TJ. *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*. San Diego: Academic Press; 1990.
241. Persing DH ST, Tenover FC, White TJ. *Diagnostic Molecular Microbiology, Principles and Applications*: ASM Press; 1993.
242. 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 Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 1986;51 Pt 1:263-273.
243. Bustin SA, Dorudi S. Molecular assessment of tumour stage and disease recurrence using PCR-based assays. *Molecular Medicine Today*. 1998;4(9):389-396.
244. Appelbaum FR. Molecular diagnosis and clinical decisions in adult acute leukemia. *Seminars in Hematology*. 1999;36(4):401-410.
245. Gibbs RA. DNA amplification by the polymerase chain reaction. *Analytical Chemistry*. 1990;62(13):1202-1214.
246. Guyer RL, Koshland DE, Jr. The Molecule of the Year. *Science*. 1989;246(4937):1543-1546.
247. Chien A, Edgar DB, Trela JM. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *Journal of Bacteriology*. 1976;127(3):1550-1557.

248. Cheng S, Fockler C, Barnes WM, Higuchi R. Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91(12):5695-5699.
249. Sambrook J RD. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual Vol 3*. Auflage; 2001.
250. Rychlik W, Spencer WJ, Rhoads RE. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro.[erratum appears in *Nucleic Acids Res* 1991 Feb 11;19(3):698]. *Nucleic Acids Research*. 1990;18(21):6409-6412.
251. Hsu JT, Das S, Mohapatra S. Polymerase chain reaction engineering. *Biotechnology & Bioengineering*. 1997;55(2):359-366.
252. Perl A, Feher J. [Polymerase chain reaction in clinical diagnosis]. *Orvosi Hetilap*. 1990;131(13):671-675.
253. Lawyer FC, Stoffel S, Saiki RK, Chang SY, Landre PA, Abramson RD, Gelfand DH. High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. *PCR Methods & Applications*. 1993;2(4):275-287.
254. Nasr HB, Mestiri S, Chahed K, Bouaouina N, Gabbouj S, Jalbout M, Chouchane L. Matrix metalloproteinase-1 (-1607) 1G/2G and -9 (-1562) C/T promoter polymorphisms: susceptibility and prognostic implications in nasopharyngeal carcinomas. *Clinica Chimica Acta*. 2007;384(1-2):57-63.
255. Zhu Y, Spitz MR, Lei L, Mills GB, Wu X. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter enhances lung cancer susceptibility. *Cancer Research*. 2001;61(21):7825-7829.
256. McGowan PM, Duffy MJ. Matrix metalloproteinase expression and outcome in patients with breast cancer: analysis of a published database. *Annals of Oncology*. 2008;19(9):1566-1572.
257. Yang E, Boire A, Agarwal A, Nguyen N, O'Callaghan K, Tu P, Kuliopulos A, Covic L. Blockade of PAR1 signaling with cell-penetrating pepducins inhibits Akt survival pathways in breast cancer cells and suppresses tumor survival and metastasis. *Cancer Research*. 2009;69(15):6223-6231.