

Aus dem Institut für Medizinische Genetik der Universität Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. Peter Meyer

**BRCA1- und BRCA2-Keimbahnmutationen beim
triple-negativen Mammakarzinom**

Theoretische Grundlagen und empirische Untersuchung eines
Patientenkollektivs

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Katharina Landgraf, geb. am 07.08.1985 in Mainz

aus München

Gutachter

1. Gutachter

Prof. Dr. med. Andreas Erbersdobler, Institut für Pathologie,
Universität Rostock

2. Gutachter:

Prof. Dr. med. Oliver Hakenberg, Urologische Klinik und Poliklinik,
Universität Rostock

3. Gutachter:

Prof. Dr. med. Rita Schmutzler, Zentrum für Familiären Brust- und
Eierstockkrebs, Universität Köln

4. Gutachter:

Prof. Dr. med. Bernd Gerber, Universitätsfrauenklinik und Poliklinik,
Universität Rostock

Datum der Einreichung: 29. April 2013

Datum der Verteidigung: 11. November 2014

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Motivation	1
1.2 Zielsetzung	3
2 Grundlagen	4
2.1 Das Mammakarzinom	4
2.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren	4
2.1.2 Pathologie der Mammakarzinome	5
2.1.3 Klassifikationen des Mammakarzinoms	8
2.1.4 Diagnostik.....	9
2.1.5 Therapie	9
2.1.6 Prognose	10
2.2 Das triple-negative Mammakarzinom	11
2.2.1 Epidemiologie und Risikofaktoren	12
2.2.2 Therapie	12
2.2.3 Prognose	13
2.3 Die Humangenetik des Mammakarzinoms	14
2.3.1 BRCA1	15
2.3.2 BRCA2	18
3 Methode und Material	20
3.1 Patientenrekrutierung und -befragung	20
3.1.1 Patientenkollektiv	20
3.1.2 Patientenrekrutierung.....	20
3.1.3 Teilstandardisierter Fragebogen	21
3.1.4 Stammbaumanalyse	22
3.2 Genetische Testung	23
3.2.1 Klinische Kriterien zur genetischen Testung auf BRCA1 und BRCA2	23
3.2.2 Material.....	23

3.2.3	Genotypisierung.....	24
3.3	Mutationsanalyse	24
4	Ergebnisse.....	26
4.1	Überblick	26
4.2	Krankheitsassoziierte BRCA-Mutationen	28
4.2.1	BRCA1-Mutationen.....	28
4.2.2	BRCA2-Mutationen.....	30
4.3	Nicht krankheitsassoziierte BRCA-Mutationen.....	34
4.3.1	BRCA1-Mutationen.....	36
4.3.2	BRCA2-Mutationen.....	37
4.4	Vergleich der Tumorpathologie.....	40
4.5	Erfassung der Anzahl von Risikoallelen	41
5	Diskussion	42
5.1	Diskussion der Methodik.....	42
5.2	Diskussion der Ergebnisse.....	44
5.3	Bedeutung und Ausblick	47
6	Zusammenfassung.....	50
7	Anhang.....	52
	Literaturverzeichnis.....	54
	Publikation.....	68
	Thesen	69

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau des BRCA1-Gens	16
Abbildung 2: Altersbezogene Erkrankungswahrscheinlichkeit für BRCA1/2- Mutationsträgerinnen	17
Abbildung 3: Aufbau des BRCA2-Gens	19
Abbildung 4: Prozentuale Verteilung der triple-negativen Kohorte	26
Abbildung 5: Durchschnittsalter der Studienteilnehmerinnen	27
Abbildung 6: Elektropherogramm des Exon 20, BRCA1-Gen	29
Abbildung 7: Elektropherogramm des Exon 10, BRCA2-Gen.....	30
Abbildung 8: Elektropherogramm des Exon 17, BRCA2-Gen.....	31
Abbildung 9: Elektropherogramm des Exon 11, BRCA2-Gen.....	32
Abbildung 10: Elektropherogramm des Intron 5-Exon 6-Übergangs, BRCA2-Gen	33
Abbildung 11: Elektropherogramm des Exon 11, BRCA2-Gen.....	34

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Kriterien des Gradings für das Mammakarzinom.....	6
Tabelle 2: Immunreaktiver Score (IRS) nach Remmele und Stegner.....	7
Tabelle 3: Beurteilung des HER2-Status	8
Tabelle 4: Charakteristika des triple-negativen Mammakarzinoms.....	13
Tabelle 5: Risikomodifikation durch Brustkrebsgene.....	14
Tabelle 6: Charakteristika der BRCA1/2-positiven Gruppe	28
Tabelle 7: Charakteristika der BRCA1/2-negativen Gruppe	35
Tabelle 8: Vergleich der Tumorpathologie	40
Tabelle 9: Zusammenfassung aktueller, vergleichbarer Studien	44

Abkürzungsverzeichnis

Abk	Abkürzung
Akt	Protein Kinase B
AS	Aminosäure
ASCO	American Society of Clinical Oncology
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR	Ataxia Telangiectasia and Rad3-related
BARD1	BRCA1-associated Ringdomain-1-Protein
BCCIP α	BRCA and CDKN1A interacting-Protein
BET	Brusterhaltenden Therapie
BIC	Breast Cancer Information Core
BK	Brustkrebs
BRCA	Breast Cancer
BRCT	BRCA1-C-Terminal
BRIP1	BRCA-interacting-Protein 1
CAIX	Carbonic Anhydrase IX
CAP	College of American Pathologists
CDKN1A	Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 1A
CDKN1B	Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 1B
CEP17	Chromosom-17 Signal
CHK2	Checkpoint-Kinase 2
Cis	Carcinom in situ
CISH	Chromogen-In-situ-Hybridisierung
CK 14	Zytokeratin 14
CK 5	Zytokeratin 5

CLIS	Carcinoma lobulare in situ
cTNM	Klinische TNM-Klassifikation
DCIS	Ductal carcinoma in situ
DHPLC	Denaturing High Performance Liquid Chromatography
DNA	Deoxyribonucleic Acid
ED	Erstdiagnose
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
EGFR	Epidermal Growth Factor Rezeptor
ER	Östrogenrezeptor
FISH	Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung
G	Grading
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HGVS	Human Genome Variation Society
HPF	High Power Field
IRS	Immunreaktiver Score
kb	Kilobase
kConFab	Kathleen Cuningham Foundation Consortium for research into Familial Breast cancer
KI	Konfidenzintervall
Ki-67	Proliferationsmarker
LCS	Low Clinical Significance
LK	Lungenkrebs
LOVD	Leiden Open Variation Database
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
MLPA	Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification
MRM	Modifizierte radikale Mastektomie
MRN	MRE11, RAD50, NBS1

MRT	Magnetresonanztomographie
ms	Mütterlicherseits
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NICE	National Institute of Clinical Excellence
NLS	Nuclear Localization Signal
OB	Oligonukleotid-bindend
OCCR	Ovarian Cancer Cluster Region
OR	Odds Ratio
OvKa	Ovarialkarzinom
P/CAF	p300/CBP-associated-Faktor
p27	Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 1B (CDKN1B)
p53	Tumorsuppressorprotein 53
p63	Tumorsuppressorprotein 63
PARP	Poly (ADP-Ribose) Polymerase
PCR	Polymerase Chain Reaktion
PLK1	Polo-like-Kinase 1
PM	Pathogenic Mutation
PR	Progesteronrezeptor
PrPM	Predictive Pathogenic Mutation
pTNM	Histopathologische TNM-Klassifikation
R	Residualtumor
RAD51	Radiation-Protein 51
RKI	Robert Koch-Institut
RP	Risk Conferring Polymorphism
SISH	Silber-In-situ-Hybridisierung
SLN	Sentinel-Lymphknoten
SLNB	Sentinel-Lymphknoten-Biopsie

SNPs	Single Nucleotide Polymorphisms
SQ	Serin/Glutamin
TNBK	Triple-negativer Brustkrebs
TNM	Tumorgröße, Nodalstatus, Metastasierung
TP53	Tumorsuppressorgen 53
UICC	Union for International Cancer Control
US	Unknown Significance
UV	Unclassified variants
vs	väterlicherseits
WHO	World Health Organization

1 Einleitung

1.1 Motivation

Das Mammakarzinom ist mit einer jährlichen Inzidenz von ca. einer Million Fällen weltweit die häufigste Krebserkrankung der Frau und für ungefähr eine halbe Million Todesfälle pro Jahr verantwortlich (WHO, 2008). In Deutschland werden jährlich ca. 70.000 neue Brustkrebsfälle diagnostiziert. Das mittlere Lebenszeitrisiko, an einem Mammakarzinom zu erkranken, liegt hierzulande in der Allgemeinbevölkerung bei 13,3% (RKI, 2012). Bei Vorliegen eines Gendefektes kann dieses Risiko sogar 80–90% betragen (Meindl et al., 2011).

Etwa 5–10% aller und 25–40% der Mammakarzinome vor dem 35. Lebensjahr werden mit einem Gendefekt in Verbindung gebracht (Lux et al., 2006). Seit 1994 bzw. 1995 sind zwei Gene bekannt, die nachgewiesenermaßen krankheitsverursachend sein können: BRCA1¹ und BRCA2¹. Bei diesen Genen handelt es sich um autosomal-dominant vererbte Tumorsuppressorgene, die an der DNA²-Reparatur von Doppelstrangbrüchen beteiligt sind (Miki et al., 1994; Wooster et al., 1995). Ein Defekt in einem dieser Gene geht neben einem erhöhten Brustkrebsrisiko auch mit einem bis zu 50% erhöhten Eierstockkrebsrisiko einher (Meindl et al., 2011). Weitere empirische Studien geben Hinweise darauf, dass auch das allgemeine Krebsrisiko erhöht zu sein scheint (Liede et al., 2004; Risch et al., 2006).

80% aller BRCA1-assoziierten Mammakarzinome zeigen in der Immunhistochemie einen sogenannten triple-negativen Phänotyp (Foulkes et al., 2004). Dieser zeichnet sich durch (a) fehlende Östrogen (ER)- und (b) fehlende Progesteronrezeptoren (PR) sowie (c) eine fehlende HER2³-Expression aus (Nielsen et al., 2004). Zudem geht das triple-negative Mammakarzinom mit einem aggressiveren Wachstumsverhalten, einem erhöhten und vor allem frühen Rezidivrisiko und einem schlechten Gesamtüberleben einher. Die Therapiemöglichkeiten sind aufgrund der fehlenden Hormon- und HER2-

¹ Die Abkürzung BRCA steht für Breast Cancer.

² Die Abkürzung DNA steht für Deoxyribonucleic Acid.

³ Die Abkürzung HER2 steht für Human Epidermal Growth Factor Receptor 2.

Expression begrenzt und die Prognosen insgesamt schlechter (Dent et al., 2007; Nguyen et al., 2008). Lediglich ca. 12–17% aller Mammakarzinome gehören dieser Untergruppe an (Foulkes et al., 2010).

Empirische Studien deuten darauf hin, dass es einen Zusammenhang zwischen dem triple-negativen Phänotyp und BRCA-Keimbahnmutationen zu geben scheint. Die relevanten wissenschaftlichen Arbeiten zu diesem Thema fanden bisher sehr hohe Frequenzen von BRCA1-Mutationen, allerdings nur sehr geringe oder keine Frequenzen von BRCA2-Mutationen bei Patienten mit triple-negativen Mammakarzinomen (Comen et al., 2011; Evans et al., 2011; Gonzalez-Angulo et al., 2011; Young et al., 2009). In den besagten Studien wurde das Patientenkollektiv zum Teil aufgrund des Alters vorselektiert oder sie bezogen sich nur auf ganz besondere Inzuchtpopulationen mit hoher Gründermutationshäufigkeit oder aber das BRCA2-Gen wurde nur unvollständig analysiert.

Die Prävention und Früherkennung epidemiologisch häufiger Erkrankungen sind zunehmend in den Fokus gesundheitspolitischer Überlegungen gerückt und finden auch immer mehr Umsetzung im klinischen Alltag. Die Aufklärung von Risikogruppen wurde intensiviert und ausgeweitet. Die Deutsche Krebshilfe fördert mittlerweile 15 Zentren für familiären Brust- und Eierstockkrebs in Deutschland. Im Rahmen dieses Projekts wurde für Betroffene mit einer erblichen Belastung für das Mamma- und Ovariakarzinom und deren Angehörige ein strukturiertes medizinisches als auch psychologisches Beratungs- und Betreuungsangebot etabliert. Es umfasst die Beratung über Früherkennungsmaßnahmen und prophylaktische Behandlungsmöglichkeiten, eine humangenetische Beratung sowie das Angebot einer genetischen Testung (Deutsche Krebshilfe e.V., 2013). Eine solche genetische Untersuchung kann Mutationen ausschließen und damit Frauen entlasten oder bei einer krankheitsassoziierten Mutation der Familie das erhöhte Erkrankungsrisiko bestätigen, sie in Früherkennungsprogramme einbinden und auch präventive Maßnahmen wie z. B. prophylaktische Operationen und medikamentöse Therapien vorschlagen. Derzeit wird eine solche Betreuung nur Frauen ermöglicht, die laut den aktuellen Kriterien der S3-Leitlinie⁴ (siehe 3.2.1) in eine Hochrisikogruppe fallen. Es stellt sich jedoch die Frage, ob diese Kriterien noch dem aktuellen Stand der Forschung entsprechen oder ob eine Anpassung sinnvoll wäre.

⁴ Für nähere Informationen zu der S3-Leitlinie siehe unter:
http://www.krebsgesellschaft.de/download/S3_Brustkrebs_Update_2012_OL_Langversion.pdf.

1.2 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zum besseren Verständnis der Bedeutung von BRCA1- bzw. BRCA2-Keimbahnmutationen bei der Entstehung des triple-negativen Mammakarzinoms leisten und somit zur Diskussion und potentiellen Weiterentwicklung der aktuellen Empfehlungen der S3-Leitlinie beitragen. Das Hauptziel der Arbeit ist die Erhebung der BRCA1- und BRCA2-Mutationfrequenz in einer triple-negativen Brustkrebskohorte aus Süddeutschland. Das Patientenkollektiv wurde im Gegensatz zu bisherigen Studien nicht anhand von Alter bei Erstdiagnose oder familiärer Häufung von Krebserkrankungen ausgewählt. Zudem wurden beide Gene, sowohl BRCA1 als auch BRCA2, vollständig analysiert.

Des Weiteren sollen die empirischen Ergebnisse in einen klinischen Kontext gestellt werden und Konsequenzen für die in der Praxis aktuell angewandten diagnostischen und therapeutischen Vorgehensweisen diskutiert werden. Insbesondere geht es um die Frage, ob die Ergebnisse eine Einstufung in eine Hochrisikogruppe für eine BRCA1/2-Genmutation rechtfertigen, so dass entsprechende Empfehlungen zur genetischen Testung ausgesprochen und die S3-Leitlinie um dieses Kriterium ergänzt werden sollten. Gegenwärtig wird in Deutschland ein BRCA-Screening durchgeführt, sobald die Wahrscheinlichkeit, eine Mutation zu tragen, über 10% liegt. Gerade jungen Frauen, einem Kollektiv mit vermehrt auftretendem triple-negativem Brustkrebs, aber fehlender positiver Familienanamnese, würde so die Möglichkeit einer genetischen Testung und die Teilnahme am intensivierten Früherkennungsprogramm eingeräumt werden.

2 Grundlagen

Der folgende Abschnitt dieser Arbeit beinhaltet die theoretischen Grundlagen des Mammakarzinoms, geht auf die Besonderheiten des triple-negativen Subtyps ein und stellt den Aufbau und die Bedeutung der Gene BRCA1 und BRCA2 dar.

2.1 Das Mammakarzinom

2.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

2008 erkrankten in Deutschland 71.660 Frauen an Brustkrebs, 2012 wird laut dem Robert-Koch-Institut mit 74.500 Neuerkrankungen gerechnet. Jede achte Frau erkrankt im Verlauf ihres Lebens an einem Mammakarzinom (RKI, 2012). Das mittlere Erkrankungsalter für Krebs allgemein liegt hierzulande bei 69 Jahren, für Brustkrebs bereits bei 65 Jahren. Jede vierte Frau ist bei Erstdiagnose eines Brustkrebs jünger als 55 Jahre und jede zehnte sogar jünger als 45 Jahre (RKI, 2012). 2008 wurden etwa doppelt so viele Brustkrebsfälle wie 1980 diagnostiziert, die altersstandardisierte Erkrankungsrate stieg seitdem um etwa 50% (RKI, 2012). Dies ist zum Teil auf das 2005 einsetzende Mammographie-Screening zur Früherkennung zurückzuführen (RKI, 2012). Frauen zwischen 50 und 69 Jahren wird seitdem alle zwei Jahre eine Untersuchung der Brust mittels Röntgenstrahlung angeraten. Als Folge stieg die Erkrankungsrate zunächst sprunghaft an. Viele Tumore, vor allem kleinere Tumore werden seitdem deutlich früher entdeckt. Doch trotz stetig steigender Inzidenz sterben heute durch vermehrte Früherkennungsprogramme und bessere Therapiemöglichkeiten weitaus weniger Frauen an dieser Erkrankung. Im Jahr 2010 lag die Zahl der Sterbefälle infolge von Brustkrebs bei ca. 17.000. Dies entspricht 3,9% aller weiblichen Todesfälle in der Bundesrepublik (Statistische Bundesamt, 2012).

Die Ätiologie des Mammakarzinoms ist weitestgehend unbekannt, jedoch sind mittlerweile viele endogene und exogene Faktoren bekannt, die sowohl einen positiven als auch einen negativen Einfluss auf die Entstehung haben können. So gehen eine frühe erste Menstruation (< 12 Jahren) und eine späte Menopause (> 52 Jahren), Nulliparität, eine späte erste Geburt (> 35 Jahre) und ein steigendes Alter mit einem erhöhten Risiko

einher. Ebenso sind eine Hormonersatztherapie, Übergewicht und Bewegungsmangel während und nach den Wechseljahren mit einem steigenden Risiko assoziiert. Die Studienlage zeigt auch einen ungünstigen Einfluss von Alkohol und Zigaretten im Sinne einer Risikoerhöhung. Frauen mit hoher Brustdichte in der Mammographie und atypischen duktalem oder lobulären Hyperplasien haben ebenso wie Frauen mit familiärer Häufung von Brust- und Eierstockkrebs ein erhöhtes Risiko.

Im Gegenzug reduzieren viele und vor allem frühe Geburten und lange Stillphasen das Risiko, an einem Mammakarzinom zu erkranken (RKI, 2012).

2.1.2 Pathologie der Mammakarzinome

Der folgende Abschnitt erläutert die histopathologische Klassifikation und Graduierung des Mammakarzinoms. Außerdem werden die Zusatzuntersuchungen wie die Bestimmung des Hormonrezeptor- und HER2-Status näher beschrieben.

Histopathologische Klassifikation

85–90% aller Mammakarzinome entwickeln sich aus dem Epithel der Milchgänge (Ductus) und nur 10–15% aus dem Epithel der Drüsenläppchen (Lobuli). Beschränkt sich der Tumor auf sein Ursprungsepithel und durchbricht nicht die Basalmembran, spricht man von einem nicht invasiven Karzinom oder einem Carcinoma in situ. Es wird je nach Ursprungsepithel zwischen einem duktalem Carcinoma in situ (DCIS) oder einem Carcinoma lobulare in situ (CLIS) unterschieden. Sobald eine Infiltration in ein umgebendes Gewebe stattfindet, gehört der Tumor der Gruppe der invasiven Mammakarzinome an. Hier unterscheidet man das duktales Karzinom mit 40–75% der Fälle, das lobuläre (5–15%), das medulläre (1–7%), das tubuläre (1–2%), das muzinöse (1–2%) und das papilläre Karzinom (1–2%) (Bauerfeind, 2011, S. 63).⁵

Histologische Graduierung (Grading)

Neben der Typisierung ist bei invasiven Karzinomen die histologische Graduierung (Grading) von besonderer Bedeutung, da sie eine größere prognostische Aussagekraft hat. Sie korreliert mit dem Lymphknotenstatus, der Rezidivrate, der Mortalitätsrate und

⁵ Die übrigen Karzinomformen treten in weniger als 1% der Fälle auf und werden hier nicht gesondert beschrieben.

dem Rezeptorstatus (Bauerfeind, 2011, S. 63). Die Einteilung erfolgt nach Elston und Ellis (1991) und beurteilt histologische und zytologische Kriterien (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Kriterien des Gradings für das Mammakarzinom

Merkmale	Kriterien	Scorewerte	
Tubuläre Differenzierung	> 75%	1	
	10–75%	2	
	< 10%	3	
Kernpolymorphie	gering	1	
	mittelgradig	2	
	stark	3	
Mitoserate	0–5/10 HPF ^a	1	
	6–11/10 HPF	2	
	> 11/10 HPF	3	
Summenscore	Malignitätsgrad	G-Gruppe	Definition
3–5 Punkte	gering	G1	gut differenziert
6–7 Punkte	mäßig	G2	mäßig differenziert
8–9 Punkte	hoch	G3	schlecht differenziert

^a HPF steht für High Power Field; Berücksichtigung der individuellen Gesichtsfeldgröße für die Zuordnung der Scorewerte entsprechend Elston und Ellis (1991). Die hier angegebenen Kriterien für einen Gesichtsfelddurchmesser von 0,45 mm entsprechend einem einfachen Lichtmikroskop mit Sehfeldzahl 18 ohne Großfeldtubus.

Eigene Darstellung in Anlehnung an Elston und Ellis (1991)

Hormonrezeptorbestimmung

Die Bestimmung des Hormonrezeptorstatus (Östrogen- und Progesteronrezeptoren) gehört zur Routinediagnostik des invasiven Mammakarzinoms, da das Ergebnis entscheidend zur Planung einer endokrinen Therapie beiträgt. Die Bestimmung erfolgt mittels Immunhistochemie und gibt den Prozentsatz (Score 0–4) derjenigen Tumorzellen an, die Hormonrezeptoren tragen. Neben der Angabe des Prozentsatzes positiver Zellkerne wird auch die durchschnittliche Färbintensität (Score 0–3) beurteilt. Hierbei ist der vorherrschende Intensitätsgrad maßgeblich. Das Produkt beider Werte wird durch einen 12-stufigen Immunreaktiven Score (IRS) ausgedrückt (siehe Tabelle 2) (Remmele und Stegner, 1987). Ergänzend kann auch der international akzeptierte Allred-Score angegeben werden (Harvey et al., 1999). Die Interpretation der Ergebnisse

erfolgt gemäß den Empfehlungen der ASCO/CAP-Leitlinien⁶ (Hammond et al., 2011). Grundsätzlich wird zwischen rezeptorpositiven und rezeptornegativen Tumoren unterschieden. Als rezeptornegativ werden die Tumore bezeichnet, die ein Färbeverhalten von < 1% aufweisen. Der Nachweis von Hormonrezeptoren ist Voraussetzung für eine endokrine Therapie mit einem selektiven Östrogenrezeptormodulator wie z.B. Tamoxifen (Goldhirsch et al., 2005).

Tabelle 2: Immunreaktiver Score (IRS) nach Remmele und Stegner

Prozentsatz positiver Tumorzellen		x	Färbeintensität		=	IRS
keine pos. Kerne	0 Punkte		keine Farbreaktion	0 Punkte	negativ	0–2 Punkte
< 10% pos. Kerne	1 Punkt		schwache Färbereaktion	1 Punkt	schwach positiv	3–4 Punkte
10–50% pos. Kerne	2 Punkte		mäßige Färbereaktion	2 Punkte	mäßig positiv	6–8 Punkte
51–80% pos. Kerne	3 Punkte		starke Färbereaktion	3 Punkte	stark positiv	9–12 Punkte
> 80% pos. Kerne	4 Punkte					

Eigene Darstellung in Anlehnung an Remmele und Stegner (1987)

Bestimmung der HER2-Status

Des Weiteren gehört die Bestimmung des HER2-Status (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) zur Standarddiagnostik eines neu identifizierten Karzinoms. HER2 gehört zur Gruppe der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren und stimuliert die Zellproliferation und hemmt die Apoptose. Die Bestimmung kann immunhistochemisch, mit der Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung (FISH), der Chromogen-In-situ-Hybridisierung (CISH) und der Silber-In-situ-Hybridisierung (SISH) erfolgen. Der Nachweis einer HER2-Überexpression bzw. eine Amplifikation des Gens ist Voraussetzung für eine Herceptin[®]- (Antikörper Trastuzumab) oder Tyverb[®]-Therapie (Tyrosinkinaseinhibitor Lapatinib) (siehe Tabelle 3) (Bauerfeind, 2011, S. 73).

⁶ Die Abkürzung ASCO/CAP steht für American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists.

Tabelle 3: Beurteilung des HER2-Status

Immunhisto- chemie Score	Reaktionsmuster	Bewertung
0+	keine Färberaktion oder $\leq 10\%$ der Tumorzellen mit Markierung	negativ
1+	$> 10\%$ der Tumorzellen mit schwacher inkompletter Markierung	negativ
2+	$> 10\%$ der Tumorzellen mit zirkulärer Markierung; Färbeintensität gering bis mittelgradig oder starke zirkuläre Markierung $< 30\%$	schwach positiv
3+	$> 30\%$ der Tumorzellen mit zirkulärer Markierung; Färbeintensität stark	stark positiv
FISH/CISH-Analyse Amplifikation		
HER2/CEP17-Quotient $< 1,8$ oder < 4 Gensignale pro Tumorzellkern		negativ
HER2/CEP17-Quotient $1,8-2,2$ oder $4-6$ Gensignale pro Tumorzellkern		zweifelhaft
HER2/CEP17-Quotient $> 2,2$ oder mehr als 6 Gensignale pro Tumorzellkern		positiv

^a Die Abkürzung CEP17 steht für das Chromosom-17 Signal

Eigene Darstellung in Anlehnung an Bauerfeind (2011, S. 73)

2.1.3 Klassifikationen des Mammakarzinoms

TNM-Klassifikation

Die Einteilung des Mammakarzinoms erfolgt nach der TNM-Klassifikation der Union for International Cancer Control (UICC) (siehe Anhang 1). Ist das Karzinom mittels Biopsie histologisch gesichert, erfolgt eine prätherapeutische Einteilung, die mit dem Präfix „c“ für clinical (cTNM) gekennzeichnet ist. Erfolgt die Einstufung am Operationspräparat, handelt es sich um eine pathologische Klassifikation. Sie wird mit einem „p“ für pathologisch (pTNM) versehen. Beurteilt werden sowohl Tumorgröße (T), Lymphknotenbefall (N) als auch (Fern-) Metastasierung (M) (UICC, 2009). Die Einteilung hat eine große prognostische Bedeutung und bestimmt in der Regel die Therapie.

Residualtumor(R)-Klassifikation

Nach aktuellen Empfehlungen wird die pTNM-Klassifikation durch den Pathologen mit der Residualtumor(R)-Klassifikation ergänzt. Die Klassifikation beschreibt das Fehlen oder Vorhandensein von Resttumor nach Therapie und hat somit große prognostische Bedeutung für das Gesamtüberleben und das Rezidivrisiko (Schnitt et al., 1987). Es wird wie folgt unterschieden:

- R0 (kein Tumornachweis am Resektionsrand)
- R1 (mikroskopischer Tumornachweis am Resektionsrand)
- R2 (makroskopischer Tumornachweis am Resektionsrand)

2.1.4 Diagnostik

Die Früherkennung einer Brustkrebserkrankung stellt eine umfassende interdisziplinäre Aufgabe dar. Allem voran ist hier die Brust-Selbstuntersuchung zu erwähnen. Sie sollte von jeder Frau einmal monatlich nach der Menstruation durchgeführt werden. Laut WHO⁷ liegt für diese Untersuchung zwar keine Evidenz für eine Senkung der Mortalität vor, jedoch wird sie weiterhin von vielen Seiten propagiert. Des Weiteren gehören die klinische Untersuchung (Inspektion, Palpation) der Brust und der Lymphabflusswege durch einen Arzt, die Mammographie und die Sonographie zur Basisdiagnostik. Der Einsatz der Mammographie in der Früherkennung reduziert nachweislich die Sterblichkeit und gilt daher weltweit als wirksame Methode. Aus diesem Grund wird Frauen im Alter von 50–69 Jahren alle 2 Jahre die Durchführung einer Mammographie angeraten. Die Sensitivität der Untersuchung nimmt jedoch mit steigender Dichte des Brustgewebes ab und liegt bei sehr dichtem Gewebe nur noch bei 50%. In diesem Fall oder bei einem suspekten Befund in der Basisdiagnostik sollte eine weitere bildgebende Diagnostik (MRT⁸) und ggf. eine histologische Sicherung (Stanzbiopsie, Vakuumbiopsie oder offene Exzisionsbiopsie) erfolgen. Bei lokal fortgeschrittenen Karzinomen oder bei klinischem Verdacht auf Metastasierung sollte bereits vor Therapiebeginn ein Staging mit Röntgen-Thorax, Leber-sonographie und Skelettszintigraphie erfolgen (Albert et al., 2008; NICE, 2009).

2.1.5 Therapie

Das große Spektrum an nicht invasiver und invasiver Diagnostik ermöglicht heute eine sehr gute Therapie- bzw. Operationsplanung. Bei nicht fortgeschrittenen Karzinomen ist die operative Therapie des Primärtumors das erste Vorgehen. Ziel der Therapie ist die komplette Tumorentfernung mit möglichst freien Resektionsrändern (R0-Status). Dabei besteht die Möglichkeit einer brusterhaltenden Therapie (BET) oder einer Mastektomie.

⁷ Die Abkürzung WHO steht für World Health Organization.

⁸ Die Abkürzung MRT steht für Magnetresonanztomographie.

Randomisierte Studien haben gezeigt, dass eine brusterhaltende Therapie mit nachfolgender Bestrahlung gegenüber der modifiziert radikalen Mastektomie (MRM) keinen Überlebensvorteil bringt (Veronesi et al., 2002). Entscheidend ist jedoch die R0-Resektion, sie ist die Grundlage für ein niedriges lokales Rezidivrisiko (Houssami et al., 2010). Weiterer Bestandteil des operativen Vorgehens ist die Bestimmung des Nodalstatus mit der Sentinel-Lymphknoten-Biopsie (SLNB). Nur bei Nichtauffinden des sogenannten Wächterlymphknotens (Sentinel-Lymphknoten = SLN) oder bei positivem Befund ist eine Axilladisektion indiziert (NZGG, 2009).

Eine postoperative Radiotherapie gehört mittlerweile nach brusterhaltender Operation zum internationalen Therapiestandard (EBCTCG et al., 2011). Sie führt zu einer verbesserten Tumorkontrolle und zu einer Senkung der lokalen Rezidive. Es zeigt sich ein positiver Einfluss auf die brustkrebspezifische Sterberate und die Überlebenswahrscheinlichkeit. Analog trifft dies auch für eine postoperative Radiotherapie nach Mastektomie zu (Clarke et al., 2005).

Die Fortschritte in der Diagnostik und auch beim operativen Vorgehen werden von einer sehr guten medikamentösen Therapie komplettiert. In Anlehnung an das Risiko- und Rezeptorprofil können eine adjuvante systemische Chemotherapie, eine endokrine Therapie, eine Anti-HER2-Antikörpertherapie oder eine Kombination dieser zur Anwendung kommen (EBCTCG, 2005). Eine neoadjuvante (primäre bzw. präoperative) systemische Behandlung ist die Therapie der Wahl bei Patientinnen mit lokal fortgeschrittenen, primär inoperablen oder inflammatorischen Mammakarzinomen, um nach der medikamentösen Tumorreduktion eine Operation in sano zu erreichen (von Minckwitz et al., 2011).

2.1.6 Prognose

Der weitere Verlauf einer Brustkrebserkrankung hängt von verschiedenen Prognosefaktoren ab. Hierzu gehören:

- die Tumorgröße und –ausdehnung,
- der Lymphknotenbefall (stärkster prognostischer Faktor),
- der Differenzierungsgrad der Zellen (Grading) und
- die Hormonrezeptoren.

Insgesamt hat sich die Prognose von Brustkrebs aufgrund einer interdisziplinären Versorgung in den letzten 20 Jahren massiv verbessert. Mittlerweile überleben neun von zehn Frauen ihre Erkrankung um 10 Jahre (Heil et al., 2012). Eine Auswertung des Robert-Koch-Instituts hatte 2010 eine 5-Jahres-Überlebensrate für den Zeitraum 2000 bis 2004 von 79,6% ermittelt (Haberland et al., 2010). In einer neueren Arbeit des Deutschen Krebsforschungszentrums waren es sogar 84% für die Jahre 2002 bis 2006 (Hiripi et al., 2012). Die aktuelle Überlebensrate aus den USA lag nach Angaben des US-National Cancer Institute für 1999 bis 2006 sogar bei 89% (Altekruse et al., 2010).

2.2 Das triple-negative Mammakarzinom

Mammakarzinome werden heute in mehrere Subgruppen eingeteilt, die sich sowohl in der Prognose als auch im Therapiekonzept stark unterscheiden. Das triple-negative Mammakarzinom bildet eine dieser Untergruppen und zeichnet sich durch fehlende (a) Östrogen (ER)- und fehlende (b) Progesteronrezeptoren (PR) sowie eine fehlende (c) HER2-Expression aus (Nielsen et al., 2004). Ein Karzinom wird vom Pathologen als triple-negativ bezeichnet, wenn in der Immunhistochemie keine (< 1%) Östrogen- und Progesteronrezeptoren (siehe Tabelle 2) nachweisbar sind sowie eine HER2-Expression von weniger als 30% bzw. ein HER2/CEP17-Quotient von unter 1,8 in der Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung (FISH) erreicht wird (siehe Tabelle 3) (Wolff et al., 2007). In der Genexpressionsanalyse zeigt sich in ca. 80% der Fälle das molekulare Profil des Basalzelltyps, auch „basal-like“ genannt. Dieser definiert sich einerseits durch eine fehlende bzw. geringe ER-, PR- und HER2-Expression und andererseits durch eine hohe Expression basaler (myo-) epithelialer Marker (CK 5⁹, CK 14⁹, Caveolin 1, CAIX¹⁰, p63¹¹, EGFR¹²). Zudem geht der basal-like Phänotyp häufig mit Mutationen der DNA-Reparaturgene (z.B. p53¹¹) und Alterationen im MAPK-/Akt-/PARP-Pathway¹³ einher (Sorlie et al., 2001). Trotz erheblicher Überschneidungen zwischen dem triple-negativen Mammakarzinom und dem basal-like Subtyp besteht eine Diskordanz von bis zu 30% (Bertucci et al., 2008).

⁹ Die Abkürzung CK 5 bzw. CK 14 steht für Zytokeratin 5 bzw. 14.

¹⁰ Die Abkürzung CAIX steht für Carbonic Anhydrase IX.

¹¹ Die Abkürzungen p63 bzw. p53 stehen für das Tumorsuppressorprotein 63 bzw. 53.

¹² Die Abkürzung EGFR steht für Epidermal Growth Factor Rezeptor.

¹³ Die Abkürzung MAPK steht für Mitogen-activated Protein Kinase, Akt für Protein Kinase B und PARP für Poly (ADP-Ribose) Polymerase.

2.2.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Die Prävalenz des triple-negativen Mammakarzinoms liegt etwa bei 12–17% (Foulkes et al., 2010). Prädisponiert sind Frauen jüngeren Alters (< 50 Jahren) mit prämenopausalem Hormonstatus und afroamerikanischer Abstammung (Carey et al., 2006). 90% aller triple-negativen Mammakarzinome und Karzinome des Basalzelltyps sind schlecht differenziert und präsentieren sich in der Histologie eher invasiv-duktral (Fulford et al., 2006). Zudem gehen triple-negative Karzinome mit überdurchschnittlich großen Tumoren und einem ausgeprägtem axillären Lymphknotenbefall einher (Dent et al., 2007). Der Proliferationsmarker Ki-67 ist häufig verstärkt nachweisbar und gibt damit Aufschluss über eine hohe Wachstumsgeschwindigkeit des Tumors (Umemura et al., 2005).

2.2.2 Therapie

Derzeit stehen für hormonabhängige und HER2-positive Tumore spezielle Therapien zur Verfügung, z.B. Tamoxifen und Aromataseinhibitoren oder Trastuzumab. Angriffspunkte hierbei sind vor allem Östrogen-, Progesteron- und HER2-Rezeptoren. In der Behandlung des triple-negativen Mammakarzinoms existieren solche zielgerichteten Therapieoptionen bisher nicht. Die Chemotherapie ist aktuell die wichtigste Säule in der Therapie des hormonunabhängigen Karzinoms – sowohl in der adjuvanten als auch metastasierten Situation. Es gibt sogar Hinweise, dass Patientinnen mit hormonrezeptornegativen Karzinomen besser auf eine primäre Chemotherapie reagieren als jene mit hormonrezeptorpositiven (Ellis et al., 2008). Es werden vor allem anthrazyklinhaltige Chemotherapeutika und Taxane verabreicht. In aktuellen klinischen Studien wird unter anderem der Einsatz von Epidermal Growth Factor Rezeptor (EGFR)-Inhibitoren untersucht, da 60% aller triple-negativen Mammakarzinome eine EGFR-Expression aufweisen. Bereits in präklinischen Daten zeigte sich die Anwendung einer Kombination aus EGFR-Inhibitoren und Chemotherapeutika wirkungsvoller als eine Monotherapie (Corkery et al., 2009). Des Weiteren befinden sich Poly(ADP-ribose)-Polymerase (PARP)-Inhibitoren in Erprobung. Besonders Zellen mit DNA-Reparaturdefekten (z.B. BRCA1) sprechen sehr gut darauf an (Tutt et al., 2010).

2.2.3 Prognose

Das triple-negative Mammakarzinom hat eine weitaus schlechtere Prognose als Mammakarzinome anderer Entitäten. Bemerkbar macht sich dies in folgenden Überlebensnachteilen:

- einer höheren Metastaserate in den ersten drei Jahren nach Ersttherapie, v.a. für Viszeral- und Zerebralmetastasen (Heitz et al., 2009),
- einer höheren Mortalität vor allem in den ersten 3–5 Jahren nach Erstdiagnose,
- einer höheren Inzidenz für Lokalrezidive (Nguyen et al., 2008) und
- einer durchschnittlich kürzeren Überlebenszeit nach einem Rezidiv (Tischkowitz et al., 2007).

Die folgende Tabelle (siehe Tabelle 4) fasst noch einmal alle Besonderheiten des triple-negativen Mammakarzinoms zusammen.

Tabelle 4: Charakteristika des triple-negativen Mammakarzinoms

Charakteristika	Beschreibung
Patientinnen	<ul style="list-style-type: none"> – Prämenopausaler Hormonstatus – Junge Frauen (< 50. Lebensjahr) – Afrikanischer Abstammung – BRCA-1-Mutationsträgerin
Tumor	<ul style="list-style-type: none"> – Invasiv-duktales Karzinom, seltene Histologien (medullär oder metaplastisch) – High-grade-Tumor – Axilläre Lymphknoten-Beteiligung – Erhöhte mitotische Aktivität – Tumornekrose – Größere Tumoren
Behandlung/Prognose	<ul style="list-style-type: none"> – Schlechte Prognose – Erhöhtes Risiko für Frührezidive, besonders in den ersten 3 Jahren – Chemotherapiesensitiv – Keine gezielte Therapie

Eigene Darstellung in Anlehnung an Bosch et al. (2010)

2.3 Die Humangenetik des Mammakarzinoms

Die Krebsentstehung ist ein sehr komplexer, mehrstufiger Prozess, der durch äußere Einflüsse wie Ernährung, Lebensweise und Umweltfaktoren beeinflusst wird. Ein wesentlicher Faktor ist jedoch die Mutation von Genen. Etwa 15–20% aller Mammakarzinome haben eine erbliche Prädisposition, d.h. es können Genvarianten für die Krebsentstehung verantwortlich gemacht werden (Bauerfeind, 2011, S. 100). Man unterscheidet heute Gene hoher Penetranz und Gene moderater bis niedriger Penetranz, die im Rahmen komplexer Erbgänge das Erkrankungsrisiko wesentlich erhöhen können (siehe Tabelle 5) (Meindl et al., 2011). Penetranz beschreibt in diesem Zusammenhang die Wahrscheinlichkeit, dass eine Mutation phänotypisch in Erscheinung tritt. Bei etwa 10% aller Mammakarzinome sind Mutationen in hoch penetranten Genen zu finden. Davon entfallen ca. 5% auf die Gene BRCA1 und BRCA2, 1% auf syndromassoziierte Gene, 1–2% auf RAD51-Paralogien¹⁴ und weitere 3–4% auf noch unbekannte Gene. Das Zusammenspiel von moderat und niedrig penetranten Genen verursacht die verbleibenden 10% der erblich bedingten Mammakarzinome (Bauerfeind, 2011, S. 100–101). Die Vererbung hoch penetranter Gene erfolgt im Gegensatz zu moderat und niedrig penetranten Genen autosomal-dominant. Sie werden über einen monogenen Erbgang mit einer Wahrscheinlichkeit von 50% an die Kinder weitergegeben.

Tabelle 5: Risikomodifikation durch Brustkrebsgene

Risikogene	Risikomodifikation	Gene/Syndrome
Hoch penetrante Gene	5- bis 20-fach	BRCA1/BRCA2/RAD51C: hereditäres Mamma- und Ovarialkarzinom-Syndrom TP53: Li-Fraumeni-Syndrom STK11/LKB1: Peutz-Jeghers-Syndrom PTEN: Cowden-Syndrom
Moderat penetrante Gene	1,5- bis 5-fach	CHEK2, PALB2, BRIP1, ATM
Niedrig penetrante Gene	0,7- bis 1,5-fach	FGFR2, TOX3, MAP3K1, CAMK1D, SNRPB, FAM84B/c-MYC, COX11, LSP1, CASP8, ESR1, ANKLE1, MERIT40 etc.

Eigene Darstellung in Anlehnung an Meindl et al. (2011)

¹⁴ Für die kürzlich identifizierten Gene RAD51C und RAD51D scheint das Erkrankungsrisiko ähnlich hoch wie bei BRCA1 und BRCA2 zu liegen (Loveday et al., 2011; Meindl et al., 2010), wobei das Ovarialkarzinomrisiko höher als das Mammakarzinomrisiko sein könnte.

In der klinischen Patientenversorgung spielen aktuell die hochpenetranten Gene BRCA1 und BRCA2 die wichtigste Rolle.

2.3.1 BRCA1

Das Tumorsuppressorgen BRCA1 wurde erstmals 1990 mit Hilfe von Kopplungsanalysen auf Chromosom 17 lokalisiert (Hall et al., 1990) und 1994 durch Positionsklonierung genauer identifiziert (Miki et al., 1994). BRCA1 liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 17 und besteht aus 24 Exons, die sich über 100 kb erstrecken. 22 dieser Exons sind an der Kodierung eines komplexen Proteins aus insgesamt 1863 Aminosäuren beteiligt (Morrison et al., 2002). Die Funktion des BRCA1-Gens ist sehr vielfältig und bis heute noch nicht vollkommen geklärt. Auf Grund struktureller Eigenschaften kann allerdings auf einige Funktionen geschlossen werden. So besitzt das Protein eine große Anzahl an funktionell relevanten Domänen, durch die es mit zahlreichen Partnern direkt interagieren kann (siehe Abbildung 1). Es spielt eine zentrale Rolle bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen durch homologe Rekombination, bei der Markierung schadhafter DNA-Abschnitte, bei der Remodellierung des Chromatins und bei der Transkription (Boulton, 2006).

Das BRCA1-Gen besitzt zwei hoch konservierte Domänen, die Ringfinger (RING)- und Kernlokalisierungs (NLS = Nuclear Localization Signal)-Domänen am N-terminalen Ende und zwei BRCT (BRCA1-C-Terminal)-Domänen am C-terminalen Ende des Proteins (Boulton, 2006). Die Ringfinger-Domäne hat die Eigenschaften einer E3-Ubiquitinligase und vermittelt Protein-Protein- bzw. Protein-DNA-Interaktionen. So bildet sie zum Beispiel mit BARD1¹⁵, einem strukturell ähnlichen Protein, ein Heterodimer, welches an der Reparatur defekter DNA direkt beteiligt ist (Hashizume et al., 2001). Die BRCT-Domäne am C-Terminal scheint ein wichtiger Interaktionsbereich für viele DNA-Reparatur-Proteine wie zum Beispiel TP53¹⁶ (Chai et al., 1999), BRIP1¹⁷ (Cantor et al., 2001) und BRCA2 (Chen et al., 1998; Welch et al., 2000) zu sein. Die DNA-bindende Domäne von BRCA1 ist im zentralen Bereich des Proteins (AS 452–1092) angeordnet (Paull et al., 2001). Dort befinden sich ebenfalls eine

¹⁵ Die Abkürzung BARD steht für BRCA1-associated Ringdomain-1-Protein.

¹⁶ Die Abkürzung TP53 steht für das Tumorsuppressorgen 53.

¹⁷ Die Abkürzung BRIP1 steht für BRCA-interacting-Protein 1.

Chk2¹⁸-abhängige Phosphorylierungsstelle an der Position 988 (Zhang et al., 2004) und Bindungsstellen für TP53 (Zhang et al., 1998), RAD51¹⁹ und den MRN²⁰-Komplex (Zhong et al., 1999). Die angrenzende SQ²¹-Region enthält mehreren Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinasen ATM²² und ATR²³, die einzeln oder im Cluster angeordnet sind.

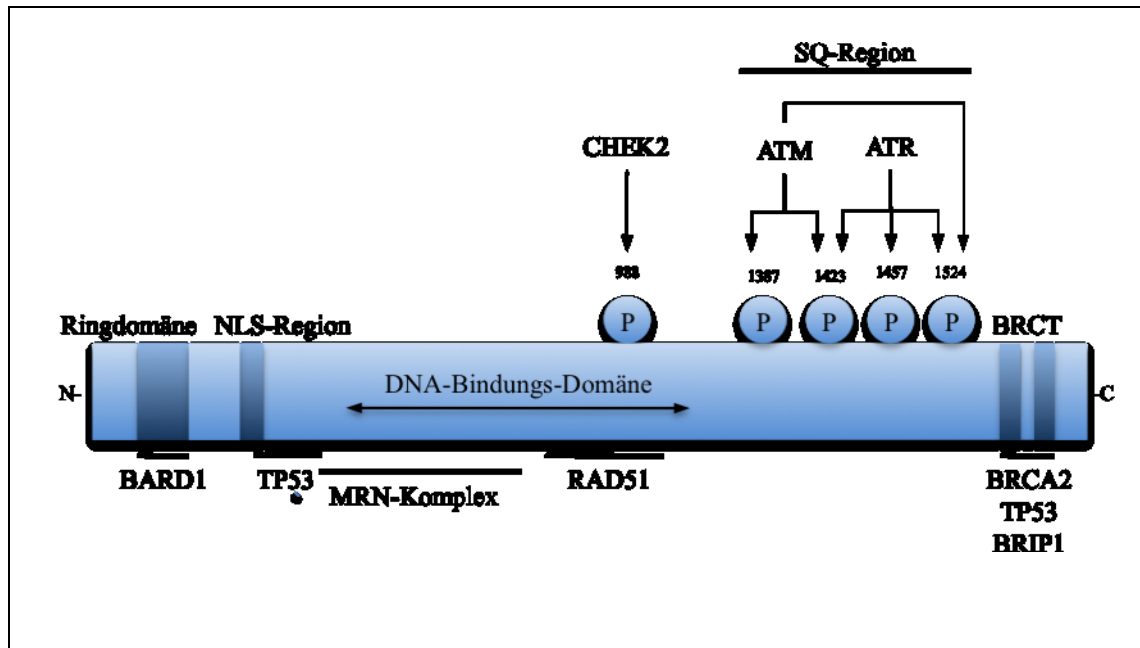


Abbildung 1: Aufbau des BRCA1-Gens

Eigene Darstellung in Anlehnung an Boulton (2006); Zhang und Powell (2005); Chai et al. (1999); Cantor et al. (2001); Chen et al. (1998); Welsh et al. (2000); Paull et al. (2001); Zhang et al. (1998); Zhang et al. (2004); Zhong et al. (1999)

Derzeit sind weltweit über 2000 Mutationen des BRCA1-Gens bekannt. Das Spektrum der Mutationen variiert je nach ethnischer und geographischer Zugehörigkeit. 55% der Mutationsvarianten konzentrieren sich auf das besonders große Exon 11. Die übrigen Mutationen verteilen sich relativ gleichmäßig über das gesamte Gen. Ca. 30% von ihnen sind Missense-Mutationen (sinnverändernde Mutation) oder Leserasterverschiebungen (Frameshift-Mutation) und Proteinverkürzungen, die durch Deletion entstehen (Morrison et al., 2002; Passarge, 2008, S. 272). Die häufigste Mutation mit 30–40% in Europa und Nordamerika ist eine Insertion der Base Cytosin an Position

¹⁸ Die Abkürzung Chk2 steht für Checkpoint-Kinase 2.

¹⁹ Die Abkürzung RAD51 steht für Radiation-Protein 51.

²⁰ Die Abkürzung MRN steht für MRE11, RAD50, NBS1.

²¹ Die Abkürzung SQ steht für Serin/Glutamin.

²² Die Abkürzung ATM steht für Ataxia Telangiectasia Mutated.

²³ Die Abkürzung ATR steht für Ataxia Telangiectasia and Rad3-related Protein.

5382 (c.5266dupC - alte Nomenklatur „5382insC“) in Exon 20, die zu einem vorzeitigen Kettenabbruch führt. Die Veränderung ist auch als häufig vorkommende Gründermutation bei aschkenasischen Juden und in vielen osteuropäischen Staaten bekannt (Gorski et al., 2000). Des Weiteren findet sich die Missense-Mutation c.181T>G (alte Nomenklatur „300T>G“) relativ häufig. Sie verursacht einen Austausch der Aminosäure Cystein durch Glycin an Position 61 in der Ringfinger-Domäne des Proteins (Meindl et al., 2002).

Eine Metaanalyse von 22 Studien mit insgesamt 8139 Brust- und/oder Eierstockkrebsfällen aus 12 Ländern ergab für Trägerinnen einer BRCA1-Mutation ein kumuliertes Erkrankungsrisiko bis zum 70. Lebensjahr von 65%, an Brustkrebs zu erkranken (Antoniou et al., 2003). Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei Mitte bis Ende 40, das bedeutet 1–2 Lebensjahrzehnte früher, als sporadische oder BRCA2-assoziierte Brustkrebsfälle zu erwarten wären.

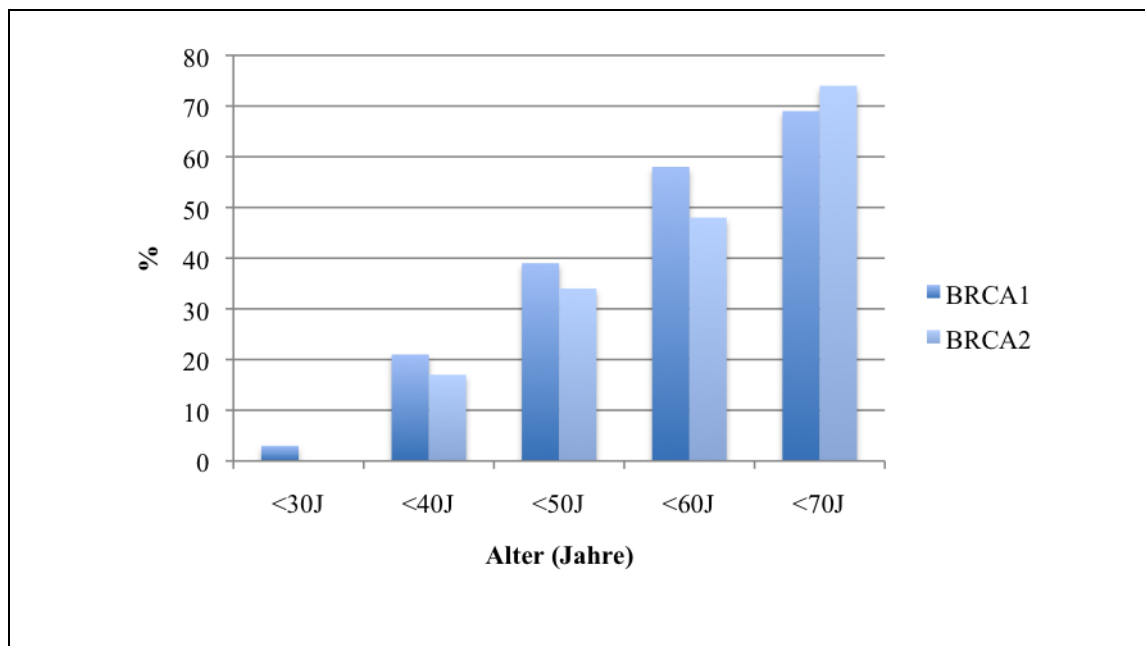


Abbildung 2: Altersbezogene Erkrankungswahrscheinlichkeit für BRCA1/2-Mutationsträgerinnen

Eigene Darstellung in Anlehnung an das Deutsches Konsortium für familiären Brust und Eierstockkrebs (2011)

Die Wahrscheinlichkeit, an Eierstockkrebs zu erkranken, steigt bei einer Veränderung des Gens bis zum 70. Lebensjahr auf 39% (Antoniou et al., 2003). Neben einem erhöhten Risiko für Brust- und Eierstockkrebs scheint auch das allgemeine Krebsrisiko erhöht zu sein (Risch et al., 2006). Die Tumore von BRCA1-Mutationsträgerinnen lassen sich morphologisch, immunhistochemisch und molekulargenetisch eindeutig von

denen, die sporadisch oder durch eine BRCA2-Mutation entstehen, unterscheiden. Mehr als 75% der Mammakarzinome sind entweder mit einem triple-negativen, einem basal-like Phänotyp oder beiden assoziiert (Foulkes et al., 2010). Sie gehören meist dem invasiv-duktalem Subtyp an, haben eine schlechte Differenzierung (G3-Grading) und proliferieren aggressiver. 5–10% können dem medullären Subtypen zugeordnet werden. Im Gegensatz dazu tritt diese Unterform nur in ca. 1% der Fälle beim sporadischen Mammakarzinom auf. Das BRCA1-assoziierte Mammakarzinom geht häufig mit einer Überexpression von p53 und Ki-67 und einer verminderten Expression von Cyclin-E und p27²⁴ einher (Gadzicki et al., 2009; Honrado et al., 2005).

2.3.2 BRCA2

1995 entdeckten Wooster et al. (1995) das BRCA2-Gen auf dem langen Arm des Chromosom 13. Das aus 3418 Aminosäuren bestehende Protein, das von 27 Exons kodiert wird, ist fast doppelt so groß wie das BRCA1-Produkt. Das BRCA2-Protein besitzt ähnlich wie das BRCA1-Gen zahlreiche funktionell relevante Domänen und auch eine große Anzahl an Interaktionspartnern. Hauptaufgabe ist die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen mittels homologer Rekombination.

Das BRCA2-Protein ist charakterisiert durch eine N-terminale Transkriptions-Aktivierungsdomäne, die mit P/CAF²⁵ interagiert – einem Cofaktor, der die Eigenschaften einer Acetyltransferase besitzt (Fuks et al., 1998). Zudem befinden sich fünf Phosphorylierungsstellen der Polo-like-Kinase 1 (PLK1) am N-terminalen Ende (Lin et al., 2003). Das zentral gelegene Exon 11 des BRCA2-Gens kodiert für acht BRC-Repeats von je ca. 30 Aminosäuren, die zum Teil direkt mit RAD51 interagieren (Wong et al., 1997). Mit Hilfe dieser Interaktion wird z.B. die DNA-Reparatur von Doppelstrangbrüchen direkt eingeleitet. Zudem sind BRCA2 und RAD51 an der Unterdrückung der Transkription von p53 in Tumorzellen beteiligt (Marmorstein et al., 1998). Ebenfalls im zentralen Bereich befindet sich die sog. Ovarian Cancer Cluster Region (OCCR). Mutationen innerhalb dieses Bereichs gehen mit einem erhöhten Risiko, an Eierstockkrebs und einem verringerten Risiko an Brustkrebs zu erkranken, einher (Thompson et al., 2001). Das C-terminale Ende des Proteins ist gekennzeichnet

²⁴ Die Abkürzung p27 steht für Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 1B (CDKN1B).

²⁵ Die Abkürzung P/CAF steht für p300/CBP-associated-Faktor.

durch eine konservierte Domäne mit drei OB (Oligonukleotid-bindende)-Faltblättern, eine NLS-Region und eine Kontaktstelle für BCCIP α ²⁶ – einem wichtigen Cofaktor in der Tumorsuppression (Liu et al., 2001). Eine Interaktion zwischen RAD51 und den funktionellen Domänen am C-terminalen Ende ist nachgewiesen (Rajagopalan et al., 2010). Die verschiedenen Mutationen verteilen sich über die gesamte kodierende Region, wobei Exon 10 und 11 zusammen etwa 60% der kodierenden Region ausmachen (Welch et al., 2000). Ca. 80% der Mutationen sind kleine Deletionen oder Insertionen, die zu einer Proteinverkürzung führen. Im Gegensatz zum BRCA1-Gen sind für das BRCA2-Gen weit mehr sogenannte unklare Varianten (Unclassified variants = UVs) bekannt. Hierunter versteht man zum Austausch einer einzelnen Aminosäure führende Missense-Mutation, deren Bedeutung nicht sicher geklärt ist.

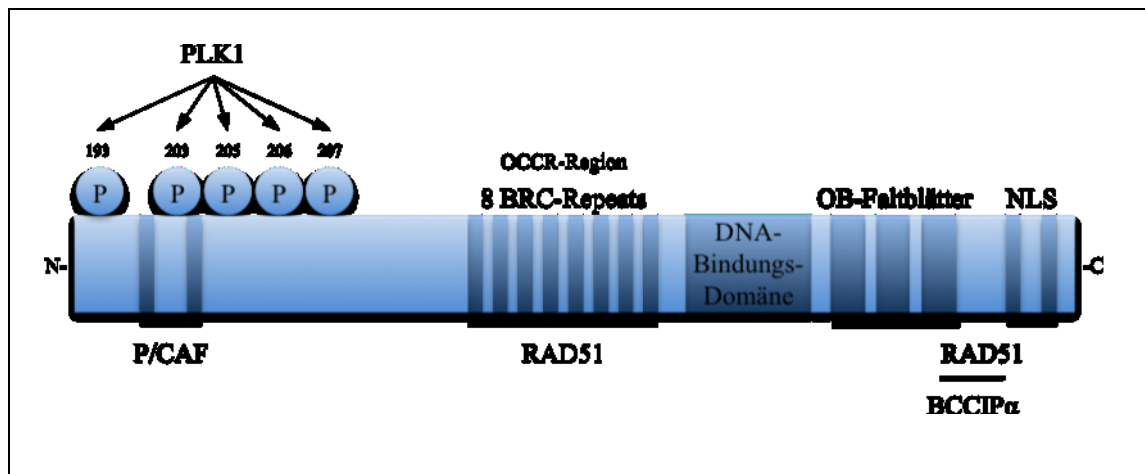


Abbildung 3: Aufbau des BRCA2-Gens

Eigene Darstellung in Anlehnung an Boulton (2006); Fuks et al. (1998); Lin et al. (2003); Wong et al. (1997); Thompson et al. (2001); Liu et al. (2001); Rajagopalan et al. (2010).

Für Mutationsträger ergibt sich ein Risiko von 60%, bis zum 50. Lebensjahr an Brustkrebs und ein Risiko von 25%, an Ovarialkrebs zu erkranken. Des Weiteren wird ein erhöhtes Risiko für Kolon-, Prostata- und Pankreaskrebs beschrieben (Passarge, 2008, S. 272). Die Tumore BRCA2-assoziiierter Mammakarzinome haben meist ein Grading Grad 2–3 und exprimieren häufiger als BRCA1-assoziierte Karzinome Östrogen- und Progesteronrezeptoren. Eine vermehrte Bildung von Cyclin D1 und p27 wird beschrieben (Honrado et al., 2005). Eine eindeutige Differenzierung zwischen BRCA2-positiven und sporadischen Tumoren ist derzeit nicht eindeutig möglich (Foulkes et al., 2005).

²⁶ Die Abkürzung BCCIP α steht für BRCA and CDKN1A interacting-Protein.

3 Methode und Material

Nachdem die relevanten Grundlagen näher erläutert wurden, wird nun im folgenden Abschnitt der Gang unserer Untersuchung geschildert, beginnend mit der Patientenrekrutierung und -befragung. Der zweite bzw. dritte Teil widmet sich dann dem allgemeinen Ablauf einer genetischen Testung und deren Auswertung.

Die Studie wurde nach positiver Begutachtung der Ethikkommission der Universität Salzburg, Österreich durchgeführt.

3.1 Patientenrekrutierung und -befragung

3.1.1 Patientenkollektiv

Alle Studienteilnehmerinnen wurden zwischen 2005 und 2010 in der Frauenklinik des Rotkreuzklinikums München, unter der Leitung von Prof. Dr. med. Wolfgang Eiermann, wegen eines Mammakarzinoms behandelt und anhand histopathologischer Merkmale des Tumors (Östrogenrezeptor-, Progesteronrezeptor-, HER2-Status) als triple-negativ identifiziert. Der immunhistochemische Nachweis von Östrogen- (Klon 6F11) und Progesteronrezeptoren (Klon 16)²⁷ erfolgte unter der Verwendung von Mausantikörper (IgG1). Für die HER2-Immunhistochemie wurden polyklonale Hasenantikörper (Klon A0485)²⁸ verwendet. Die Studie unterlag keinen weiteren Selektionskriterien.

3.1.2 Patientenrekrutierung

Die Identifikation der Studienteilnehmerinnen mit der Diagnose eines triple-negativen Mammakarzinoms erfolgte anhand von Patientendaten aus dem Archiv der Gemeinschaftspraxis Pathologie Dr. med. B. Högel, Dr. Dr. med. C. Becker und Dr. med. M. Beer. Mit Hilfe eines Datenexports wurde zunächst eine Excel-Tabelle mit

²⁷ Klon 6F11 und Klon 16 wurden beide von der Firma DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Dr. Christian Sartori GmbH & Co. KG, Hamburg, Deutschland bereitgestellt.

²⁸ Klon A0485 wurde von der Firma HercepTM-Test; Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland bereitgestellt.

folgenden Informationen erstellt: Vor-, Nachname, Geburtsdatum, Rezeptorstatus, Tumorgröße, Differenzierung und Histologie des Karzinoms. In einem weiteren Schritt wurde diese Liste mit den jeweiligen Kontaktdaten der Frauenklinik ergänzt.

Nach Identifikation von insgesamt 126 Frauen wurden diese schriftlich kontaktiert und zu einem einstündigen Gespräch eingeladen. Bereits im Anschreiben wurden die Patientinnen über Art, Ziel und Freiwilligkeit der Teilnahme an der Studie aufgeklärt. 30 von den 126 angeschriebenen Patientinnen erklärten sich mit der Teilnahme an der Untersuchung bzw. einer genetischen Beratung und Testung einverstanden.

In dem persönlichen Gespräch wurde gezielt herausgearbeitet, ob die Notwendigkeit einer genetischen Testung und/oder spezieller Vorsorgeuntersuchungen in entsprechendem Fall bestand oder ratsam wäre.

Die Beratung wurde von Herrn Prof. Dr. med. Peter Meyer persönlich oder unter dessen Betreuung von der Autorin selbst durchgeführt und dauerte in der Regel 45–60 Minuten.

3.1.3 Teilstandardisierter Fragebogen

Zur Anamneseerhebung wurde ein speziell erarbeiteter teilstandardisierter Fragenbogen verwendet. Dieser wurde mit krankheitsspezifischen Daten aus der Patientenakte bzw. der zuvor erstellten Excel-Tabelle ergänzt.

Der Fragebogen setzte sich wie folgt zusammen (siehe Anhang 2):

- 1) Fragen zur Person
 - Alter
 - Größe
 - Gewicht
 - BH-Größe
- 2) Fragen zur Krankengeschichte des Patienten (z.T. ergänzend zur Patientenakte)
 - Datum der Erstdiagnose
 - Alter der Patientin bei Erstdiagnose
 - Therapie
 - Metastasierung

- Zweittumor
- 3) Fragen zu Risikofaktoren des Mammakarzinoms
- Menarchealter
 - Menopausealter
 - Hormonersatztherapie
 - Rauchverhalten
- 4) Sozialanamnese
- Berufsanamnese
 - Berufliche Exposition mit kanzerogenen Stoffen
 - Sportliche Betätigung

3.1.4 Stammbaumanalyse

Zur Bestimmung des individuellen genetischen Risikos und zur Klärung der Frage, ob es sich um eine erbliche Brustkrebserkrankung handelte, wurde eine detaillierte Familienanamnese erhoben und ergänzend eine Stammbaumskizze erstellt. Folgende Faktoren sollten nach Möglichkeit erfasst worden sein:

- eine vollständiger Stammbaum über mindestens 3 Generationen unter Einschluss der mütterlichen als auch väterlichen Linie,
- die Diagnose aller Tumore aller betroffenen Angehörigen,
- das Alter bei Erstdiagnose bei allen Tumorpatienten der Familie und
- das Alter und das Geschlecht aller betroffenen und nicht betroffenen Familienmitglieder.

Die vorgenannten Anforderungen werden vom National Institute of Clinical Excellence (NICE) empfohlen (NICE, 2006). Anhand dieser Daten wurden das Lebenszeitrisiko, an Brustkrebs zu erkranken, und die Wahrscheinlichkeit, Mutationsträgerin zu sein (Heterozygotenwahrscheinlichkeit), berechnet. Präventive Maßnahmen werden ab einem Lebenszeitrisiko von 30% oder einer Heterozygotenwahrscheinlichkeit von 20% empfohlen.

3.2 Genetische Testung

3.2.1 Klinische Kriterien zur genetischen Testung auf BRCA1 und BRCA2

Die Wahrscheinlichkeit eine BRCA1- und BRCA2-Mutation zu tragen, ist von bestimmten Konstellationen wie Erkrankungshäufigkeit, Alter bei Erstdiagnose und dem erkrankten Organ (Brust, Eierstock) abhängig. In Deutschland wird gegenwärtig eine Mutationsanalyse als medizinisch indiziert erachtet, sobald die empirische Wahrscheinlichkeit für eine Mutation eines Hochrisikogens über 10% liegt. Folgende Familienkonstellationen lassen eine solche Mutationswahrscheinlichkeit mindestens erwarten:

- zwei an Brustkrebs erkrankte Frauen (eine davon im Alter ≤ 50 Jahre bei Erstdiagnose),
- drei an Brustkrebs erkrankte Frauen (unabhängig vom Alter bei Erstdiagnose),
- eine an Brustkrebs erkrankte Frauen und eine an Eierstockkrebs erkrankte Frau (unabhängig vom Alter bei Erstdiagnose),
- eine an Brustkrebs und Eierstockkrebs erkrankte Frauen (unabhängig vom Alter bei Erstdiagnose),
- zwei an Eierstockkrebs erkrankte Frauen (unabhängig vom Alter bei Erstdiagnose),
- ein an Brustkrebs erkrankter Mann und eine an Brustkrebs oder Eierstockkrebs erkrankte Frau (unabhängig vom Alter bei Erstdiagnose),
- eine an Brustkrebs erkrankte Frau im Alter von ≤ 35 Jahre bei Erstdiagnose oder
- eine an bilateralem Brustkrebs erkrankte Frau im Alter von ≤ 50 Jahren bei Erstdiagnose (Gadzicki et al., 2011).

3.2.2 Material

Im Rahmen der Beratung wurden den Patientinnen nach entsprechender Aufklärung und schriftlich dokumentiertem Einverständnis je 20ml Blut aus einer Armvene in ein EDTA²⁹-Röhrchen entnommen. Alle Blutproben wurden bis zur Weiterverarbeitung bei +4°C bis +8°C gelagert und am selben oder spätestens am darauffolgenden Tag bei

²⁹ Die Abkürzung EDTA steht für Ethylenediaminetetraacetic Acid.

2000 Umdrehungen pro Minute für insgesamt 10 Minuten zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand abpipettiert und das Plasma und die zellulären Bestandteile in getrennten Probengefäßen bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren. Hierbei bekam jede Probe eine patientenspezifische Nummer und wurde dadurch pseudonymisiert.

3.2.3 Genotypisierung

Die Analysen wurden am Institut für Molekulare Medizin in München (Ärztlicher Direktor: PD Dr. med. Peter Meyer) durchgeführt. Nach Präparation der DNA aus der Patienten-Blutprobe mit Hilfe des Extraktions-Kits³⁰ der Firma Gentra wurden alle angeforderten codierenden Abschnitte inklusive in der Regel mindestens 20 die Exons flankierender Basen der Gene BRCA1 und BRCA2 vervielfältigt und anschließend einzelsträngig sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte unter der Verwendung des BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kits und des 3730xl DNA Analyzers mit 96 Kapillaren-Arrays³¹. Zusätzlich wurde eine Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA)³² zur Detektion größerer (ein oder mehrere Exons umfassende) Duplikationen und Deletionen der oben genannten Gene durchgeführt.

3.3 Mutationsanalyse

Die Ergebnisse der Laboranalysen wurden in einem detaillierten Bericht zusammengetragen und enthielten neben den probenspezifischen Daten folgende Angaben:

- DNA Probennummer,
- Datum der Testung,
- Ergebnisse der Sequenzierungsanalyse, d.h. mögliche Abweichungen von der Referenzsequenz
- Ergebnisse der MLPA-Analyse, d.h. Abweichungen von der erwarteten Peakhöhe und -fläche und
- eine medizinische Interpretation der Ergebnisse.

³⁰ Das Extraktion-Kit "PureGene DNA Isolation Kit" der Firma Gentra wurde verwendet.

³¹ BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kits und 3730xl DNA Analyzers sind Produkte der Firma Applied Biosystems, Foster City, CA 94404 USA. Für weitere Informationen siehe www.appliedbiosystems.com.

³² Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) ist ein Produkt der Firma MRC-Holland, Amsterdam, Niederlande.

Die Veränderungen auf DNA- und Proteinebene wurden nach der aktuellen Nomenklatur der Human Genome Variation Society (HGVS) benannt (HGVS, 2011). Zur medizinischen Interpretation der entdeckten Genmutationen wurden sowohl eine ausführliche Literatur-Recherchen durchgeführt als auch folgende öffentlich zugängliche Datenbanken herangezogen:

- BIC³³-Datenbank (<http://research.nhgri.nih.gov>)
- kConFab³⁴-Datenbank (<http://www.kconfab.org/Progress/Mutations.aspx>)
- LOVD³⁵-Datenbank (<http://chromium.liacs.nl/LOVD2/cancer/home.php>)

Im Wesentlichen ging es bei der Interpretation um die Beurteilung jeder einzelnen Sequenzabweichung und deren mögliche Relevanz für das Auftreten von Brustkrebs.

In Anlehnung an eine Studie von Johnson et al. (2007) wurde auch das Brustkrebsrisiko für die Kombination bestimmter Genvarianten berechnet. Bei der besagten Studie handelt es sich um eine genetische Untersuchung von 473 Fällen mit zwei primären Brustkrebserkrankungen und 2463 gesunden Kontrollen nicht genannter ethnischer Herkunft. Es konnten insgesamt 25 Varianten in den Genen BRCA1, BRCA2, ATM, CHEK2 und TP53 identifiziert werden, für die sich vor allem in Kombination zueinander eine erhöhte Brustkrebswahrscheinlichkeit ergibt (p (trend) = 0,005). Fünf dieser Varianten finden sich in BRCA1 (c.1067A>G, c.2077G>A, c.3418A>G, c.3548A>G, c.4837A>G) und neun in BRCA2 (c.865A>C, c.1114C>A, c.5744C>T, c.6100C>T, c.8503T>C, c.8567A>C, I2944F, c.9976A>T, c.10234A>G). Je nach Anzahl der sogenannten "Risiko-Allele" (homozygote Varianten werden doppelt gezählt) erhöht sich das rechnerische Brustkrebsrisiko. Die Odds Ratios³⁶ sind dabei wie folgt: 1 = 1,46; 2 = 1,39; 3 = 1,75; 4 = 1,56; 5 = 1,31; 6 = 1,84; 7 = 2,10; 8 = 4,02; 9 = 8,04 (Johnson et al., 2007). Die in der Sequenzierung ermittelten Veränderungen unserer Untersuchung wurden mit denen in der Studie verglichen und die Anzahl der Risikoallele bestimmt. Hieraus resultierte eine Risikoabschätzung, an Brustkrebs zu erkranken.

³³Die Abkürzung BIC steht für Breast Cancer Information Core.

³⁴Die Abkürzung kConFab steht für Kathleen Cuninghame Foundation Consortium for Research into Familial Breast Cancer.

³⁵Die Abkürzung LOVD steht für Leiden Open Variation Database der Leiden University Medical Center.

³⁶Die Odds Ratio ist ein statistisches Maß, welches die Stärke eines Zusammenhangs von zwei Merkmalen angibt. Es ist somit ein Art Assoziationsmaß.

4 Ergebnisse

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der deskriptiven Untersuchung im Detail dargestellt.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von Microsoft Excel 2007. Zunächst wurden alle Ergebnisse, sowohl die der Laboranalysen als auch die des Fragebogens, in eine Excel-Tabelle eingetragen. In einem zweiten Schritt wurden die relevanten Mittelwerte und Mediane, z.B. für das durchschnittliche Erkrankungsalter, berechnet.

4.1 Überblick

Insgesamt wurden 30 Frauen mit gesichertem triple-negativem Mammakarzinom in die Studie aufgenommen. Sechs der Frauen, d.h. 20%, wiesen eine krankheitsassoziierte Veränderung auf – eine im BRCA1-Gen (3,3%) und fünf im BRCA2-Gen (16,7%).

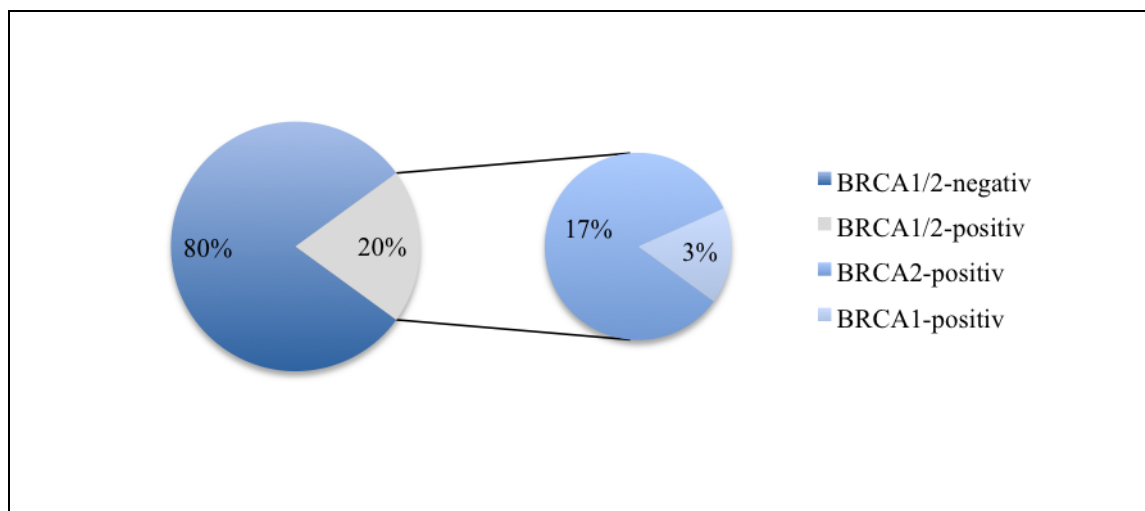


Abbildung 4: Prozentuale Verteilung der triple-negativen Kohorte

Eigene Darstellung

Insgesamt konnten wir vier bereits bekannte pathologische Frameshift-Mutationen (BRCA1: c.5266dupC; BRCA2: c.1029delA, c.5645C>A, c.6444dupT) und eine unbekannte Splice-Site-Mutation (BRCA2: c.476-1G>A) mit jedoch klarer pathologischer Wirkung identifizieren. Des Weiteren ermittelten wir eine Missense-Mutation in BRCA2 (c.7878G>C), die in der Literatur als wahrscheinlich pathologisch

klassifiziert wurde. Eine detaillierte Beschreibung der einzelnen krankheitsassoziierten Mutationen erfolgt im Abschnitt 4.2.

Neben den pathologischen Mutationen entdeckten wir insgesamt fünf Veränderungen (16,7%) mit allenfalls geringen klinischen Auswirkungen, d.h. Low Clinical Significance (LCS), im BRCA1-Gen. Davon zeigten vier Fälle (13,3%) die Veränderung c.4956G>A und ein Fall (3,3%) die Veränderung c.1487G>A. Im BRCA2-Gen fanden wir ebenfalls fünf Mutationen (16,7%) mit geringer klinischer Relevanz (LCS). Davon identifizierten wir viermal (13,3%) die Genvariante c.5744C>T und einmal (3,3%) die Variante c.8851G>A. Des Weiteren wurden zwei Mutationen (6,6%) mit unklarer Auswirkung (BRCA2: c.68-7T>A; c.4570T>G) ermittelt. Eine detaillierte Beschreibung der einzelnen nicht krankheitsassoziierten Mutationen erfolgt in Abschnitt 4.3.

Von allen triple-negativen Brustkrebsfällen zeigten 15 von 30 (50%) ein frühes Erkrankungsalter und/oder eine familiäre Krebshäufung, so dass die deutschen Kriterien für das Mutationsscreening von BRCA1 und BRCA2 erfüllt waren. Die Mutationsrate innerhalb der Gruppe, die die Kriterien für eine Testung nicht erfüllten, lag bei 13% (2/15).

Das durchschnittliche Erkrankungsalter bei Erstdiagnose lag für die gesamte Studiengruppe bei 57 Jahren, für die sechs Mutationsträgerinnen bei 51 Jahren und für die BRCA1/2-negative Gruppe bei 59 Jahren (n = 24) (siehe Abbildung 5).

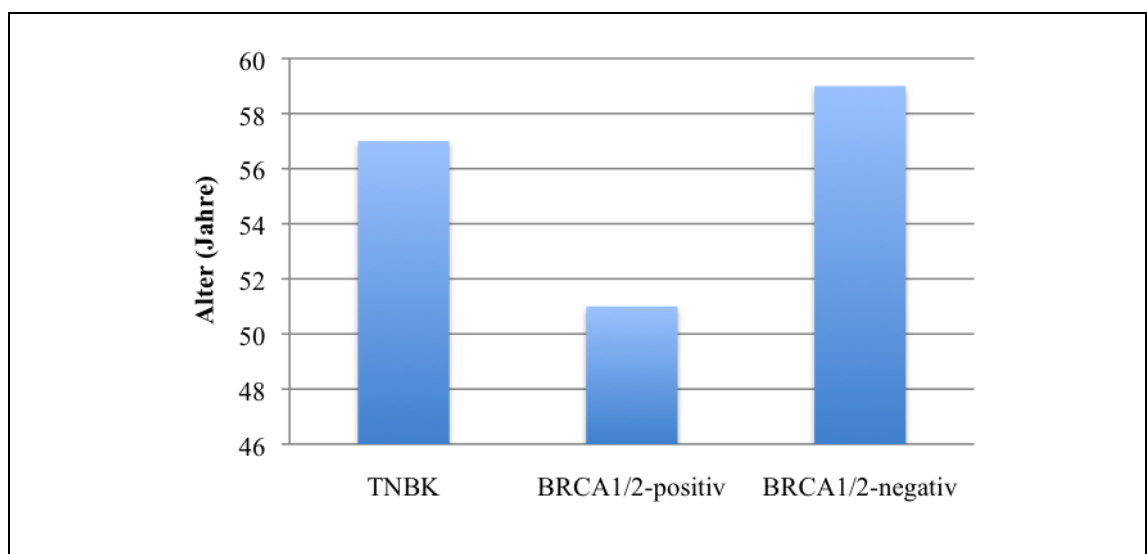


Abbildung 5: Durchschnittsalter der Studienteilnehmerinnen

Eigene Darstellung

4.2 Krankheitsassoziierte BRCA-Mutationen

Im folgenden Abschnitt werden die krankheitsassoziierten Mutationen detailliert beschrieben (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Charakteristika der BRCA1/2-positiven Gruppe

DNA	BRCA1-Mutation	BRCA2-Mutation	Alter (ED)	Zweittumor (Alter)	Familienanamnese (Alter bei ED)	Gentest-kriterien	Risiko allele
1153	<i>PM</i> <i>c.5266dupC</i>	–	43	BK (48)	Mutter BK (60)	ja	1
1110	LCS <i>c.1487G>A</i>	<i>PM</i> <i>c.1029delA</i> ; RP (TNBK) <i>c.5744C>T</i>	69	–	6 x BK ms	ja	2
1129	–	<i>PrPM</i> <i>c.7878G>C</i>	61	–	4 x LK ms, Großmutter ms BK (61), 4 x Krebs ms	nein	1
1156	–	<i>PM</i> <i>c.5645C>A</i>	37	–	–	nein	3
1186	–	<i>PM</i> <i>c.476-1G>A</i>	56	–	Schwester BK (52), Mutter OvK (63)	ja	4
1245	–	<i>PM</i> <i>c.6444dupT</i>	38	BK (43)	Mutter OvK (60)	ja	3
		Median	50				3
		Mittelwert	51			4/6 (67%)	

Abkürzungen: ED: Erstdiagnose; BK: Brustkrebs; LK: Lungenkrebs; OvK: Ovarialkarzinom; ms: mütterlicherseits; LCS (Low Clinical Significance): geringe klinische Relevanz; PM (Pathogenic Mutation): krankheitsassoziierte Mutation; PrPM (Predictive PM): wahrscheinlich krankheitsassoziierte Sequenzveränderung; RP (Risk Conferring Polymorphism): Risiko tragender Polymorphismus

Eigene Darstellung

4.2.1 BRCA1-Mutationen

BRCA1, Exon 20, c.5266dupC heterozygot

Diese Sequenzvariante *c.5266dupC* (alte Nomenklatur: *c.5382insC*) wurde bei der Patientin mit der DNA-Nummer 1153 gefunden. Sie erkrankte erstmals im Alter von 43 Jahren an Brustkrebs. Mit 48 Jahren entdeckte man einen weiteren Tumor in der Brust. In der Familie erkrankte die Mutter mit 60 Jahren ebenfalls an einem Brustkrebs. Die deutschen Kriterien für den Gentest waren in diesem Fall klar erfüllt.

Bei der oben genannten Sequenzvariante handelt es sich um die Insertion der Base Cytosin nach der Position 5266 der codierenden genomischen DNA in Exon 20 des

BRCA1-Gens (siehe Abbildung 6). Diese führt ab Aminosäure 1756 zu einer veränderten Aminosäuresequenz und 73 Aminosäuren später zum vorzeitigen Abbruch der Proteinsynthese bei Aminosäure 1829 von insgesamt 1863. Die BRCT Domäne wird hierdurch nicht vollständig ausgebildet. Es ist davon auszugehen, dass viele Interaktionen mit anderen DNA-Reparatur-Proteinen wie z.B. TP53, BRIP1 und BRCA2 betroffen sind. Nach aktueller Datenlage stellt diese Mutation, wie bereits unter 2.3.1 erwähnt, mit 30–40% die häufigste Mutation im BRCA1-Gen in Europa dar. In der BIC-Datenbank ist die Mutation 1063 Mal aufgeführt und als pathogen eingestuft. In der kConFab-Datenbank ist die Veränderung in 17 Familien dokumentiert und wird ebenfalls als pathogen erachtet. In der Datenbank LOVD ist die Veränderung siebenmal mit unbekannter klinischer Relevanz eingetragen. Eine Metaanalyse von 22 einschlägigen Studien mit insgesamt 8139 Fällen von Brust- und/oder Eierstockkrebs aus 12 Ländern ergab für diese BRCA1-Variante kumulierte Risiken in Höhe von 67% (95% KI = 36–83%) bis zum 70. Lebensjahr für Brustkrebs und 33% (95% KI = 8–50%) für Eierstockkrebs (Antoniou et al., 2005). Aufgrund der Datenlage wird die hier identifizierte Mutation von uns als eindeutig krankheitsassoziiert bewertet.

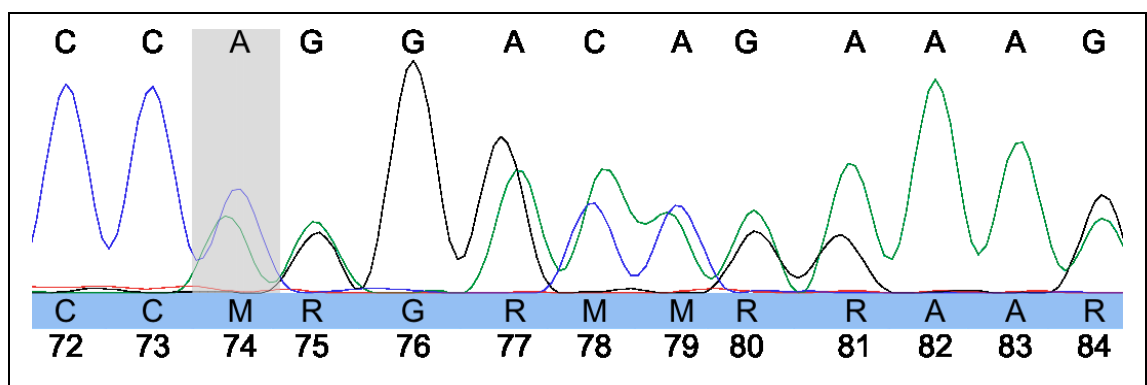


Abbildung 6: Elektropherogramm³⁷ des Exon 20, BRCA1-Gen

Die Darstellung wurde dem Sequenzierungs-Report entnommen.

³⁷ Jeder der vier farbigen Peaks steht für ein Nukleotid der DNA: A (Adenin), C (Cytosin), G (Guanin), T (Thymin).

4.2.2 BRCA2-Mutationen

BRCA2, Exon 10, c.1029delA heterozygot

Diese Sequenzvariante wurde bei der Patientin mit der DNA-Nummer 1110 entdeckt. Sie erkrankte im Alter von 69 Jahren an Brustkrebs. Ein weiterer Tumor wurde bis zum damaligen Zeitpunkt nicht diagnostiziert. In der Familienanamnese zeigten sich insgesamt sechs Brustkrebsfälle. Die Kriterien für die Durchführung eines Gentests waren somit eindeutig erfüllt.

Bei der Sequenzvariante c.1029delA handelt es sich um eine Deletion der DNA-Base Adenin an der Position 1029 der codierenden genomischen DNA in Exon 10 des BRCA2-Gens. Diese Veränderung führt zum Austausch der basischen Aminosäure Lysin zur neutralen Aminosäure Asparagin an Position 343 von 3418 des Proteins und in der Folge nach fünf Aminosäuren zum vorzeitigen Kettenabbruch (siehe Abbildung 7). Dem verkürzten Protein fehlen die DNA-Bindungsdomäne und die in Exon 11 codierten BRC-Repeats, die laut Powell und Kachnic (2003) eine große Rolle bei der Interaktion mit dem Protein RAD51 spielen. In der BIC-Datenbank ist diese Veränderung zweimal als krankheitsassoziiert eingetragen. In der kConFab- und in der LOVD-Datenbank ist die Veränderung bisher nicht dokumentiert. In einer Untersuchung von 1171 unselektierten Patientinnen mit Eierstockkrebs aus der Provinz Ontario in Kanada wurde die hiesige Veränderung ebenfalls beschrieben, Angaben über das Lebenszeitrisiko für die Trägerinnen fehlen (Risch et al., 2006; Risch et al., 2001). Aufgrund der Datenlage und des Mutationstyps wird diese Veränderung als krankheitsassoziierte Sequenzvariante bewertet.

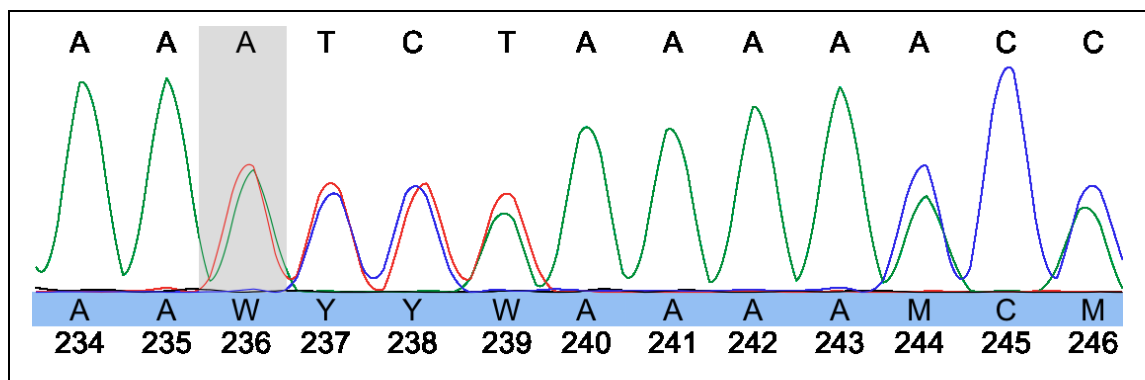


Abbildung 7: Elektropherogramm des Exon 10, BRCA2-Gen

Die Darstellung wurde dem Sequenzierungs-Report entnommen.

BRCA2, Exon 17, c.7878G>C heterozygot

Die Patientin mit der DNA-Nummer 1129 ist Trägerin der oben genannten Mutation. Sie erkrankte im Alter von 61 Jahren an einem Mammakarzinom. Ein Zweitumor ist nicht bekannt. Bei der Großmutter wurde im Alter von 61 Jahren ein Brustkrebs diagnostiziert. Die Kriterien für eine Testung auf BRCA1/2 waren somit nicht erfüllt.

Bei der entdeckten Sequenzvariante handelt es sich um einen Austausch der DNA-Base Guanin zu Cytosin an der Position 7878 der codierenden genomischen DNA in Exon 17 des BRCA2-Gens (siehe Abbildung 8). Diese Veränderung führt zum Austausch der aromatischen, unpolaren und neutralen Aminosäure Tryptophan zur aliphatischen, polaren und neutralen Aminosäure Cystein an Position 2626 des Proteins. Die Variante liegt in der konservierten C-terminalen Domäne, welche die OB-Faltblätter beinhaltet. In der BIC-Datenbank ist diese Veränderung elfmal eingetragen und wird mit unbekannter Relevanz eingestuft. In der kConFab-Datenbank ist die Variante nicht dokumentiert. In der Datenbank LOVD ist die Veränderung zweimal als "Predicted Deleterious" eingetragen. Die Mutation wurde im Rahmen einer Software-basierten Vorhersage über die funktionellen Auswirkungen von DNA-Veränderungen in der C-terminalen DNA-Bindungsdomäne analysiert und als krankheitsassoziiert angesehen (Karchin et al., 2008). In einer Studie von Borg et al. (2010) wurden 705 Frauen unterschiedlicher Herkunft mit beidseitigem Brustkrebs und 1398 Frauen mit einseitigem Brustkrebs mittels Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC) und Sequenzierung auf Mutationen in den Genen BRCA1 und BRCA2 untersucht. Die hiesige Veränderung wurde einmal in der Gruppe der Patientinnen mit beidseitigem Brustkrebs (0,1%) gefunden und zeigt einen Krankheitsbezug. Aufgrund der veröffentlichten Daten wird die Veränderung als wahrscheinlich krankheitsassoziierte Sequenzveränderung bewertet.

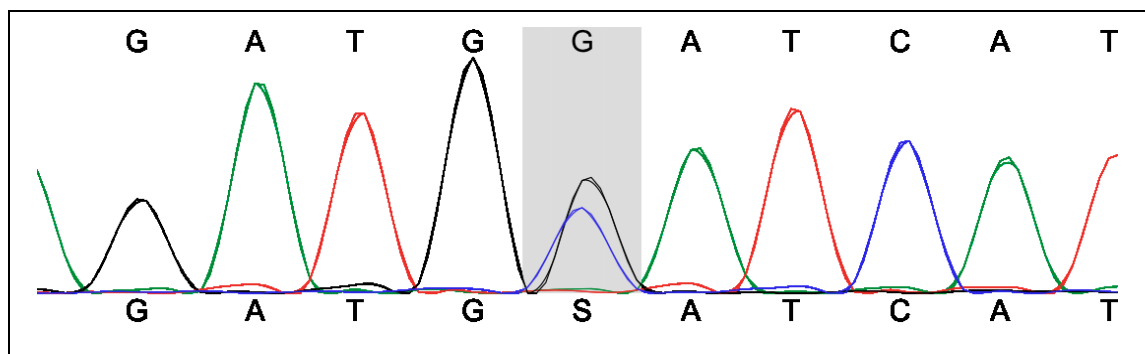


Abbildung 8: Elektropherogramm des Exon 17, BRCA2-Gen

Die Darstellung wurde dem Sequenzierungs-Report entnommen.

BRCA2, Exon 11, c.5645C>A heterozygot

Diese Mutation wurde bei der Patientin mit der DNA-Nummer 1156 identifiziert. Sie erkrankte im Alter von 37 Jahren an Brustkrebs. Ein Zweitumor wurde nicht entdeckt. In der Familienanamnese waren keine weiteren Krebsfälle bekannt. Die Kriterien für den Gentest waren somit nicht erfüllt.

Bei der oben genannten Sequenzvariante handelt es sich um einen Austausch der DNA-Base Cytosin zu Adenin an der Position 5645 der codierenden genomischen DNA in Exon 11 des BRCA2-Gens (siehe Abbildung 9). Diese Veränderung führt dazu, dass die neutrale, polare Aminosäure Serin an Position 1882 von 3418 des Proteins durch ein Stop-Codon ersetzt wird. Es entsteht ein verkürztes Protein mit einem Verlust von BRC-Repeats. In der BIC-Datenbank ist die Veränderung 26 Mal eingetragen und als krankheitsassoziiert eingestuft. In der kConFab-Datenbank ist die Mutation in einer Familie dokumentiert und auch als pathogen erachtet. In der LOVD-Datenbank ist die Veränderung ebenfalls einmal eingetragen, Angaben über die klinische Auswirkung fehlen. Bei einer BRCA2-Untersuchung von 777 deutschen Brust- oder Eierstockkrebspatienten wurde die hiesige Veränderung in zwei Familien gefunden und als eindeutig prädisponierende Mutation eingestuft (Meindl et al., 2002). In einer holländischen Studie über die Überlebensdauer von Patienten mit BRCA2-Veränderung im Vergleich zu sporadisch auftretenden Brustkrebs wurde diese Mutation bei einer Familie gefunden und ebenfalls als brustkrebsassoziiert eingestuft (Verhoog et al., 1999). Die Mutation wird aufgrund der oben genannten Beurteilungen und des Mutationstyps als krankheitsassoziierte Sequenzveränderung bewertet.

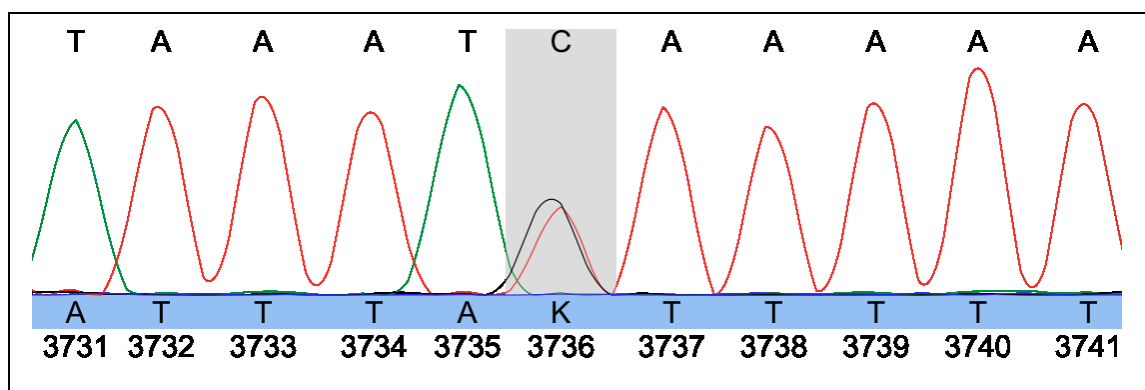


Abbildung 9: Elektropherogramm des Exon 11, BRCA2-Gen

Die Darstellung wurde dem Sequenzierungs-Report entnommen.

BRCA2, Intron5, c.476-1G>A heterozygot

Trägerin dieser Mutation ist die Patientin mit DNA-Nummer 1186. Im Alter von 56 Jahren wurde bei ihr ein Mammakarzinom diagnostiziert. Ein Zweittumor wurde bis dato nicht entdeckt. In der Familie sind ein weiterer Brustkrebs bei der Schwester im Alter von 52 Jahren und ein Ovarialkarzinom bei der Mutter mit 63 Jahren aufgetreten. Die Kriterien für den Gentest waren somit eindeutig erfüllt.

Bei der Sequenzvariante c.476-1G>A handelt es sich um einen Austausch der DNA-Base Guanin zu Adenin an der Position 476-1 der codierenden genomischen DNA in Intron 5 des BRCA2-Gens (siehe Abbildung 10). Diese Veränderung führt nicht direkt zum Austausch einer Aminosäure des Proteins, sondern zur Zerstörung der Akzeptor-Splice-Site vor Exon 6. Dadurch wird höchstwahrscheinlich ein Exon-Skipping – das „Überspringen“ von einem oder mehreren Exons – ausgelöst, welches die Aminosäuresequenz des resultierenden Proteins ab Position 159 verändert. In Folge ist davon auszugehen, dass es zu einer Verschiebung des Leserasters und dadurch bedingt zum vorzeitigen Kettenabbruch kommt. Dem Protein fehlen alle funktionellen Bereiche außer der Transaktivierungsdomäne. Die Veränderung war bis dato weder in einer der relevanten Datenbanken dokumentiert noch in der Literatur aufzufinden. Sie wird dennoch aufgrund des Mutationstyps als krankheitsassoziierte Veränderung bewertet.

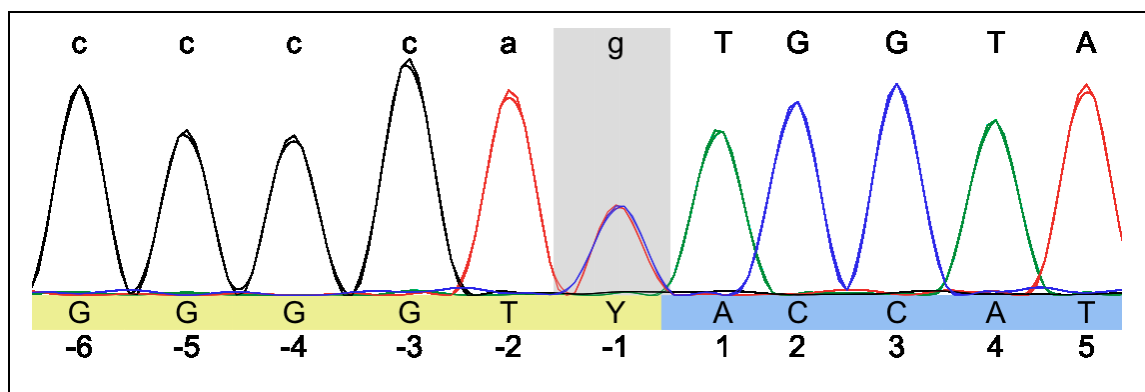


Abbildung 10: Elektropherogramm des Intron 5-Exon 6-Übergangs, BRCA2-Gen

Die Darstellung wurde dem Sequenzierungs-Report entnommen.

BRCA2, Exon 11, c.6444dupT heterozygot

Die Sequenzvariante c.6444dupT wurde bei der Patientin mit der DNA-Nummer 1245 ermittelt. Sie erkrankte erstmals im Alter von 38 Jahren an einem Brustkrebs. Mit 43 Jahren entdeckte man einen weiteren Tumor in der Brust. In der Familie ist ein

Ovarialkarzinom bei der Mutter im Alter von 60 Jahren bekannt. Die deutschen Kriterien für eine genetische Testung waren somit erfüllt.

Bei dieser Mutation handelt es sich um eine Insertion der DNA-Base Thymin nach Position 6444 der codierenden genomischen DNA in Exon 11 des BRCA2-Gens (siehe Abbildung 11). Diese Veränderung führt zum Austausch der unpolaren und neutralen Aminosäure Isoleucin zu der polaren und neutralen Aminosäure Tyrosin an Position 2149 von 3418 des Proteins. Es kommt zu einer Verschiebung des Leserasters und in der Folge zum vorzeitigen Abbruch der Proteinbiosynthese. Hierdurch fehlt die komplette Bildung der C-terminalen Domäne des BRCA2-Gens. In der BIC-Datenbank ist diese Veränderung einmal als krankheitsassoziiert eingetragen. Sowohl in der kConFab- als auch in der LOVD-Datenbank ist die Veränderung nicht dokumentiert. Auch im Rahmen einer ausführlichen Literaturrecherche ist sie zum damaligen Zeitpunkt in keiner Veröffentlichung erwähnt. Aufgrund des Mutationstyps wird die Variante dennoch als krankheitsassoziierte Sequenzveränderung bewertet.

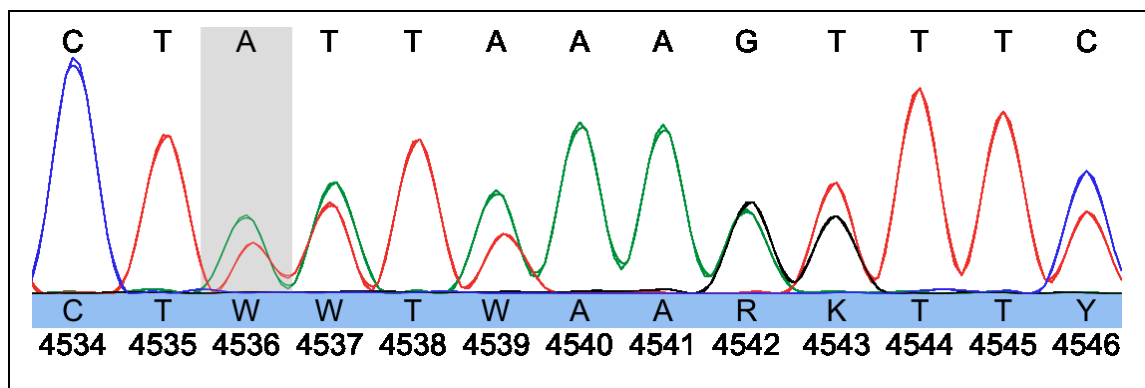


Abbildung 11: Elektropherogramm des Exon 11, BRCA2-Gen

Die Darstellung wurde dem Sequenzierungs-Report entnommen.

4.3 Nicht krankheitsassoziierte BRCA-Mutationen

Neben den krankheitsassoziierten Mutationen wurden ebenfalls sowohl im BRCA1- als auch im BRCA2-Gen nicht krankheitsassoziierte Mutationen entdeckt. Sie werden im folgenden Kapitel dargestellt (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Charakteristika der BRCA1/2-negativen Gruppe

DNA	BRCA1-Mutation	BRCA2-Mutation	Alter (ED)	Zweitumor (Alter)	Familienanamnese (Alter bei ED)	Gentest-kriterien	Risiko-allele
1102	–	LCS c.8851G>A	38	–	–	nein	6
1106	–	RP (TNBK) c.5744C>T	48	BK (56)	Mutter BK (45)	ja	3
1108	–	–	71	–	–	nein	0
1109	–	–	63	Haut	Schwester BK(58)	nein	0
1111	–	–	64	–	Tante ms BK (68), Tante ms BK (50)	ja	0
1115	LCS c.4956G>A	–	59	–	–	nein	3
1117	–	–	57	Basaliom (56)	–	nein	5
1118	–	–	51	Uterus (20)	Schwester BK (50)	ja	3
1130	–	–	70	–	Mutter BK (41)	ja	0
1132	–	–	43	–	Tante vs BK (42; 50)	ja	3
1135	–	–	48	–	–	nein	1
1139	LCS c.4956G>A	–	43	BK (57) Basaliom (58)	–	ja	5
1141	–	–	74	–	–	nein	2
1145	–	US c.68-7T>A	57	–	–	nein	3
1178	–	RP (TNBK) c.5744C>T	70	–	Tante ms OvK	ja	2
1180	–	US c.4570T>G	49	–	–	nein	1
1182	–	–	63	–	3 x BK ms, 2x LK ms	ja	1
1201	–	RP (TNBK) c.5744C>T	63	–	Schwester der Großmutter ms BK	nein	1
1217	–	–	50	–	–	nein	4
1219	–	–	70	–	Cousine ms BK (40)	ja	1
1232	LCS c.4956G>A	–	63	–	Nichte bilateral BK (32), Tante ms BK (42)	ja	3
1244	–	–	66	–	Tante vs BK	nein	1
1252	LCS c.4956G>A	–	68	–	Schwester BK (66), Großmutter vs BK (50)	ja	3
1259	–	–	56	–	–	nein	2
		Median	61				2
		Mittelwert	59			11/24 (46%)	

Abkürzungen: ED: Erstdiagnose; BK: Brustkrebs; LK: Lungenkrebs; OvK: Ovarialkarzinom; ms: mütterlicherseits; vs: väterlicherseits; LCS (Low Clinical Significance): geringe klinische Relevanz; RP (Risk Conferring Polymorphism): Risiko tragender Polymorphismus; US (Unknown Significance): Sequenzveränderung mit unbekannter Auswirkung

Eigene Darstellung

4.3.1 BRCA1-Mutationen

BRCA1, Exon 11, c.1487G>A heterozygot

Bei dieser Sequenzvariante handelt es sich um einen Austausch der DNA-Base Guanin zu Adenin an der Position 1487 der codierenden genomischen DNA in Exon 11 des BRCA1-Gens. Diese Veränderung führt zum Austausch der polaren und stark basischen Aminosäure Arginin zur polaren, aber schwach basischen Aminosäure Histidin an Position 496 von 1863 des Proteins. Der Austausch liegt im Bereich der DNA-Bindungsdomäne. In der BIC-Datenbank ist diese Veränderung 85 Mal mit unbekannter Auswirkung eingetragen. In der kConFab-Datenbank ist die Veränderung nicht dokumentiert. In der LOVD-Datenbank ist die Veränderung neunmal eingetragen und davon bei sechs Einträgen mit "predicted neutral" bewertet, bei den Restlichen mit unbekannter Auswirkung. 95 Frauen und 25 Männer aus Deutschland wurden auf das Vorhandensein von 19 nicht klassifizierten Veränderungen im BRCA1-Gen getestet. Alle Personen waren zum Zeitpunkt der Untersuchung älter als 60 Jahre (im Durchschnitt 73 Jahre), gesund und wiesen keine familiäre Häufung von Brust- und/oder Eierstockkrebs auf. Vier der 19 Veränderungen konnten in der Kontrollgruppe nachgewiesen werden, darunter die hier identifizierte. Die Autoren Arnold et al. (2002) gehen daher davon aus, dass diese Veränderung nicht krankheitsassoziiert ist. In einer Untersuchung von 40.000 Sequenzierungen der BRCA1- und BRCA2-Gene durch die Myriad Genetic Laboratories stufen die Autoren die hiesige Mutation auch als neutral bzw. mit geringer klinischer Auswirkung (LCS) ein (Tavtigian et al., 2006). Die Veränderung wird von uns deshalb als Sequenzveränderung mit allenfalls geringer klinischer Relevanz (LCS) bewertet.

BRCA1, Exon 16, c.4956G>A heterozygot

In vier Fällen entdeckten wir die Mutation c.4956G>A im BRCA1-Gen (13,3%). Hierbei handelt es sich um einen Austausch der DNA-Base Guanin zu Adenin an der Position 4956 der genomischen DNA in Exon 16. Diese Veränderung führt zum Austausch der polaren und neutralen Aminosäure Methionin zur unpolaren und neutralen Aminosäure Isoleucin an Position 1652 von 1863 Aminosäuren des BRCA1-Proteins. Die Veränderung liegt in der BRCT-Domäne des Proteins und kann somit die Interaktionen mit verschiedenen Proteinen beeinflussen. In der BIC-Datenbank ist diese

Veränderung 38 Mal mit unbekannter Auswirkung eingetragen. In der kConFab-Datenbank ist die Veränderung in 21 Familien dokumentiert und als klinisch wenig relevant (LCS) eingestuft. Bei einer Untersuchung von 589 Brust- oder Eierstockkrebs-Patienten tschechischer Herkunft (580 Frauen; 9 Männer) wurde die hier beschriebene Veränderung auch gefunden und als nicht krankheitsassoziiert eingestuft. Die Veränderung wird bei insgesamt 22 Patienten gefunden, aber auch mit einer Frequenz von 6,3% in einer Kontrollgruppe aus über 60-jährigen, gesunden Frauen ohne familiäre Brustkrebsbelastung (Foretova et al., 2005). In einer Analyse zur Vorhersage der Pathogenität von SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) des BRCA1-Gens wurde für die hiesige Veränderung kein Hinweis auf mögliche pathologische Auswirkungen entdeckt (Rajasekaran et al., 2007), so dass wir diese Mutation als Sequenzvariante mit geringer klinischer Auswirkung (LCS) klassifizieren.

4.3.2 BRCA2-Mutationen

BRCA2, Exon 11, c.5744C>T heterozygot

Die Mutation c.5744C>T wurde insgesamt bei vier Fällen (13,3%) nachgewiesen. Hierbei handelt es sich um einen Austausch der DNA-Base Cytosin zu Thymin an der Position 5744 der codierenden genomischen DNA in Exon 11 des BRCA2-Gens. Diese Veränderung führt zum Austausch der Aminosäure Threonin zu Methionin an Position 1915, die innerhalb der BRC-Repeat-Region des Proteins gelegen ist. In der BIC-Datenbank ist diese Veränderung siebenmal mit unbekannter Auswirkung eingetragen und in der kConFab-Datenbank ist die Veränderung in 29 Familien als Polymorphismus dokumentiert. In der LOVD-Datenbank ist die Veränderung viermal eingetragen, einmal davon als "predicted neutral", da die Veränderung in der gesunden Kontrollgruppe gefunden wurde. Bei den übrigen drei Einträgen wird keine Tendenz zum Krankheitsbezug angegeben. In einer Untersuchung zum Zusammenhang zwischen Polymorphismen des BRCA2-Gens und den klinischen Parametern einer Krebserkrankung war die hiesige Mutation weniger häufig (OR 0,39, 95% KI 0,19 bis 0,82, $p = 0,013$) in Östrogenrezeptor-positiven Patienten zu finden (Krupa et al., 2009). Die Veränderung kann aufgrund dieser Daten als alleinige Ursache eines erblichen Mammakarzinoms ausgeschlossen werden, allerdings könnte sie an der Entstehung des Hormonrezeptor-negativen Mammakarzinoms beteiligt sein.

BRCA2, Exon 22, c.8851G>A heterozygot

Bei dieser Sequenzvariante handelt es sich um einen Austausch der DNA-Base Guanin zu Adenin an der Position 8851 der codierenden genomischen DNA in Exon 22 des BRCA2-Gens. Diese Veränderung führt zum Austausch der unpolaren und neutralen Aminosäure Alanin zur polaren und neutralen Aminosäure Threonin an Position 2951 von 3418 des Proteins. Die Position befindet sich in den OB-Faltblättern der C-terminalen Domäne. In der BIC-Datenbank ist diese Veränderung 40 Mal als nicht krankheitsassoziiert eingetragen. In der kConFab-Datenbank ist die Veränderung in elf Familien dokumentiert und als Variante mit geringer klinischer Relevanz eingestuft. In der LOVD-Datenbank ist die Veränderung neunmal eingetragen. Bei fünf Einträgen wird sie als neutral angegeben, da sie entweder in der gesunden Kontrollgruppe oder zusammen mit einer sicher krankheitsassoziierten Veränderung gefunden wurde. In einer Studie mit 705 Frauen unterschiedlicher Herkunft mit beidseitigem Brustkrebs und 1398 Frauen mit einseitigem Brustkrebs wurden die Gene BRCA1 und BRCA2 mittels DHPLC und Sequenzierung auf Veränderungen hin untersucht. Die hiesige Veränderung wird insgesamt 22 Mal gefunden, zehnmal in der Gruppe der Patientinnen mit beidseitigem Brustkrebs (1,4%) und zwölfmal in der Gruppe der Patientinnen mit einseitigem Brustkrebs (0,9%). Die Bewertung der Konservierung der betroffenen Position ergab eine Tendenz zu einem Krankheitsbezug (Borg et al., 2010). Die Mutation wird aufgrund der veröffentlichten Daten von uns als Sequenzveränderung mit allenfalls geringem Krankheitsbezug (LCS) bewertet.

BRCA2, Intron 2, c.68-7T>A heterozygot

Bei dieser Sequenzvariante handelt es sich um einen Austausch der DNA-Base Thymin zu Adenin an der Position 68-7 in Intron 2 des BRCA2-Gens. Diese Veränderung führt nicht zu einem Aminosäureaustausch, sondern zu einem Exon-Skipping, was den kompletten Verlust von Exon 3 zur Folge hat. In der BIC-Datenbank ist diese Veränderung zweimal mit unbekannter klinischer Relevanz eingetragen. In der kConFab-Datenbank ist sie in sechs Familien dokumentiert und als "Unclassified Variant" eingestuft. In der Datenbank LOVD ist die Veränderung einmal mit ebenfalls unbekannter klinischer Auswirkung eingetragen. In der oben bereits erwähnten Studie von Borg et al. (2010) wurde die hiesige Veränderung einmal in der Gruppe der

Patientinnen mit beidseitigem Brustkrebs und neunmal in der Gruppe der Patientinnen mit unilateralem Brustkrebs gefunden. Es wurde keine Bewertung der Konservierung der betroffenen Position vorgenommen. In einer Veröffentlichung von Diez et al. (2007) wird über eine weitere Mutation (c.156-157insAlu) berichtet, die ebenfalls durch ein Exon-Skipping zum Verlust von Exon 3 führt. Die Autoren gehen davon aus, dass die intronische Mutationsvariante vor Exon 3 nicht Ursache des aberranten Spleißens ist, sondern auf nicht krankheitsassoziierte Polymorphismen zurückgeht. Aufgrund dieser Daten ist eine eindeutige Interpretation nicht möglich und die Genvariante wird von uns als Sequenzveränderung mit unbekannter Auswirkung (US) bewertet.

BRCA2, Exon 11, c.4570T>G heterozygot

Bei dieser Sequenzvariante handelt es sich um einen Austausch der DNA-Base Thymin zu Guanin an der Position 4570 der codierenden genomischen DNA in Exon 11 des BRCA2-Gens. Diese Veränderung führt zum Austausch der unpolaren und neutralen Aminosäure Phenylalanin zur unpolaren und neutralen Aminosäure Valin an Position 1524 von 3418 des Proteins im Bereich der BRC-Repeats. In der BIC-Datenbank ist diese Veränderung zehnmal eingetragen und mit unbekannter klinischer Relevanz eingestuft. In der kConFab-Datenbank ist die Veränderung nicht dokumentiert. In der LOVD-Datenbank ist die Veränderung einmal als wahrscheinlich neutral eingetragen. Bei einer genetischen Untersuchung von 188 süddeutschen Familien mit familiärer Häufung von Brust- und/oder Eierstockkrebs wurde die hiesige Veränderung bei einem Patienten gefunden. In der Familie wurden zwei oder mehr Fälle von Brustkrebs (1x Diagnosealter < 50 Jahren) diagnostiziert. Die hiesige Veränderung gehört dabei zu den 23 neu gefundenen Veränderungen und wird als „Unknown Variant“ (UV) eingestuft (Meyer et al., 2003). Bei der Bewertung von 1433 Veränderungen in den Genen BRCA1 und BRCA2 mit bislang unbekannter Auswirkung wurde jede Veränderung mit einer Wahrscheinlichkeit für einen ursächlichen Krankheitszusammenhang versehen. Die im vorliegenden Fall gefundene Mutation wird den wahrscheinlich nicht krankheitsassoziierten Veränderungen zugeordnet (Easton et al., 2007). Die Veränderung kann aufgrund der veröffentlichten Daten nicht eindeutig interpretiert werden und wird deshalb als abklärungsbedürftige, nicht-klassifizierbare Sequenzveränderung (US) bewertet.

4.4 Vergleich der Tumorpathologie

Die folgende Tabelle zeigt die pathologischen Eigenschaften der triple-negativen Mammakarzinome sowohl von BRCA1/2-positiven als auch von BRCA1/2-negativen Patientinnen.

Tabelle 8: Vergleich der Tumorpathologie

Histologie (n = 30)	TNBK^a (gesamt)	BRCA1/2-positiv	BRCA1/2-negativ
invasiv-duktales Karzinom	22/30 (73,3%)	4/6 (66,7%)	18/24 (75,0%)
invasiv-lobulär Karzinom	1/30 (3,3%)	–	1/24 (4,2%)
invasiv-medullär Karzinom	2/30 (6,7%)	1/6 (16,7%)	1/24 (4,2%)
invasiv-adenoid-zystisches Karzinom	1/30 (3,3%)	–	1/24 (4,2%)
DCIS	4/30 (13,3%)	1/6 (16,7%)	3/24 (12,5%)
Grading (n = 24)			
G1	5/24 (20,8%)	1/5 (20,0%)	4/19 (21,1%)
G2	9/24 (37,5%)	1/5 (20,0%)	8/19 (42,1%)
G3	10/24 (41,7%)	3/5 (60,0%)	7/19 (36,8%)

^a TNBK steht für triple-negativer Brustkrebs.

Eigene Darstellung

Die Angaben zu den einzelnen Kriterien beziehen sich auf unterschiedliche Fallzahlen – 30 für die Histologie und 24 für das Grading. In Abschnitt 2.3.1 und 2.3.2 wird das typische Tumorprofil eines BRCA1/2-positiven Mammakarzinoms näher beschrieben – wie zu erwarten gehört der Großteil (4/6; 66,7%) der Karzinome dem invasiv-duktalem Subtyp an. 16,7% (1/6) gehören in die invasiv-medulläre Gruppe, was für ein BRCA1/2-positives Mammakarzinom nicht ungewöhnlich ist. In der BRCA1/2-negativen Gruppe sind es im Vergleich nur 4,2% (1/24). Typisch ist auch ein hoher Anteil (3/5; 60%) an G3-Tumoren unter den Mutationsträgerinnen.

4.5 Erfassung der Anzahl von Risikoallelen

In Anlehnung an eine Studie von Johnson et al. (2007) wurde bei den 30 Studienteilnehmerinnen eine Bestimmung der Risikoallele (siehe Tabelle 6) durchgeführt. Laut der Studie ließen sich insgesamt 25 Varianten in den Genen BRCA1, BRCA2, ATM, CHEK2 und TP53 identifiziert, für die sich vor allem in Kombination zueinander eine erhöhte Brustkrebswahrscheinlichkeit ergibt (p (trend) = 0,005). Fünf dieser Varianten befinden sich in BRCA1 und neun in BRCA2. Wir verglichen unsere Sequenzierungsergebnisse mit denen der Studie und berechneten aus der jeweiligen Anzahl von Risikoallelen approximativ die Wahrscheinlichkeit für eine Brustkrebs-erkrankung. Elf Varianten in den nicht untersuchten Genen ATM, CHEK2, TP53 konnten in die Berechnung nicht miteinbezogen werden. Die Risikoeinschätzung könnte daher etwas ungenau sein. Für die Gruppe der Mutationsträgerinnen ($n = 6$) ergibt sich ein Median von drei Risikoallelen pro Person, die daraus resultierende Odds Ratio beträgt 1,75. Für die verbleibenden triple-negativen Patientinnen ($n = 24$) ohne nachgewiesene Mutation liegt der Median bei 2 Risikoallelen und die Odds Ratio bei 1,39. Das heißt, die „Odds“ (bzw. die „Chance“), an Brustkrebs zu erkranken, ist in der Gruppe der BRCA1/2-positiven Personen aufgrund der Risikoallele zusätzlich höher als in der Gruppe der BRCA1/2-negativen Personen.

5 Diskussion

In diesem Kapitel erfolgt nun die Diskussion der im vorherigen Abschnitt dargestellten Ergebnisse. Zu Beginn wird die zugrunde liegende Methodik mit ihren Vor- und Nachteilen diskutiert, im Anschluss folgt die Darstellung unserer Erkenntnisse im Kontext der aktuellen Literatur. Abschließend wird die Bedeutung der Arbeit diskutiert und ein Ausblick gegeben.

5.1 Diskussion der Methodik

Studiendesign

Die vorliegende Fragestellung wurde mit Hilfe einer retrospektiven klinischen Studie im Querschnittsdesign untersucht. Bei diesem Studientyp handelt es sich um eine rückblickende Untersuchung, d.h. es wird von der Gegenwart aus die Vorgeschichte analysiert. Entscheidende Vorteile eines solchen Studiendesigns sind im Vergleich zu beispielsweise experimentellen Studien ein geringer Kostenaufwand und eine schnelle Durchführbarkeit. Zudem ist dieser Studientyp in der Regel ethisch relativ unbedenklich. Die Nachteile retrospektiver Studien zeichnen sich vor allem im Bereich der Erkenntnistheorie ab. So können retrospektive Studien zwar zur Hypothesenerstellung und -stärkung dienen, aber keine Kausalzusammenhänge aufdecken. Ein dem Anschein nach vorhandener Zusammenhang kann möglicherweise auf dem Einfluss anderer Faktoren (Confounder) wie zum Beispiel der Umwelt beruhen, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass eine Assoziation rein zufälliger Natur ist.

Zudem sind solche Studien anfällig für sogenannte „Recall Biases“. Hierbei handelt es sich um kognitive Verzerrungen, die dadurch entstehen, dass sich Patienten nicht mehr korrekt an Ereignisse und/oder deren Reihenfolge erinnern oder Gegebenheiten eine andere Bedeutung als die ursprüngliche beimessen. In unserer Untersuchung kann dies vor allem die Erhebung der Familienanamnese betreffen. Die Durchführung der Studie im Querschnittsdesign birgt einen weiteren Nachteil. Durch die einmalige Befragung konnte die Anamnese der Patientinnen als auch ihrer Familien nur bis zum Zeitpunkt

der Untersuchung beurteilt werden. Später auftretende Krebserkrankungen bleiben außer Acht.

Eine weitere wichtige Frage ist die nach dem Einfluss des Auswahlverfahrens der Teilnehmerinnen. Insgesamt wurden 126 Frauen angeschrieben, 30 davon waren bereit, an dieser Untersuchung mitzuwirken. Grundsätzlich ist davon auszugehen, dass die Familienanamnese die Motivation, an der Studie teilzunehmen, beeinflussen kann. Die Motivation, sich einer genetischen Untersuchung zu unterziehen, kann bei einer an Brustkrebs erkrankten Frau, die eine positive Familienanamnese aufweist, somit höher sein als bei anderen. Dies kann negative Auswirkungen auf die Repräsentativität des untersuchten triple-negativen Kollektivs und somit auf die Validität der Ergebnisse haben. Die relativ hohe Mutationsrate im Vergleich zu anderen Studien kann ein Indiz für eine mögliche Verzerrung sein.

Fragebogen

Die Patientendaten wurden mit Hilfe eines teilstandardisierten Fragebogens in einem persönlichen Interview, welches von Herrn Prof. Dr. med. Meyer oder von der Autorin selbst durchgeführt wurde, erhoben. Ein teilstandardisierter Fragebogen gibt lediglich die Fragen sowie deren Anordnung, nicht aber die Antwortmöglichkeiten vor, so dass die Befragten frei antworten können. Durch die Erhebung im persönlichen Gespräch wurde zudem gewährleistet, dass der Fragebogen immer auf die gleiche Weise ausgefüllt wurde und die Patientinnen die Fragen auch korrekt verstanden haben. Allerdings lässt dieser Befragungsmodus keinen Freiraum für weiterführende bzw. zusätzliche Fragen.

Mutationsanalyse

Grundsätzlich ist nach dem Auffinden einer Mutation im Weiteren zu untersuchen, ob die entsprechende Sequenzvariante überhaupt ursächlich an der Brustkrebsentstehung beteiligt, d.h. krankheitsassoziiert ist. Bei insgesamt fünf Mutationen konnten wir entweder mithilfe relevanter Datenbanken oder einer ausführlichen Literaturrecherche eine Krankheitsassoziation annehmen. In Bezug auf die BRCA2 Mutation c.476-1G>A fanden wir allerdings keine komplettierenden Daten und stuften die Veränderung lediglich aufgrund des Mutationstyps als krankheitsassoziiierend ein. Des Weiteren

fanden wir zwei Sequenzveränderungen (BRCA2: c.68-7T>A; c.4570T>G), die aufgrund der aktuellen Datenlage nicht abschließend einzuordnen waren und als Mutation mit unklarer Auswirkung (US) eingeordnet wurden. Falls sich diese Einstufung aufgrund neuer Forschungsergebnisse verändern sollte, so müssten unsere Ergebnisse neu beurteilt werden.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Einordnung in die aktuelle Literatur

Unter den 30 triple-negativen Patientinnen haben wir insgesamt sechs krankheits-assoziierte BRCA1- und BRCA2-Mutationen identifiziert. Dies entspricht einer Mutationsrate von 20% für beide Gene und ist somit vergleichbar mit den Gesamtmutationsraten anderer Studien (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Zusammenfassung aktueller, vergleichbarer Studien

Studie	Alter bei ED	Weitere Auswahlkriterien	Anzahl der Teilnehmer	BRCA1-Mutationen	BRCA2-Mutationen	Mutationen (gesamt)
Meyer et al. (2012) <i>Deutschland</i> (vorliegende Studie)	unselektiert	–	30	1 (3,3%)	5 (16,7%)	6/30 (20,0%)
Young et al. (2009) <i>Kanada</i>	< 41 Jahre	geringe bis keine familiäre Krebshäufung ^a	54	5 (9,0%)	1 (2,0%)	6/54 (11,0%)
Evans et al. (2011) <i>Großbritannien</i>	< 41 Jahre (1. Gruppe) < 31 Jahre (2. Gruppe)	keine familiäre Krebshäufung	63	8 (12,7%)	–	8/63 (12,7%)
Gonzalez-Angulo et al. (2011) USA	unselektiert	–	77	11 (14,0%)	3 (4,0%)	14/77 (18,0%)
Comen et al. (2011) USA	unselektiert	nur askenasische Juden	64	19 (30,0%)	6 (9,0%)	25/64 (39,0%)

^a Die familiäre Häufung von Brust- oder Eierstockkrebs in der Familie qualifizierte die Patienten nicht für eine genetische Untersuchung.

Vergleicht man jedoch die Mutationsraten von BRCA1 und BRCA2 separat, so ist festzustellen, dass die Mutationsrate von BRCA2-Keimbahnmutationen deutlich von denen vergleichbarer Studien abweicht. Insgesamt identifizierten wir fünf von sechs pathologischen Sequenzveränderungen im BRCA2-Gen (16,7%) und somit deutlich mehr als andere Untersuchungen zuvor. Entsprechend geringer ist die von uns identifizierte BRCA1-Mutationsrate im Vergleich zu diesen Studien. Zu den fünf BRCA2-Mutationen zählen vier bereits bekannte Mutationen (c.1029delA; c.5645C>A; c.6444dupT; c.7878G>C) und eine bisher nicht veröffentlichte Splice-Site-Mutation (c.476-1G>A).

Young et al. (2009) dokumentierten auf Basis eines kanadischen Patientenkollektivs eine BRCA2-Mutationsrate von 2% (1/54). Für diese Studie wurden lediglich triple-negative Brustkrebsfälle mit einem Alter bei Erstdiagnose von unter 41 Jahren ausgewählt. Krebserkrankungen in der Familie waren kein grundsätzliches Ausschlusskriterium, allerdings sollten sie die Patientinnen nicht durch deren Art, Häufigkeit oder Alter bei Erkrankung für eine genetische Testung qualifizieren. Es erfolgte eine komplette Analyse des BRCA1-Gens, jedoch nur eine limitierte Analyse der großen Exons 10 und 11 des BRCA2-Gens.

Evans et al. (2011) untersuchten ein Patientenkollektiv aus Großbritannien und identifizieren unter 63 triple-negativen Fällen keine einzige BRCA2-Mutation, obwohl die BRCA1- und BRCA2-Gene vollständig analysiert wurden. Jedoch wurde auch dieses Studienkollektiv anhand des Erkrankungsalters vorselektiert – die erste Gruppe erkrankte im Alter von 30–40 Jahren an einem Mammakarzinom, die zweite Gruppe bereits im Alter von unter 30 Jahren. Ein weiteres Selektionskriterium in dieser Studie war der Nachweis einer negativen Familienanamnese bezüglich Krebserkrankungen, die im Zusammenhang mit BRCA1- und BRCA2-Mutationen stehen könnten.

Im Gegensatz zu den beiden vorgenannten Studien ist der Selektionsprozess des Patientenkollektivs einer US-amerikanischen Studie von Gonzalez-Angulo et al. (2011) vergleichbar mit der Selektion der vorliegenden Untersuchung, da weder anhand eines bestimmten Alters bei Erstdiagnose noch anhand der Familienanamnese vorselektiert wurde. Es zeigte sich eine deutlich geringere BRCA2-Mutationsrate von nur 3,9% gegenüber 16,7% in unserer Studie.

Comen et al. (2011) untersuchen eine Kohorte 64 aschkenasischer Juden mit diagnostiziertem triple-negativem Mammakarzinom, welche weder anhand des Erkrankungsalters noch anhand der familiären Häufung von Brustkrebs vorselektiert wurden. In dem untersuchten Kollektiv wurden 19 BRCA1- (29,7%) und sechs BRCA2- (9,4%) Mutationen nachgewiesen.

Die geringe BRCA2-Mutationsrate von nur 2% im Gegensatz zu unserer von 16,7% in der Untersuchung von Young et al. (2009) kann vermutlich auf die limitierte Analyse der großen Exons 10 und 11 des BRCA2-Gens zurückgeführt werden. Unsere Untersuchung umfasste die vollständige Analyse beider Gene. Aus diesem Grund ist uns auch die Identifikation von zwei Mutationen außerhalb der mutationsreichen Region (Exon 10 und 11) gelungen.

Darüber hinaus wurden für die Studie von Young et al. (2009) ebenso wie für die Studie von Evans et al. (2011) lediglich triple-negative Brustkrebsfälle mit einem Alter bei Erstdiagnose von unter 41 Jahren ausgewählt. Gonzalez-Angulo et al. (2011) selektierte seine Kohorte, ebenso wie wir, nicht nach dem Alter, jedoch lag das Durchschnittsalter des amerikanischen Kollektivs sechs Jahre (Durchschnittsalter: 51 Jahre) vor dem unserer Untersuchungsgruppe (Durchschnittsalter: 57 Jahre). Der Altersunterschied zwischen dem Patientenkollektiv dieser drei Studien und unserem Patientenkollektiv kann die Abweichungen der Mutationshäufigkeiten im BRCA2-Gen zumindest teilweise erklären. Die Daten eines internationalen Vergleichs mit etwa 7.000 BRCA1- und BRCA2-Mutationsträgern (BRCA1: n = 4.325; BRCA2: n = 2.568) zeigten, dass das Alter bei Diagnosestellung eines triple-negativen Mammakarzinoms höher ist bei BRCA2- als bei BRCA1-Mutationsträgern (Mavaddat et al., 2012). Diese Erkenntnisse stehen im Einklang mit unseren Ergebnissen, da unser Patientenkollektiv tendenziell älter ist als jenes Kollektiv, bei dem niedrige BRCA2- und hohe BRCA1-Mutationsraten in triple-negativen Kohorten zu verzeichnen waren.

Während unser triple-negatives Kollektiv, wie bereits erwähnt, weder anhand des Erkrankungsalters noch anhand der Familienanamnese vorselektiert wurde, wählten Young et al. (2009) und Evans et al. (2011) ihre Teilnehmer nur aufgrund einer geringen oder negativen Familienanamnese bezüglich Krebshäufungen aus. Dieser Unterschied in Bezug auf die Einschlusskriterien könnte auch einen potentiellen Einfluss auf die verschiedenen BRCA2-Mutationshäufigkeiten haben.

Die Höhe der Mutationsrate im BRCA2-Gen von Comen et al. (2011) lässt sich mit unserer Ergebnisse vergleichen, allerdings ist darauf hinzuweisen, dass es sich hierbei um die Untersuchung einer Inzuchtpopulation handelt. Durch die Kreuzung einer Gruppe von Menschen über Generationen hinweg, kehren bestimmte Mutationen immer wieder und häufen sich in dieser Bevölkerung an. Demzufolge ist hier mit einer höheren Mutationsfrequenz zu rechnen – etwa 10% aller Brustkrebsfälle aschkenasischer Juden weisen eine von drei Gründermutationen in den Genen BRCA1 und BRCA2 auf.

Die Auswirkung von BRCA1: c.4956G>A und BRCA2: c.5744C>T auf die triple-negative Tumorentstehung

Auffällig bei unserer Untersuchung war die Identifikation zweier Mutationen in unserer triple-negativen Brustkrebskohorte, die jeweils bei vier Fällen entdeckt wurden. Bei diesen Veränderungen handelt es sich zunächst um die Mutation c.4956G>A in BRCA1. In einer Analyse zur Vorhersage der Pathogenität von SNPs des BRCA1-Gens wurde für die hiesige Veränderung kein Hinweis auf mögliche pathologische Auswirkungen entdeckt (Rajasekaran et al., 2007). Die Genvariante c.5744C>T wurde ebenfalls in vier Fällen (13,3%) im BRCA2-Gen nachgewiesen. In einer Untersuchung zum Zusammenhang zwischen Polymorphismen des BRCA2-Gens und den klinischen Parametern einer Krebserkrankung war die hiesige Mutation weniger häufig (OR 0,39, 95% KI 0,19 bis 0,82, p = 0,013) in Östrogenrezeptor-positiven Patienten zu finden (Krupa et al., 2009). Um die Auswirkungen der beiden Genvarianten (c.4956G>A in BRCA1 und c.5744C>T in BRCA2) auf die triple-negative Tumorentstehung wirklich bewerten zu können, wäre eine Untersuchung in Studien mit größeren Fallzahlen wünschenswert.

5.3 Bedeutung und Ausblick

Das Mammakarzinom ist weltweit die häufigste Krebserkrankung der Frau und für ungefähr eine halbe Million Todesfälle jährlich verantwortlich (WHO, 2008). Dabei sind in den letzten Jahren, große Fortschritte auf dem Gebiet der Erkennung und Behandlung von Brustkrebs zu verzeichnen gewesen. Das erste Vorgehen bei nicht fortgeschrittenen Karzinomen ist die operative Entfernung mit dem Ziel einer R0-Resektion. Hierfür ist jedoch eine frühe Diagnosestellung von entscheidender

Bedeutung. Die S3-Leitlinie rät in besonderen Fällen mit hohem familiärem Brustkrebsrisiko zu einem sogenannten intensivierten Früherkennungsprogramm. Dieses beinhaltet vor allem erweiterte diagnostische Maßnahmen wie z.B. eine MRT-Untersuchung der Brust. Die Identifikation des triple-negativen Mammakarzinoms als potentiell Risikoprofil für eine genetische Prädisposition könnte dabei ein weiterer Schritt zum effektiven Screening von Risikopatienten sein und so mehr Frauen eine genetische Testung und – je nach Ergebnis – ein risikoadaptiertes, intensiviertes Früherkennungsprogramm ermöglichen.

Jedoch nicht nur die Früherkennung, auch eine gezielte Therapie nimmt Einfluss auf die Prognose des Mammakarzinoms. Für eine gezielte Therapie, die die Prognose deutlich verbessern kann, ist es notwendig, die genauen Mechanismen der Karzinogenese des triple-negativen Mammakarzinoms besser zu erkennen und zu verstehen. Die in unserer Untersuchung beschriebene Erkenntnis, dass triple-negative Mammakarzinome häufiger mit BRCA1/2-Mutationen einhergehen, könnte zu einem besseren Verständnis und damit zur Entwicklung gezielter Therapie für die besagte Untergruppe beitragen. So belegen bereits Studien das bessere Ansprechen von BRCA-assoziierten Tumoren auf Platinderivate und PARP-Inhibitoren (Byrski et al., 2010; Tutt et al., 2010) – ein zukunftsweisender Therapieansatz, der für Frauen mit triple-negativem Mammakarzinom und bestätigter BRCA1/2-Mutation prognostisch sehr bedeutend sein könnte.

Der Prävention von Krebserkrankungen kommt neben der Früherkennung und der Therapie eine entscheidende Bedeutung zu. Als Möglichkeit der primären Prävention wird Frauen mit BRCA1- oder BRCA2-Genmutation eine prophylaktische bilaterale Mastektomie und eine prophylaktische beidseitige Salpingo-Oophorektomie (i.d.R. um das 40. Lebensjahr) empfohlen. Empirische Studien zeigen, dass durch die prophylaktische Mastektomie das Brustkrebsrisiko um über 95% gesenkt wird und in der Folge die brustkrebsspezifische Letalität um 90% abnimmt (Domchek et al., 2010; Lostumbo et al., 2010).

In unserer Kohorte von 30 triple-negativen Patientinnen erfüllten 15 Fälle (50%) die aktuellen Kriterien für ein BRCA1- und BRCA2-Mutationsscreening in Deutschland (siehe 3.2.1) nicht. Wir identifizierten jedoch zwei krankheitsassoziierte BRCA2-Mutationen in der besagten Gruppe (2/15) – die Mutationsrate lag demnach bei 13%. Diesen Frauen würden nach den aktuellen Empfehlungen oben genannte Möglichkeiten

verwehrt bleiben. Sie hätten keinen Anspruch auf eine genetische Testung, ein intensiviertes Früherkennungsprogramm, präventive Maßnahmen oder eine zielgerechtere Therapie. Ihnen würde trotz eines erhöhten Rezidivrisikos nicht das ganze Spektrum an Vor- und Nachsorge sondern nur das Standardprogramm zustehen. Durch die Vorenthaltung einer genetischen Untersuchung ergeben sich jedoch nicht nur Konsequenzen für die bereits erkrankte Person, sondern auch für nicht bzw. noch nicht erkrankte Familienangehörige. Wenn bei einer Indexpatientin eine BRCA1/2-Mutation nicht bekannt ist, weil sie nicht untersucht wurde, können deren Blutsverwandte eine präventive genetische Testung und gegebenenfalls intensivierte Vorsorgeprogramme nicht in Anspruch nehmen, auch wenn sie eine formalgenetische Wahrscheinlichkeit von mehr als 10 % haben, ebenfalls Mutationsträger zu sein und somit ein erhöhtes Krebsrisiko tragen. Die Entscheidung, jene Frauen mit triple-negativem Mammakarzinom nicht auf BRCA1/2-Mutationen zu untersuchen, beeinflusst also nicht nur das Schicksal eines Menschen, sondern vieler.

In Deutschland wird gegenwärtig eine Mutationsanalyse durchgeführt, sobald die empirische Mutationswahrscheinlichkeit, eine BRCA1- oder BRCA2-Mutation zu tragen, über 10% liegt (Bauerfeind, 2011, S. 105; Gadzicki et al., 2011). Wenn nachfolgende Studien mit größeren Fallzahlen das Risiko bezüglich der BRCA1/2-Mutationen für die Entstehung von triple-negativem Brustkrebs bestätigen, könnte triple-negativer Brustkrebs in die deutschen Kriterien für BRCA1- und BRCA2-Mutationsscreenings einfließen. Es würden dann nicht mehr nur die Fälle beurteilt werden, die einen frühen Erkrankungsbeginn oder eine familiäre Häufung von Brust- und/oder Eierstockkrebs aufweisen, sondern auch diejenigen, die an einem triple-negativen Mammakarzinom erkranken. Im Gegensatz zu den deutschen Empfehlungen sind die kürzlich veröffentlichten Richtlinien des National Comprehensive Cancer Network (NCCN) in den USA schon weniger streng. Sie empfehlen bereits eine genetische Testung bei einem triple-negativen Brustkrebs, der vor dem 60. Lebensjahr diagnostiziert wurde oder bei einer Brustkrebserkrankung vor dem 45. Lebensjahr mit negativer Familienanamnese (NCCN, 2011). Im Vergleich empfehlen die deutschen Richtlinien eine Testung in Einzelfällen nur bei einem Alter von unter 35 Jahren bei Erstdiagnose (Gadzicki et al., 2011).

6 Zusammenfassung

Mit ca. 72.000 Neuerkrankungen jedes Jahr allein in Deutschland ist das Mammakarzinom die häufigste Krebserkrankung der Frau. Hierzulande erkrankt jede achte Frau an Brustkrebs (RKI, 2012). Bei Vorliegen eines Gendefekts (BRCA1/2-Mutation) kann dieses Risiko sogar 80–90% betragen (Meindl et al., 2011). 80% aller BRCA1-assoziierten und etwa 12–17% aller Mammakarzinome zeigen in der Immunhistochemie einen triple-negativen Phänotyp – eine Untergruppe, die sich durch fehlende Östrogen- und fehlende Progesteronrezeptoren sowie eine fehlende HER2-Expression auszeichnet (Foulkes et al., 2004; Foulkes et al., 2010).

In der hier vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit erfolgt die Erhebung der BRCA1- und BRCA2-Mutationfrequenz in einer triple-negativen Brustkrebskohorte aus Süddeutschland. Das Patientenkollektiv wurde unbeeinflusst vom Alter bei Erstdiagnose und familiäre Häufung von Krebserkrankungen ausgewählt und unterlag keinen weiteren Selektionskriterien.

In einem einstündigen Gespräch fand mit Hilfe eines teilstandardisierten Fragebogens die Erhebung einer Anamnese und die Skizzierung eines Familienstammbaums statt. Im Rahmen der Beratung wurde den Patientinnen nach umfassender Aufklärung eine Blutprobe entnommen. Die hieraus gewonnene DNA wurde amplifiziert und einzelsträngig sequenziert. Die Analyse ergab insgesamt eine zwanzigprozentige Keimbahnmutationrate (6/30) in den Genen BRCA1 und BRCA2. Im Gegensatz zu vergleichbaren Studien zu diesem Thema fanden wir eine hohe Mutationsfrequenz im BRCA2-Gen (5/30; 16,7%) und nur eine relativ niedrige im BRCA1-Gen (1/30; 3,3%).

Es wurden vier bereits bekannte pathologische Frameshift-Mutation (BRCA1: c.5266dupC; BRCA2: c.1029delA, c.5645C>A, c.6444dupT) und eine unbekannte Splice-Site-Mutation (BRCA2: c.476-1G>A) mit jedoch klarer pathologischer Wirkung identifiziert. Des Weiteren ermittelten wir eine Missense-Mutation in BRCA2 (c.7878G>C), die in früherer Literatur als wahrscheinlich krankheitsassoziierte Mutation klassifiziert wurde. In unserer Kohorte von 30 triple-negativen Patientinnen erfüllten 15 Fälle (50%) nicht die aktuellen klinischen Kriterien für ein BRCA1- und BRCA2-Mutationscreening in Deutschland. Die Mutationsrate in dieser Untergruppe

lag jedoch bei 13% (2/15). Unsere Erkenntnisse sprechen dafür, dass sich Frauen mit triple-negativem Brustkrebs für ein BRCA1- und BRCA2-Mutationsscreening qualifizieren. Wenn Studien mit einem größeren Patientenkollektiv unsere Ergebnisse bestätigen würden, sollten die deutschen Kriterien zur genetischen BRCA1/2-Testung hinterfragt werden und triple-negativer Brustkrebs könnte als Einschlusskriterium zur Diskussion gestellt werden.

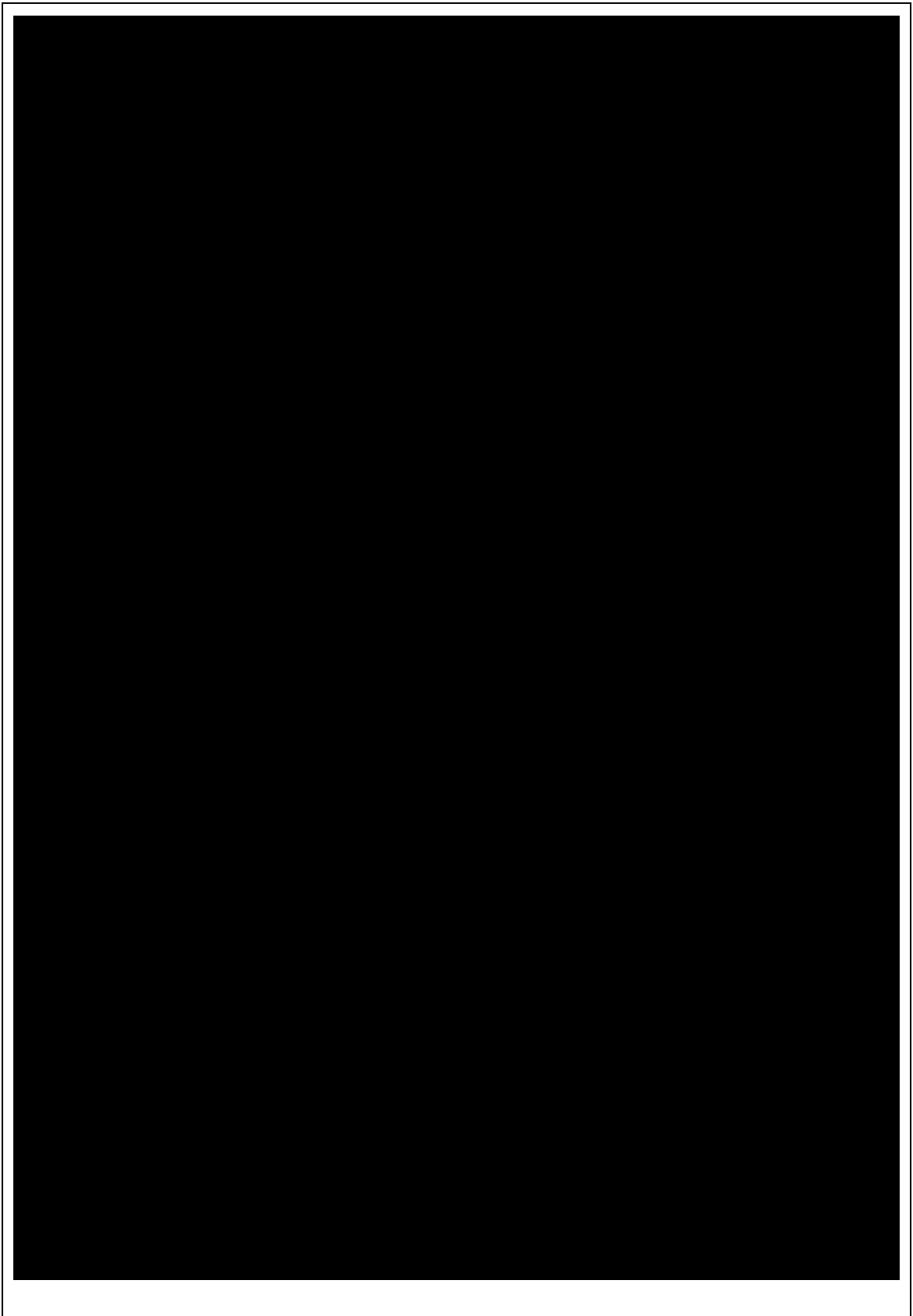
7 Anhang

Anhang 1: pTNM-Klassifikation des Mammakarzinoms

Tumorgröße (T)	
pTx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
pT0	Kein Anhalt für Primärtumor
pTis	Carcinoma in situ
pT1	Tumor max. Durchmesser ≤ 2,0 cm
pT1mic	Mikroinvasion < 0,1 cm
pT1a	Tumor max. Durchmesser > 0,1–0,5 cm
pT1b	Tumor max. Durchmesser > 0,5–1,0 cm
pT1c	Tumor max. Durchmesser > 1,0–2,0 cm
pT2	Tumor max. Durchmesser > 2,0–5,0 cm
pT3	Tumor max. Durchmesser > 5,0 cm
pT4	Tumor jeder Ausdehnung mit Befall von Brustwand/Haut
pT4a	Mit Ausdehnung auf die Brustwand
pT4b	Mit Hautödem/Ulzeration, Satellitenknötchen der Haut
pT4c	Kriterien 4a und 4b gemeinsam
pT4d	Entzündlich (inflammatorisches) Karzinom
Lymphknotenbefall (N)	
pNX	Regionale Lymphknoten können nicht beurteilt werden
pN0	Keine regionale Lymphknotenmetastase
pN1mic	Mikrometastase 0,2–2,0 mm
pN1	Metastase(n) in 1–3 axillären Lymphknoten und/oder in Lymphknoten entlang der A. mammaria interna, klinisch nicht erkennbar
pN1a	Metastase(n) in 1–3 axillären Lymphknoten
pN1b	Metastase(n) in Lymphknoten entlang der A. mammaria interna, klinisch nicht erkennbar
pN1c	pN1a und pN1b
pN2	Metastase(n) in 4–9 axillären Lymphknoten und in klinisch erkennbaren Lymphknoten entlang der A. mammaria interna
pN2a	Metastase(n) in 4–9 in axillären Lymphknoten
pN2b	Metastase(n) in klinisch erkennbaren Lymphknoten entlang der A. mammaria interna
pN3	Metastasen in mindestens 10 axillären Lymphknoten oder in infraklavikulären Lymphknoten; oder Metastasen in axillären Lymphknoten und in klinisch erkennbaren Lymphknoten entlang der A. mammaria interna; oder Metastasen in mehr als 3 axillären Lymphknoten und in klinisch nicht erkennbaren Lymphknoten entlang der A. mammaria interna; oder Metastasen in supraclavikulären Lymphknoten
pN3a	Metastasen in mindestens 10 axillären Lymphknoten oder infraklavikulären Lymphknoten
pN3b	Metastasen in axillären Lymphknoten und in klinisch erkennbaren Lymphknoten entlang der A. mammaria interna; oder Metastasen in mehr als 3 axillären Lymphknoten und in klinisch nicht erkennbaren Lymphknoten entlang der A. mammaria interna
pN3c	Metastasen in supraclavikulären Lymphknoten
(Fern-) Metastasierung (M)	
pMx	Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
pM0	Keine Fernmetastasen
pM1	Fernmetastasen

Eigene Darstellung in Anlehnung an UICC (2009)

Anhang 2: Fragebogen DNA-Untersuchung



Literaturverzeichnis

Albert U.S. und die Mitglieder der Planungskommission und Arbeitsgruppenleiter der Konzentrierten Aktion Brustkrebs-Früherkennung in Deutschland, (2008) *Stufe-3-Leitlinie Brustkrebs-Früherkennung in Deutschland*. Version 3.0, Aktualisierung 2012. München: Zuckschwerdt Verlag.

Altekruse S.F., Kosary C.L., Krapcho M., Neyman N., Aminou R., Waldron W., Ruhl J., Howlader N., Tatalovich Z., Cho H. et al., (2010) *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2007*. National Cancer Institute. Bethesda, MD,.

Antoniou A., Pharoah P. D., Narod S., Risch H. A., Eyfjord J. E., Hopper J. L., Loman N., Olsson H., Johannsson O., Borg A. et al., (2003) *Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies*. Am J Hum Genet 72: S. 1117-1130.

Antoniou A. C., Pharoah P. D., Narod S., Risch H. A., Eyfjord J. E., Hopper J. L., Olsson H., Johannsson O., Borg A., Pasini B. et al., (2005) *Breast and ovarian cancer risks to carriers of the BRCA1 5382insC and 185delAG and BRCA2 6174delT mutations: a combined analysis of 22 population based studies*. J Med Genet 42: S. 602-603.

Arnold N., Peper H., Bandick K., Kreikemeier M., Karow D., Teegen B. und Jonat W., (2002) *Establishing a control population to screen for the occurrence of nineteen unclassified variants in the BRCA1 gene by denaturing high-performance liquid chromatography*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 782: S. 99-104.

Bauerfeind Ingo, (2011) *Mammakarzinome [Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge]*. München [i.e.] Germering [u.a.]: Zuckschwerdt.

Bertucci F., Finetti P., Cervera N., Esterni B., Hermitte F., Viens P. und Birnbaum D., (2008) *How basal are triple-negative breast cancers?* Int J Cancer 123: S. 236-240.

- Borg A., Haile R. W., Malone K. E., Capanu M., Diep A., Tornngren T., Teraoka S., Begg C. B., Thomas D. C., Concannon P. et al., (2010) *Characterization of BRCA1 and BRCA2 deleterious mutations and variants of unknown clinical significance in unilateral and bilateral breast cancer: the WECARE study*. Hum Mutat 31: S. E1200-1240.
- Bosch A., Eroles P., Zaragoza R., Vina J. R. und Lluch A., (2010) *Triple-negative breast cancer: molecular features, pathogenesis, treatment and current lines of research*. Cancer Treat Rev 36: S. 206-215.
- Boulton S. J., (2006) *Cellular functions of the BRCA tumour-suppressor proteins*. Biochem Soc Trans 34: S. 633-645.
- Byrski T., Gronwald J., Huzarski T., Grzybowska E., Budryk M., Stawicka M., Mierzwa T., Szwiec M., Wisniowski R., Siolek M. et al., (2010) *Pathologic complete response rates in young women with BRCA1-positive breast cancers after neoadjuvant chemotherapy*. J Clin Oncol 28: S. 375-379.
- Cantor S. B., Bell D. W., Ganesan S., Kass E. M., Drapkin R., Grossman S., Wahrer D. C., Sgroi D. C., Lane W. S., Haber D. A. et al., (2001) *BACH1, a novel helicase-like protein, interacts directly with BRCA1 and contributes to its DNA repair function*. Cell 105: S. 149-160.
- Carey L. A., Perou C. M., Livasy C. A., Dressler L. G., Cowan D., Conway K., Karaca G., Troester M. A., Tse C. K., Edmiston S. et al., (2006) *Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study*. JAMA 295: S. 2492-2502.
- Chai Y. L., Cui J., Shao N., Shyam E., Reddy P. und Rao V. N., (1999) *The second BRCT domain of BRCA1 proteins interacts with p53 and stimulates transcription from the p21WAF1/CIP1 promoter*. Oncogene 18: S. 263-268.
- Chen J., Silver D. P., Walpita D., Cantor S. B., Gazdar A. F., Tomlinson G., Couch F. J., Weber B. L., Ashley T., Livingston D. M. et al., (1998) *Stable interaction between the products of the BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor genes in mitotic and meiotic cells*. Mol Cell 2: S. 317-328.

- Clarke M., Collins R., Darby S., Davies C., Elphinstone P., Evans E., Godwin J., Gray R., Hicks C., James S. et al., (2005) *Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials*. Lancet 366: S. 2087-2106.
- Comen E., Davids M., Kirchoff T., Hudis C., Offit K. und Robson M., (2011) *Relative contributions of BRCA1 and BRCA2 mutations to "triple-negative" breast cancer in Ashkenazi Women*. Breast Cancer Res Treat 129: S. 185-190.
- Corkery B., Crown J., Clynes M. und O'Donovan N., (2009) *Epidermal growth factor receptor as a potential therapeutic target in triple-negative breast cancer*. Ann Oncol 20: S. 862-867.
- Dent R., Trudeau M., Pritchard K. I., Hanna W. M., Kahn H. K., Sawka C. A., Lickley L. A., Rawlinson E., Sun P. und Narod S. A., (2007) *Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence*. Clin Cancer Res 13: S. 4429-4434.
- Deutsche Krebshilfe e.V., (2013) *Familiärer Krebs*. <http://www.krebshilfe.de/deutsche-krebshilfe.html>. (12.01.13).
- Deutsches Konsortium für familiären Brust und Eierstockkrebs, (2011) *Altersbezogene Erkrankungswahrscheinlichkeit für BRCA1/2-Mutationsträgerinnen*.
- Diez O., Gutierrez-Enriquez S., Ramon y Cajal T., Alonso C., Balmana J. und Llort G., (2007) *Caution should be used when interpreting alterations affecting the exon 3 of the BRCA2 gene in breast/ovarian cancer families*. J Clin Oncol 25: S. 5035-5036; author reply 5036-5038.
- Domchek S. M., Friebel T. M., Singer C. F., Evans D. G., Lynch H. T., Isaacs C., Garber J. E., Neuhausen S. L., Matloff E., Eeles R. et al., (2010) *Association of risk-reducing surgery in BRCA1 or BRCA2 mutation carriers with cancer risk and mortality*. JAMA 304: S. 967-975.
- Easton D. F., Deffenbaugh A. M., Pruss D., Frye C., Wenstrup R. J., Allen-Brady K., Tavtigian S. V., Monteiro A. N., Iversen E. S., Couch F. J. et al., (2007) *A systematic*

genetic assessment of 1,433 sequence variants of unknown clinical significance in the BRCA1 and BRCA2 breast cancer-predisposition genes. Am J Hum Genet 81: S. 873-883.

EBCTCG, Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group:, Darby S., McGale P., Correa C., Taylor C., Arriagada R., Clarke M., Cutter D., Davies C., Ewertz M. et al., (2011) *Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials.* Lancet 378: S. 1707-1716.

EBCTCG, Early Breast Cancer Trialists' Collaborative, Group, (2005) *Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials.* Lancet 365: S. 1687-1717.

Ellis M. J., Tao Y., Luo J., A'Hern R., Evans D. B., Bhatnagar A. S., Chaudri Ross H. A., von Kameke A., Miller W. R., Smith I. et al., (2008) *Outcome prediction for estrogen receptor-positive breast cancer based on postneoadjuvant endocrine therapy tumor characteristics.* J Natl Cancer Inst 100: S. 1380-1388.

Elston C. W. und Ellis I. O., (1991) *Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up.* Histopathology 19: S. 403-410.

Evans D. G., Howell A., Ward D., Lalloo F., Jones J. L. und Eccles D. M., (2011) *Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in triple negative breast cancer.* J Med Genet 48: S. 520-522.

Foretova L., Lukesova M., Vasickova P., Navratilova M., Pavlu H., Kuklova J., Urbankova V., Hanouskova D., Dvorackova B. und Machackova E., (2005) *Hereditary breast cancer – a spectrum of pathogenic mutations and unknown variants of BRCA1 and BRCA2 genes in the Czech Republic: efficiency of testing and clinical follow-up.* Breast Cancer Research 7: S. 1-2.

Foulkes W. D., Smith I. E. und Reis-Filho J. S., (2010) *Triple-negative breast cancer.* N Engl J Med 363: S. 1938-1948.

Foulkes W. D., Hamel N., Oros K. K. und Tonin P. N., (2005) *BRCA mutations and ductal carcinoma in situ*. JAMA 294: S. 553-554.

Foulkes W. D., Brunet J. S., Stefansson I. M., Straume O., Chappuis P. O., Begin L. R., Hamel N., Goffin J. R., Wong N., Trudel M. et al., (2004) *The prognostic implication of the basal-like (cyclin E high/p27 low/p53+/glomeruloid-microvascular-proliferation+) phenotype of BRCA1-related breast cancer*. Cancer Res 64: S. 830-835.

Fuks F., Milner J. und Kouzarides T., (1998) *BRCA2 associates with acetyltransferase activity when bound to P/CAF*. Oncogene 17: S. 2531-2534.

Fulford L. G., Easton D. F., Reis-Filho J. S., Sofronis A., Gillett C. E., Lakhani S. R. und Hanby A., (2006) *Specific morphological features predictive for the basal phenotype in grade 3 invasive ductal carcinoma of breast*. Histopathology 49: S. 22-34.

Gadzicki D., Schubert A., Fischer C., Milde S., Lehmann U., Steinemann D., Luck H. J., Kreipe H. und Schlegelberger B., (2009) *Histopathological criteria and selection algorithms for BRCA1 genetic testing*. Cancer Genet Cytogenet 189: S. 105-111.

Gadzicki D., Evans D. G., Harris H., Julian-Reynier C., Nippert I., Schmidtke J., Tibben A., van Asperen C. J. und Schlegelberger B., (2011) *Genetic testing for familial/hereditary breast cancer-comparison of guidelines and recommendations from the UK, France, the Netherlands and Germany*. J Community Genet 2: S. 53-69.

Goldhirsch A., Glick J. H., Gelber R. D., Coates A. S., Thurlimann B., Senn H. J. und Panel members, (2005) *Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005*. Ann Oncol 16: S. 1569-1583.

Gonzalez-Angulo A. M., Timms K. M., Liu S., Chen H., Litton J. K., Potter J., Lanchbury J. S., Stemke-Hale K., Hennessy B. T., Arun B. K. et al., (2011) *Incidence and outcome of BRCA mutations in unselected patients with triple receptor-negative breast cancer*. Clin Cancer Res 17: S. 1082-1089.

Gorski B., Byrski T., Huzarski T., Jakubowska A., Menkiszak J., Gronwald J., Pluzanska A., Bebenek M., Fischer-Maliszewska L., Grzybowska E. et al., (2000)

Founder mutations in the BRCA1 gene in Polish families with breast-ovarian cancer. Am J Hum Genet 66: S. 1963-1968.

Haberland J., Bertz J., Wolf U., Ziese T. und Kurth B. M., (2010) *German cancer statistics 2004.* BMC Cancer 10: S. 52.

Hall J. M., Lee M. K., Newman B., Morrow J. E., Anderson L. A., Huey B. und King M. C., (1990) *Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21.* Science 250: S. 1684-1689.

Hammond M. E., Hayes D. F. und Wolff A. C., (2011) *Clinical Notice for American Society of Clinical Oncology-College of American Pathologists guideline recommendations on ER/PgR and HER2 testing in breast cancer.* J Clin Oncol 29: S. e458.

Harvey J. M., Clark G. M., Osborne C. K. und Allred D. C., (1999) *Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer.* J Clin Oncol 17: S. 1474-1481.

Hashizume R., Fukuda M., Maeda I., Nishikawa H., Oyake D., Yabuki Y., Ogata H. und Ohta T., (2001) *The RING heterodimer BRCA1-BARD1 is a ubiquitin ligase inactivated by a breast cancer-derived mutation.* J Biol Chem 276: S. 14537-14540.

Heil J., Gondos A., Rauch G., Marmé F., Rom J., Golatta M., Junkermann H., Sinn P., Aulmann S., Debus J. et al., (2012) *Outcome analysis of patients with primary breast cancer initially treated at a certified academic breast unit.* Breast (Edinburgh, Scotland) 21: S. 303-308.

Heitz F., Harter P., Lueck H. J., Fissler-Eckhoff A., Lorenz-Salehi F., Scheil-Bertram S., Traut A. und du Bois A., (2009) *Triple-negative and HER2-overexpressing breast cancers exhibit an elevated risk and an earlier occurrence of cerebral metastases.* Eur J Cancer 45: S. 2792-2798.

HGVS, Human Genome Variation Society, (2011) *Nomenclature for the description of sequence variants*. <http://www.hgvs.org/mutnomen/>. (10.09.12).

Hiripi E., Gondos A., Emrich K., Holleczeck B., Katalinic A., Luttmann S., Sirri E., Brenner H. und Group Gekid Cancer Survival Working, (2012) *Survival from common and rare cancers in Germany in the early 21st century*. *Ann Oncol* 23: S. 472-479.

Honrado E., Benitez J. und Palacios J., (2005) *The molecular pathology of hereditary breast cancer: genetic testing and therapeutic implications*. *Mod Pathol* 18: S. 1305-1320.

Houssami N., Macaskill P., Marinovich M. L., Dixon J. M., Irwig L., Brennan M. E. und Solin L. J., (2010) *Meta-analysis of the impact of surgical margins on local recurrence in women with early-stage invasive breast cancer treated with breast-conserving therapy*. *Eur J Cancer* 46: S. 3219-3232.

Johnson N., Fletcher O., Palles C., Rudd M., Webb E., Sellick G., dos Santos Silva I., McCormack V., Gibson L., Fraser A. et al., (2007) *Counting potentially functional variants in BRCA1, BRCA2 and ATM predicts breast cancer susceptibility*. *Hum Mol Genet* 16: S. 1051-1057.

Karchin R., Agarwal M., Sali A., Couch F. und Beattie M. S., (2008) *Classifying Variants of Undetermined Significance in BRCA2 with protein likelihood ratios*. *Cancer Inform* 6: S. 203-216.

Krupa R., Sliwinski T., Morawiec Z., Pawlowska E., Zadrozny M. und Blasiak J., (2009) *Association between polymorphisms of the BRCA2 gene and clinical parameters in breast cancer*. *Exp Oncol* 31: S. 250-251.

Liede A., Karlan B. Y. und Narod S. A., (2004) *Cancer risks for male carriers of germline mutations in BRCA1 or BRCA2: a review of the literature*. *J Clin Oncol* 22: S. 735-742.

- Lin H. R., Ting N. S., Qin J. und Lee W. H., (2003) *M phase-specific phosphorylation of BRCA2 by Polo-like kinase 1 correlates with the dissociation of the BRCA2-P/CAF complex*. J Biol Chem 278: S. 35979-35987.
- Liu J., Yuan Y., Huan J. und Shen Z., (2001) *Inhibition of breast and brain cancer cell growth by BCCIPalpha, an evolutionarily conserved nuclear protein that interacts with BRCA2*. Oncogene 20: S. 336-345.
- Lostumbo L., Carbine N. E. und Wallace J., (2010) *Prophylactic mastectomy for the prevention of breast cancer*. Cochrane Database Syst Rev: S. CD002748.
- Loveday C., Turnbull C., Ramsay E., Hughes D., Ruark E., Frankum J. R., Bowden G., Kalmyrzaev B., Warren-Perry M., Snape K. et al., (2011) *Germline mutations in RAD51D confer susceptibility to ovarian cancer*. Nat Genet 43: S. 879-882.
- Lux M. P., Fasching P. A. und Beckmann M. W., (2006) *Hereditary breast and ovarian cancer: review and future perspectives*. J Mol Med (Berl) 84: S. 16-28.
- Marmorstein L. Y., Ouchi T. und Aaronson S. A., (1998) *The BRCA2 gene product functionally interacts with p53 and RAD51*. Proc Natl Acad Sci U S A 95: S. 13869-13874.
- Mavaddat N., Barrowdale D., Andrulis I. L., Domchek S. M., Eccles D., Nevanlinna H., Ramus S. J., Spurdle A., Robson M., Sherman M. et al., (2012) *Pathology of breast and ovarian cancers among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from the Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2 (CIMBA)*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 21: S. 134-147.
- Meindl A., German Consortium for Hereditary Breast und Ovarian Cancer, (2002) *Comprehensive analysis of 989 patients with breast or ovarian cancer provides BRCA1 and BRCA2 mutation profiles and frequencies for the German population*. Int J Cancer 97: S. 472-480.
- Meindl A., Hellebrand H., Wiek C., Erven V., Wappenschmidt B., Niederacher D., Freund M., Lichtner P., Hartmann L., Schaal H. et al., (2010) *Germline mutations in*

breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene. Nat Genet 42: S. 410-414.

Meindl Alfons, Ditsch Nina, Kast Karin, Rhiem Kerstin und Schmutzler Rita K., (2011) *Hereditary Breast and Ovarian Cancer: New Genes, New Treatments, New Concepts.* Dtsch Arztebl International 108: S. 323-330.

Meyer P., Voiglaender T., Bartram C. R. und Klaes R., (2003) *Twenty-three novel BRCA1 and BRCA2 sequence alterations in breast and/or ovarian cancer families in Southern Germany.* Hum Mutat 22: S. 259.

Meyer P., Landgraf K., Hogel B., Eiermann W. und Ataseven B., (2012) *BRCA2 mutations and triple-negative breast cancer.* PLoS One 7: S. e38361.

Miki Y., Swensen J., Shattuck-Eidens D., Futreal P. A., Harshman K., Tavtigian S., Liu Q., Cochran C., Bennett L. M., Ding W. et al., (1994) *A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1.* Science 266: S. 66-71.

Morrison P., Hodgson S. und Haites N., (2002) *Familial Breast and ovarian cancer. Genetics, screening and management.* Cambridge: Cambridge University Press.

NCCN, National Comprehensive Cancer Network, (2011) *Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines) for Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian.* http://www.nccn.org/about/news/ebulletin/2011-05-31/guidelines_compendium.asp. (11.01.2013).

Nguyen P. L., Taghian A. G., Katz M. S., Niemierko A., Abi Raad R. F., Boon W. L., Bellon J. R., Wong J. S., Smith B. L. und Harris J. R., (2008) *Breast cancer subtype approximated by estrogen receptor, progesterone receptor, and HER-2 is associated with local and distant recurrence after breast-conserving therapy.* J Clin Oncol 26: S. 2373-2378.

NICE, National Institute for Clinical Excellence, (2006) *NICE clinical guideline 41: Familial breast cancer. The classification and care of women at risk of familial breast cancer in primary, secondary and tertiary care.*

NICE, National Institute for Clinical Excellence, (2009) *Early and locally advanced breast cancer Diagnosis and treatment*.

Nielsen T. O., Hsu F. D., Jensen K., Cheang M., Karaca G., Hu Z., Hernandez-Boussard T., Livasy C., Cowan D., Dressler L. et al., (2004) *Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma*. Clin Cancer Res 10: S. 5367-5374.

NZGG, New Zealand Guidelines Group, (2009) *Management of early breast cancer*. Wellington.

Passarge Eberhard, (2008) *Taschenatlas Humangenetik*. Stuttgart [u.a.]: Thieme.

Paull T. T., Cortez D., Bowers B., Elledge S. J. und Gellert M., (2001) *Direct DNA binding by Brca1*. Proc Natl Acad Sci U S A 98: S. 6086-6091.

Powell S. N. und Kachnic L. A., (2003) *Roles of BRCA1 and BRCA2 in homologous recombination, DNA replication fidelity and the cellular response to ionizing radiation*. Oncogene 22: S. 5784-5791.

Rajagopalan S., Andreeva A., Rutherford T. J. und Fersht A. R., (2010) *Mapping the physical and functional interactions between the tumor suppressors p53 and BRCA2*. Proc Natl Acad Sci U S A 107: S. 8587-8592.

Rajasekaran R., Sudandiradoss C., Doss C. G. und Sethumadhavan R., (2007) *Identification and in silico analysis of functional SNPs of the BRCA1 gene*. Genomics 90: S. 447-452.

Remmele W. und Stegner H. E., (1987) *[Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]*. Pathologe 8: S. 138-140.

Risch H. A., McLaughlin J. R., Cole D. E., Rosen B., Bradley L., Fan I., Tang J., Li S., Zhang S., Shaw P. A. et al., (2006) *Population BRCA1 and BRCA2 mutation*

frequencies and cancer penetrances: a kin-cohort study in Ontario, Canada. J Natl Cancer Inst 98: S. 1694-1706.

Risch H. A., McLaughlin J. R., Cole D. E., Rosen B., Bradley L., Kwan E., Jack E., Vesprini D. J., Kuperstein G., Abrahamson J. L. et al., (2001) *Prevalence and penetrance of germline BRCA1 and BRCA2 mutations in a population series of 649 women with ovarian cancer.* Am J Hum Genet 68: S. 700-710.

RKI, Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., (2012) *Krebs in Deutschland 2007/2008.* 8. Auflage. Berlin.

Schnitt S. J., Connolly J. L., Khettry U., Mazoujian G., Brenner M., Silver B., Recht A., Beadle G. und Harris J. R., (1987) *Pathologic findings on re-excision of the primary site in breast cancer patients considered for treatment by primary radiation therapy.* Cancer 59: S. 675-681.

Sorlie T., Perou C. M., Tibshirani R., Aas T., Geisler S., Johnsen H., Hastie T., Eisen M. B., van de Rijn M., Jeffrey S. S. et al., (2001) *Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications.* Proc Natl Acad Sci U S A 98: S. 10869-10874.

Statistische Bundesamt, (2012) *Pressemitteilung Nr. 041 vom 03.02.2012: Jeder Vierte starb 2010 an Krebs.* (07.01.13).

Tavtigian S. V., Deffenbaugh A. M., Yin L., Judkins T., Scholl T., Samollow P. B., de Silva D., Zharkikh A. und Thomas A., (2006) *Comprehensive statistical study of 452 BRCA1 missense substitutions with classification of eight recurrent substitutions as neutral.* J Med Genet 43: S. 295-305.

Thompson D., Easton D. und Breast Cancer Linkage Consortium, (2001) *Variation in cancer risks, by mutation position, in BRCA2 mutation carriers.* Am J Hum Genet 68: S. 410-419.

- Tischkowitz M., Brunet J. S., Begin L. R., Huntsman D. G., Cheang M. C., Akslen L. A., Nielsen T. O. und Foulkes W. D., (2007) *Use of immunohistochemical markers can refine prognosis in triple negative breast cancer*. BMC Cancer 7: S. 134.
- Tutt A., Robson M., Garber J. E., Domchek S. M., Audeh M. W., Weitzel J. N., Friedlander M., Arun B., Loman N., Schmutzler R. K. et al., (2010) *Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial*. Lancet 376: S. 235-244.
- UICC, Union for International Cancer Control, (2009) *TNM Classification of Malignant Tumours*. 7. Auflage. New York: Wiley-Blackwell, Inc.
- Umemura S., Takekoshi S., Suzuki Y., Saitoh Y., Tokuda Y. und Osamura R. Y., (2005) *Estrogen receptor-negative and human epidermal growth factor receptor 2-negative breast cancer tissue have the highest Ki-67 labeling index and EGFR expression: gene amplification does not contribute to EGFR expression*. Oncol Rep 14: S. 337-343.
- Verhoog L. C., Brekelmans C. T., Seynaeve C., Dahmen G., van Geel A. N., Bartels C. C., Tilanus-Linthorst M. M., Wagner A., Devilee P., Halley D. J. et al., (1999) *Survival in hereditary breast cancer associated with germline mutations of BRCA2*. J Clin Oncol 17: S. 3396-3402.
- Veronesi U., Cascinelli N., Mariani L., Greco M., Saccozzi R., Luini A., Aguilar M. und Marubini E., (2002) *Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer*. N Engl J Med 347: S. 1227-1232.
- von Minckwitz G., Untch M., Nuesch E., Loibl S., Kaufmann M., Kummel S., Fasching P. A., Eiermann W., Blohmer J. U., Costa S. D. et al., (2011) *Impact of treatment characteristics on response of different breast cancer phenotypes: pooled analysis of the German neo-adjuvant chemotherapy trials*. Breast Cancer Res Treat 125: S. 145-156.

Welsh P. L., Owens K. N. und King M. C., (2000) *Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2*. Trends Genet 16: S. 69-74.

WHO, World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, (2008) *World Cancer Report*. Lyon.

Wolff A. C., Hammond M. E., Schwartz J. N., Hagerty K. L., Allred D. C., Cote R. J., Dowsett M., Fitzgibbons P. L., Hanna W. M., Langer A. et al., (2007) *American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer*. J Clin Oncol 25: S. 118-145.

Wong A. K., Pero R., Ormonde P. A., Tavtigian S. V. und Bartel P. L., (1997) *RAD51 interacts with the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility gene brca2*. J Biol Chem 272: S. 31941-31944.

Wooster R., Bignell G., Lancaster J., Swift S., Seal S., Mangion J., Collins N., Gregory S., Gumbs C. und Micklem G., (1995) *Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2*. Nature 378: S. 789-792.

Young S. R., Pilarski R. T., Donenberg T., Shapiro C., Hammond L. S., Miller J., Brooks K. A., Cohen S., Tenenholz B., Desai D. et al., (2009) *The prevalence of BRCA1 mutations among young women with triple-negative breast cancer*. BMC Cancer 9: S. 86.

Zhang H., Somasundaram K., Peng Y., Tian H., Zhang H., Bi D., Weber B. L. und El-Deiry W. S., (1998) *BRCA1 physically associates with p53 and stimulates its transcriptional activity*. Oncogene 16: S. 1713-1721.

Zhang J. und Powell S. N., (2005) *The role of the BRCA1 tumor suppressor in DNA double-strand break repair*. Mol Cancer Res 3: S. 531-539.

Zhang J., Willers H., Feng Z., Ghosh J. C., Kim S., Weaver D. T., Chung J. H., Powell S. N. und Xia F., (2004) *Chk2 phosphorylation of BRCA1 regulates DNA double-strand break repair*. Mol Cell Biol 24: S. 708-718.

Zhong Q., Chen C. F., Li S., Chen Y., Wang C. C., Xiao J., Chen P. L., Sharp Z. D. und Lee W. H., (1999) *Association of BRCA1 with the hRad50-hMre11-p95 complex and the DNA damage response*. Science 285: S. 747-750.

Publikation

Auszüge dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Meyer P., Landgraf K., Hogel B., Eiermann W. und Ataseven B., (2012) *BRCA2 mutations and triple-negative breast cancer*. PLoS One 7: S. e38361.

Thesen

1. Mit ca. 72.000 Neuerkrankungen jährlich allein in Deutschland ist das Mammakarzinom die häufigste Krebserkrankung der Frau. Hierzulande erkrankt jede achte Frau an Brustkrebs (RKI., 2012). Bei Vorliegen eines Gendefekts (BRCA1/2-Mutation) kann dieses Risiko sogar 80–90% betragen (Meindl et al., 2011).
2. 80% der BRCA1-assoziierten bzw. 12–17% aller Mammakarzinome zeigen in der Immunhistochemie einen triple-negativen Phänotyp – eine Untergruppe, die sich durch fehlende Östrogen- und fehlende Progesteronrezeptoren sowie eine fehlende HER2-Expression auszeichnet (Foulkes et al., 2004; Foulkes et al., 2010).
3. In der hier vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit erfolgte die Erhebung der BRCA1- und BRCA2-Mutationfrequenz in einer triple-negativen Brustkrebskohorte (n = 30) aus Süddeutschland. Das Patientenkollektiv wurde unbeeinflusst vom Alter bei Erstdiagnose und familiärer Häufung von Krebserkrankungen ausgewählt und unterlag keinen weiteren Selektionskriterien.
4. Die Analyse ergab insgesamt eine zwanzigprozentige Keimbahnmutationrate (6/30) in den Genen BRCA1 und BRCA2. Im Gegensatz zu vergleichbaren Studien zu diesem Thema fanden wir eine hohe Mutationsfrequenz im BRCA2-Gen (5/30; 16,7%) und nur eine relativ niedrige im BRCA1-Gen (1/30; 3,3%).
5. Es wurden vier bereits bekannte pathologische Frameshift-Mutationen (BRCA1: c.5266dupC; BRCA2: c.1029delA, c.5645C>A, c.6444dupT) und eine unbekannte Splice-Site-Mutation (BRCA2: c.476-1G>A) mit jedoch klarer pathologischer Wirkung identifiziert. Des Weiteren ermittelten wir eine Missense-Mutation in BRCA2 (c.7878G>C), die in früherer Literatur als wahrscheinlich krankheitsassoziierte Mutation klassifiziert wurde.
6. In unserer Kohorte von 30 triple-negativen Patientinnen erfüllten 15 Fälle (50%) nicht die aktuellen klinischen Kriterien für ein BRCA1- und BRCA2-Mutations-screening in Deutschland. Die Mutationsrate in dieser Untergruppe lag jedoch bei 13% (2/15).

7. Unsere Ergebnisse sprechen dafür, dass sich Frauen mit triple-negativem Brustkrebs für ein BRCA1- und BRCA2-Mutationsscreening qualifizieren.
8. Wenn Studien mit einem größeren Patientenkollektiv unsere Ergebnisse bestätigen würden, sollten die deutschen Kriterien zur genetischen Testung hinterfragt werden und triple-negativer Brustkrebs könnte als Einschlusskriterium zur Diskussion gestellt werden.