

Maren Ursula Rohrbacher
Dr. med.

Zusammenhang zwischen einem Insulin-like Growth Faktor Bindungsprotein-3 Promotor Polymorphismus und prämenopausalem Brustkrebs in einer deutschen Fall-Kontroll Studie

Geboren am 09.09.1973 in Bonn
Reifeprüfung am 14.05.1993 in Wangen im Allgäu
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1996 bis SS 2004
Physikum am 24.03.1999 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Heilbronn, Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Heidelberg
Staatsexamen am 11.05.2004 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: DKFZ
Doktormutter: Frau Prof. Dr. sc. hum. J. Chang-Claude

Das Insulin-like growth Faktor (IGF-) System spielt eine wichtige Rolle sowohl während des Zellwachstums als auch beim kontrollierten Zelltod (Apoptose). Es könnte deshalb in Verbindung stehen mit dem Risiko zu maligner Entartung.

Das Insulin-like growth Faktor Bindungsprotein 3 (IGFBP-3) ist das Hauptbindungsprotein der IGF-Is im humanen Serum. Hohe IGFBP-3 Serumspiegel sind assoziiert mit erniedrigten IGF-I Spiegel. IGFBP-3 beeinflusst somit die Zellproliferation durch eine Modulation der Menge an IGFs, die an ihre Rezeptoren gehen. In bisherigen Studien konnte bei gesunden Frauen festgestellt werden, dass die IGF-I und IGFBP-3 Spiegel durch Alkoholkonsum gesenkt werden. Die Einnahme oraler Kontrazeptiva reduzierte die IGF-I Spiegel, erhöhte aber die IGFBP-3 Spiegel. Es gibt deutliche Hinweise sowohl aus prospektiven Kohorten als auch aus Fall-Kontroll Studien, dass erhöhte Mengen an IGF-I in Verbindung stehen mit einem erhöhtem Brustkrebsrisiko bei prämenopausalen Frauen. Für die IGFBP-3 Spiegel gibt es noch keine eindeutigen Ergebnisse über einen Zusammenhang zum Krebsrisiko.

Ein genetischer Polymorphismus (SNP) in der *IGFBP-3* Promotorregion wurde bei Deal *et al.*, 2001 identifiziert. Es ist ein Basenaustausch von Adenin nach Cytosin. In *in vitro* Tests zeigte Deal *et al.*, 2001, dass das A Allel eine höhere Promotoraktivität hatte als das C Allel. Bei *in vivo* Tests stellten sie fest, dass dieser SNP im Zusammenhang stand mit der im Blut zirkulierende IGFBP-3 Menge. Die AA Genotyp-Träger hatten höhere IGFBP-3 Konzentrationen im Blut als die AC oder CC Träger. Modifizierend auf die Serumkonzentration wirkte der Body-Mass Index und die Körpergröße.

Die dieser Arbeit zugrundeliegende Hypothese ging davon aus, dass das A Allel des Polymorphismus zu höheren IGFBP-3 Spiegel führt, die das IGF-I im Blut senken können. Ein erniedrigtes Tumorrisiko wäre dann zu erwarten bei den AA Genotyp-Trägern. Die vorliegende Fall-Kontroll Studie untersuchte das C Allel dieses Polymorphismus als einen möglichen Brustkrebsrisikofaktor bei prämenopausalen Frauen. Zusätzlich wurde untersucht, ob andere Faktoren wie Alkoholkonsum, Einnahme oraler Kontrazeptiva und die Körperstatur einen Zusammenhang des Polymorphismus mit dem Brustkrebsrisiko modifizieren.

Zur Durchführung dieser Arbeit standen DNA Proben von Frauen aus einer bevölkerungsbasierten Brustkrebs Fall-Kontroll Studie (1992-1995) des Deutschen Krebsforschungszentrums in Heidelberg zur Verfügung. Es konnte bei 603 Brustkrebsfällen und 1068 altersentsprechenden Bevölkerungskontrollen der *IGFBP-3* Genotyp bestimmt werden. Das Alter der Frauen lag zum Zeitpunkt der Diagnose eines in-situ oder invasiven Karzinoms unter 51 Jahren.

Die Referenz der *IGFBP-3* Promotor Polymorphismus-Sequenz nach Deal *et al.*, 2001 (Genomdatenbank Accessionsnummer M 35878) wurde verglichen mit den Sequenzen AC 091524 und AX 323409 und Sequenzen eigener Proben (DNA I-III). Das multiple Sequenzalignment zeigte zwischen den *IGFBP-3* Sequenzen Differenzen auf: 1) Auf den Positionen 40449 und 40448 aus AC 091524 und an den entsprechenden Stellen der DNA I-III fehlten bei M 35878 und AX 323409 zwei Cytosinbasen. 2) Auf den Positionen 40344 und 40239 aus AC 091524 und im gleichen Bereich der DNA I-III wurde jeweils eine Cytosinbase gefunden, die bei M 35878 und AX 323409 jeweils fehlte. 3) Auf den Positionen 40253 und 40252 aus AC 091524 und an den entsprechenden Stellen der DNA I-III folgte einer Guaninbase eine Cytosinbase. In den Sequenzen M 35878 und AX 323409 war die Reihenfolge umgekehrt (i.e. CG). Der untersuchte *IGFBP-3* Polymorphismus befindet sich deshalb an Position -204 relativ zur CAP-Stelle, und nicht wie bisher beschrieben an -202, und damit an der Position -336 relativ zum ATG Startcodon.

Die Genotypisierung erfolgte mit der bereits etablierten PCR/RFLP Methode nach Deal *et al.*, 2001. Somit konnten 1671 DNA Proben eindeutig genotypisiert werden. Zur Qualitätssicherung wurden Negativ- und Positivkontrollen durchgeführt. Die Detektion konnte nicht auf die fluoreszenz-basierte Schmelzkurvenanalyse (LightCycler Technik) umgestellt werden, da sich die ermittelte Sequenz für diese Technik als zu GC-reich erwies.

Der χ^2 Test wurde durchgeführt, um Abweichungen der Genotypverteilung von dem Hardy-Weinberg Equilibrium zu bewerten. Die multivariate logistische Regression ist zur Beurteilung der *IGFBP-3* Genotypen in Verbindung mit dem Brustkrebsrisiko eingesetzt worden, um die Odds Ratios (OR) und das 95% Konfidenzintervall (KI) zu berechnen. AA Genotyp-Trägerinnen wurden als Referenzgruppe gewählt, da bei ihnen ein geringeres Tumorrisiko erwartet wurde. Zum Ausschluss altersbedingter Effekte wurden die Studienteilnehmerinnen in Kategorien von fünf Jahren eingeteilt (stratifiziert). Weitere mögliche Risikofaktoren wurden in den Berechnungen berücksichtigt (adjustiert). Dazu gehörte das Auftreten von Brustkrebs bei Verwandten ersten Grades (ja/nein), Stilldauer (Zeit), Anzahl der komplett ausgetragenen Schwangerschaften (1-2, >3), tägliche Alkoholmenge in Gramm (1-5, 6-11, 12-18, >19, Einnahme oraler Kontrazeptiva (ja/nein) und Menopausenstatus (prämenopausal, postmenopausal, unbekannt).

In der bevölkerungsbezogenen Brustkrebs Fall-Kontroll Studie mit prämenopausalen Frauen konnte kein Zusammenhang zwischen dem *IGFBP-3* Promotor Polymorphismus und dem Brustkrebsrisiko gefunden werden. Bei den Ergebnissen zeigte sich eine Häufigkeit des A⁻³³⁶ Allels von 0,48 bei den Fällen und 0,47 bei den Kontrollen. Entsprechend trat das C⁻³³⁶ Allel auf mit 0,52 bei den Fällen und 0,53 bei den Kontrollen. Die Genotypverteilung bei den Fällen und den Kontrollen entsprach den Erwartungen (Hardy-Weinberg Equilibrium). Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Fällen und Kontrollen hinsichtlich der Genotyphäufigkeiten. Bezogen auf den AA Genotyp lag die adjustierte OR des AC Genotyps für Brustkrebs bei 0,99 (95% KI 0,77-1,27) und des CC Genotyps bei 0,97 (95% KI 0,73-1,29). Es konnte auch keine Verbindung gesehen werden zwischen dem *IGFBP-3* Polymorphismus und dem Brustkrebsrisiko in Untergruppen von Frauen, die unterschieden wurden nach Alkoholkonsum, Einnahme oraler Kontrazeptiva und BMI. Bei der Überlebenswahrscheinlichkeit der Brustkrebsfälle konnte ebenfalls kein Zusammenhang zum untersuchten Polymorphismus gesehen werden. Diese Studie bestätigt die jüngsten Ergebnisse von Schernhammer *et al.*, 2003, die zeigten, dass der A⁻³³⁶C *IGFBP-3* Polymorphismus alleine keine wichtige Rolle spielt bei der Ätiologie von Brustkrebs. Die Ergebnisse sind publiziert (Rohrbacher *et al.*, 2005).

Weitere Arbeiten in der Zukunft sollten berücksichtigen, dass die im Blut zirkulierende IGFBP-3 Menge vielleicht stärker durch exogene Faktoren (Umweltfaktoren oder Hormone) beeinflusst wird als durch den Genotyp. Da aber auch andere Polymorphismen in den *IGFBP-3* und *IGF-I* Genen bekannt sind, sollten diese ebenfalls berücksichtigt werden, um mehr Informationen über die Verbindungen des IGF Systems mit dem Brustkrebsrisiko zu gewinnen.