TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Frauenklinik und Poliklinik

Klinikum rechts der Isar

(Direktion: Univ.-Prof. Dr. Marion B. Kiechle)

Inzidenz und Outcome von BRCA1-Mutationsträgerinnen im tripel-negativen Kollektiv

Sandra Klan

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Alfons Meindl
2. Univ.-Prof. Dr. Marion B. Kiechle

Die Dissertation wurde am 30.06.2014 bei der Technischen Universtität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 15.09.2015 angenommen.

Mein Dank gilt

Herrn Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Alfons Meindl

und Frau Dr. rer. nat. Eva Groß

für die engagierte und hervorragende Betreuung und Unterstützung

sowie der gesamten tumorgenetischen Arbeitsgruppe

der Frauenklinik der Technischen Universtität München.

Für meine Mutter

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis I

Abkürzungsverzeichnis IV

Abstract VIII

1. Einleitung 1
1.1 Das Mammakarzinom 1
1.1.1 Epidemiologie 1
1.1.2 Karzinogenese des Mammakarzinoms 2
1.1.3 Klassifizierung der Mammakarzinome 4
1.2 Tripel-negativer Brustkrebs (TNBC) 7
1.2.1 Definition des tripel-negativen Brustkrebs 7
1.2.2 Unterscheidung zwischen dem tripel-negativen und dem basalen Brustkrebs 7
1.2.3 Epidemiologie und Risikofaktoren des TNBC 9
1.2.4 Histologische und molekularbiologische Eigenschaften des TNBC 10
1.2.5 Diagnostik des TNBC 11
1.2.6 Rezidivmuster und Metastasierung 11
1.2.7 Prognose des TNBC 12
1.2.8 Therapie des TNBC 14
1.3 Das familiäre Mammakarzinom 17
1.3.1 Epidemiologie des familiären Mammakarzinoms 17
1.3.2 Genetische Beratung und Diagnostik 18
1.3.3 BRCA1-Tumorsupressorgen 21
1.3.4 Klinik und Histopathologie des BRCA1-assoziierten Mammakarzinoms 23
1.3.5 Therapie des BRAC1-assoziierten Mammakarzinoms 24
1.3.6 PARP (Poly(ADP-Ribose) Polymerase)-Inhibitoren 24
1.4 BRCA1 und TNBC 26

2. Fragestellung 28

3. Material und Methoden 29
3.1. Material 29
3.1.1. Chemikalien 29
3.1.2. Molekularbiologische Kits 30
3.1.3. Enzyme 30
3.1.4. Lösungen, Puffer, für die Gel-Elektrophorese 30
3.1.5. WAVE® Transgenomic Pufferlösungen 31
3.1.6. Primer und Primerdesign 31
3.1.7. Verbrauchsmaterialien 32
3.1.8. Geräte 33
3.1.9. Patientenkollektiv und Datenbank MACA 33
3.2. Methoden 34
3.2.1. Die Polymerasekettenreaktion (PCR) 34
3.2.2. Agarose-Gelelektrophorese 35
3.2.3. Schmelzkurvenanalyse mit dem Light Cycler® 480 35
3.2.4. Denaturierende Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit WAVE® 38
3.2.5. Sequenzierung 41
3.2.6. Statistische Analysen 46

4. Ergebnisse 47

4.1. Klinische Daten des Patientenkollektivs und statistische Auswertungen ... 47
4.1.1. Klinische Daten ... 49
4.2. Mutationen ... 53
4.2.1. Unbekannte Mutationen ... 53
4.2.2. Bekannte Mutationen ... 53
4.2.3. Tabellarische Darstellung der Mutationen ... 55
4.2.4. Darstellung der Schmelzkurven und der Sequenzen ... 57
4.3. Polymorphismen ... 66
4.3.1. Gekoppelte Polymorphismen im Patientenkollektiv ... 67
4.3.2. Gekoppelte Polymorphismen mit unvollständigem Verlauf ... 67
4.3.3. Polymorphismen außerhalb des Clusters ... 68
4.3.4. Unklassifizierte Varianten ... 68
4.4. Korrelationen und Kreuztabellen ... 69
4.4.1. Kreuztabellen ... 69
4.4.2. Klinische Eigenschaften von Wildtypen und Mutationsträgern im Vergleich ... 73
4.5. Statistiken zum Überleben und rezidivfreien Intervall ... 74
4.5.1. Rezidivfreies Überleben ... 74
4.5.2. Rezidivfreies Überleben nach 1, 2 und 5 Jahren ... 75
4.5.3. Rezidivmuster ... 75
4.5.4. Kaplan-Meier-Kurven zum progressionsfreie Überleben ... 76
4.5.5. Gesamtüberleben ... 77
4.5.6. Gesamtüberleben im Verlauf nach 1, 2 und 5 Jahren ... 77
4.5.7. Todesfälle bei Mutationsträgerinnen und Wildtypen im Vergleich ... 78
4.5.8. Kaplan-Meier-Gesamtüberleben ... 79
4.6. Regressionsanalysen und prognostisch relevante Parameter für das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben ... 79
4.6.1. Cox-Regression und Hazard-Ratio ... 79
4.6.2. Univariate Cox-Regressionsanalysen ... 80
4.6.3. Multivariate Cox Regressionsanalysen ... 82
4.6.4. Confounder-Effekte in Bezug auf das Gesamtüberleben und den BRCA1-Mutationsstatus 83

5. Diskussion ... 84
5.1. Diskussion Methodik ... 84
5.2. Diskussion der klinischen Datenstruktur ... 86
5.3. BRCA1-Mutationen ... 89
5.4. Polymorphismen, unklassifizierte Varianten ... 94
5.5. Erweiterung der Testkriterien ... 96
5.6. Statistische Auswertung bezüglich des Überlebens und der Prognose von BRCA1-Mutationsträgerinnen und Nicht-Mutationsträgerinnen im Vergleich ... 99
5.6.1. Metastasen ... 99
5.6.2. Lymphknotenstatus und Tumorgröße innerhalb des tripel-negativen Kollektivs ... 100
5.6.3. Familienanamnese und Mutationen innerhalb des Kollektivs ... 101
5.6.4. BRCA1-Status und Alter ... 102
5.6.5. Rezidivmuster ... 102
5.7. Prognostische Parameter ... 103
5.8. Überlebenskurven ... 104
5.9. Therapieoptionen ... 106
5.9.1. „BRCAness"-Tumortyp innerhalb des sporadisch tripel-negativen/basalen Clusters ... 107
5.9.2. Einsatz klassischer Chemotherapeutika ... 111
5.9.3. EGFR ... 114
5.9.4. Zielgerichtete Therapie mit PARP-Inhibitoren ... 114
5.9.5. PARP und TNBC ... 117
5.9.6. BRCA-unabhängige Wirkungsfelder der PARP-Inhibitoren ... 118

6. Zusammenfassung 120
7. Kritik an dieser Studie / Ausblick 123
8. Literaturverzeichnis 124
9. Abbildungsverzeichnis 136
10. Tabellenverzeichnis 138
11. Anhang 140

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
Ankle1	ankyrin repeat and LEM domain containing 1
Arg	Arginin
ATM	ataxia telangiectasia mutated
ATR	ataxia telangiectasia and Rad3-related
BACH1	BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor
bcl-2	B-cell CLL/lymphoma 2
BIC	Breast Cancer Information Core
BARD1	BRCA1-associated RING domain 1
BRCA1	Breast Cancer 1, early onset
BRCA2	Breast Cancer 2, early onset
BRCT	BRCA1 C Terminus (BRCT) domain
BRIP1	BRCA1-interacting protein C-terminal helicase 1
CAMK1D	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type 1
CASP8	Caspase 8
CHEK2	Checkpoint kinase 2
CK14	Cytokeratin14
CK5	Cytokeratin5
CK6	Cytokeratin6
CMF	Cyclophosphamid, Methotrexat, 5-Floururacil
cPR	complete pathological response
ddNTPs	Didesoxyribonukleosid-Triphosphate
DGGG	Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe
DHPLC	Denaturing High Pressure Liquid Chromatography
DKG	Deutsche Krebsgesellschaft
DNA	Desoxyribonukleinsäure

dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EC	Epirubicin, Cyclophosphamid
EGFR	epidermal growth factor Rezeptor
ER	Östrogenrezeptor
ESR1	estrogen receptor 1
FEC	5-Floururacil, Epirubicin Cyclophosphamid
FS	Frameshift
GC	Gemcitabine, Carboplatin
GCI	Gemcitabine, Carboplatin, Iniparib
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
GTP	Guanosintriphosphat
H2AX	Histon H2A
HER2neu	= ERBB2 = v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog
HR	Homologe rekombinatiom
HR	Hazard ratio
HRM	High Resolution Melting
KI	Konfidenzintervall
LC	Light Cycler
Leu	Leucin
LK	Lymphknoten
LOH	Loss of heterozygosity
LSP1	lymphocyte-specific protein 1
Lys	Lysin
MaCa	Mammakarzinom
MAP3K1	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1
MLPA	Multiplex ligation-dependent probe amplification
MRI	München Rechts der Isar

MRN-Komplex	Mre11, Rad50 und Nbs1
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	missense-Mutation
NB-TNBC	nicht-basaler tripel negativer Brustkrebs
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NHEJ	Nicht-homologe End-zu-End Reparatur
NOS	not otherwise specifice
NS	nonsense-Mutation
NT-BBC	nicht tripel negativer basaler Brustkrebs
OS	overal survival (Gesamtüberleben)
OvCa	Ovarialkarzinom
p53	Tumorsupressorgen p53
PALB2	Partner and localizer of BRCA2
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PCA	Prostatkarzinom
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFS	Progressionfree survival (progressionsfreies Überleben)
PR	Progesteron Rezeptor
Pr	Prolin
PTEN	phosphatase and tensin homolog
RAP 80	receptor-associated protein 80
Ser	Serin
SNPs	single-nucleotide polymorphism
SP	Splicemutation
Taq-Polymerase	thermostabile DNA-Polymerase
TNBBC	tripel negativer basaler Brustkrebs
TNBC	tripel negativer Brustkrebs

TNM	Tumor, Lymphknoten, Metastasen
TopBP1	DNA topoisomerase 2-binding protein
UV	Ultraviolett
WHO	Weltgesundheitsorganistation
WT	Wildtyp

Abstract

Hintergrund

Das tripel-negative Mammakarzinom zeichnet sich aufgrund des fehlenden Rezeptorbesatzes (ER, PR, HER2) und der somit limitierten Therapieoptionen durch eine besonders schlechte Prognose aus. Da ein Großteil der BRCA1-assoziierten Tumore einen tripel-negativen Phänotyp aufweist, wird in dieser Untersuchung im Umkehrschluss die Frage nach der tatsächlichen Häufigkeit von BRCA1-Mutationsträgerinnen in einem unselektierten tripel-negativen Kollektiv gestellt. Von großem Interesse ist hierbei auch die Bedeutung des Mutationsstatus für die Prognose unter dem Aspekt eines möglicherweise verbesserten Ansprechens auf chemotherapeutische Substanzen.

Methoden

Tumorgewebe von Patientinen mit tripel-negativen Tumoren (n=97) wurde auf das Vorhandensein von BRCA1-Mutationen mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse und Sequenzierung untersucht.

Ergebnisse

BRCA1-Mutationen wurden in 10 Tumorproben nachgewiesen, wobei zwei noch unbekannte Mutationen identifiziert wurden. Die bereits bekannten Mutationen sind im Zusammenhang mit hereditären Brustkrebsfällen beschrieben worden. Eine der bekannten Mutationen konnte jedoch als rein somatische Mutation klassifiziert werden. Ein prognostischer Vorteil für Mutationsträgerinnen konnte nicht nachgewiesen werden. Etablierte prognostische Parameter, wie Tumorgröße und Nodalstatus, wurden als unabhängige Parameter bestätigt. Ein signifikanter Altersunterschied zwischen den Mutationsträgerinnen und dem restlichen Patientenkollektiv bei Erstdiagnose wurde nicht gefunden.

Zusammenfassung

In dem untersuchten unselektierten tripel-negativen Kollektiv wurde eine BRCA1-Mutationenfrequenz von 10% ermittelt. Ein Überlebensvorteil der Mutationsträgerinnen konnte im untersuchten Kollektiv nicht gefunden werden, was jedoch möglicherweise auf die kleine Fallzahl und auf nicht erfolgte adjuvante Chemotherapie bei 21% der Patientinnen zurückzuführen ist.

1. Einleitung

Bei den Tumorerkrankungen der Brust handelt es sich nicht um eine einheitliche Erkrankung, sondern vielmehr um eine sehr heterogene Gruppe von malignen Neoplasien die das gleiche Organ betreffen. Daher muss eine Differenzierung aufgrund ihres biologischen Verhaltens, ihrer Histologie und ihrer klinischen Eigenschaften vorgenommen und eine Einteilung in verschiedenen Subgruppen durchgeführt werden. Eine dieser Subgruppen wird von denen als tripel-negativ klassifizierten Mammakarzinomen gebildet, welche den zentralen Gegenstand der im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Untersuchungen darstellen. In Deutschland handelt es sich bei ungefähr 15% der klassifizierten Mammakarzinome um tripel-negative Tumoren, woraus sich besondere Konsequenzen für die Therapie, das Risikoprofil und die Prognose ableiten lassen. Jedoch ist es zum Verständnis der Besonderheiten des tripel-negativen Brustkrebses wichtig, die Eigenschaften des Mammakarzinoms im Allgemeinen und im Vergleich zu rekapitulieren.

1.1 Das Mammakarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Die Tumoren des Brustdrüsenkörpers sind mit einer Neuerkrankungsrate von 58.000 Frauen pro Jahr, und einem relativen Anteil von 29%, nach Statistiken des Robert-Koch- Instituts die häufigste Krebserkrankung der Frau. Hierbei liegt das mittlere Erkrankungsalter aller Brustkrebsubtypen bei 64 Jahren (Robert-Koch-Institut 2011). Das Lebenszeitrisiko für eine Frau an Brustkrebs zu erkranken kann somit auf ungefähr 12% geschätzt werden (R. Kreienberg 2008). Trotz einer außerordentlich guten 5-Jahres-Überlebensrate von 83%-87% stellt das Mammakarzinom mit circa 17.455 Todesfällen pro Jahr die häufigste tumorbedingte Todesursache der Frau dar (R. Kreienberg 2008). Dies entspricht in etwa einer brustkrebsbedingten Mortalität von 17% (Kiechle 2007). Diese epidemiologischen Daten weisen auf die Bedeutung der Prävention, Diagnostik, und Therapie dieser malignen Erkrankung hin, und stellen die Notwendigkeit der weiteren Erforschung der malignen Neoplasien des Brustdrüsenkörpers dar. Um eine weitere Verbesserung der Versorgung erzielen zu können ist dabei von entscheidender Bedeutung, die heterogene Gruppe von Tumoren des Brustdrüsenkörpers und deren Besonderheiten besser zu verstehen.

1.1.2 Karzinogenese des Mammakarzinoms

Die Entstehung des sporadischen Mammakarzinoms findet auf der Grundlage einer multifaktoriellen Genese statt, bei der zahlreiche endogene sowie exogene Veränderungen schließlich zu der Entstehung einer malignen Zelle führen. Dabei sind vor allem hormonelle Faktoren, der Lebensstil sowie die genetische Belastung eines Individuums, aber auch physikalische und chemisch-toxische Einflüsse von Bedeutung. Die auf den Organismus einwirkenden Faktoren führen auf molekulargenetischer Ebene zur Entstehung von malignen Zellen. Dabei wird von einer mehrstufigen Entwicklung ausgegangen, die Beckmann et al. mit dem Konzept der Mehrschritt-Karzinogenese erklären.

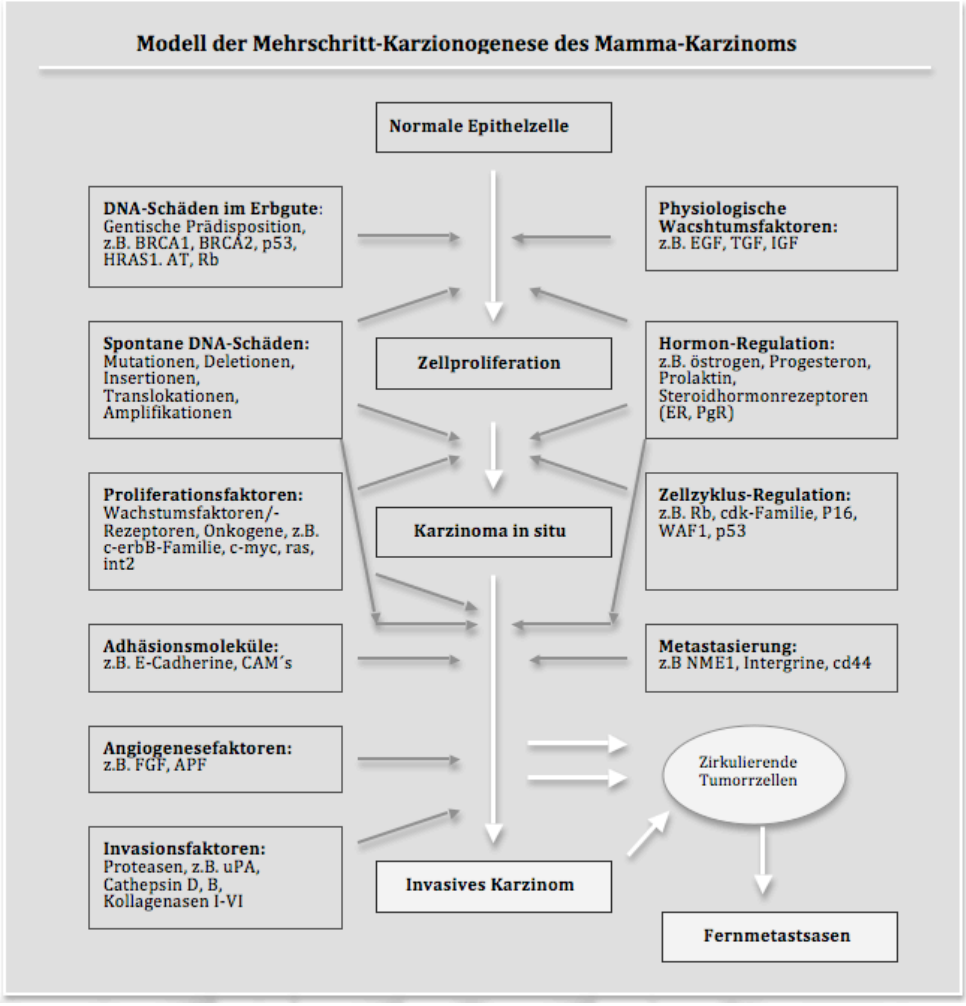


Abbildung 1: Modell der Mehrschritt-Karzinogenese nach Beckmann (Beckmann, Niederacher et al. 1997)

Eine Transformation einer intakten sich teilenden Zelle führt durch über einen längeren Zeitraum akkumulierende genetische Veränderungen zur Entwicklung einer Tumorzelle. Bei diesem Prozess spielen vor allem Veränderungen von wichtigen am Zellzyklus beteiligten Genen eine große Rolle, die so zur Enthemmung der Proliferationskontrolle führen. Es kommt zur Entstehung eines Karzinoma in situ, das zunächst noch bestehende feingewebliche Grenzen beachtet, sich dann aber durch weitere genetische Veränderung zu einem invasiv wachsenden Tumor entwickeln kann. Auf molekularbiologischer Ebene sind die bereits angesprochenen vulnerablen Gene der Zellzykluskontrolle in zwei Gruppen einzuteilen. Die Protoonkogene sowie die Tumorsupressorgene.

Protoonkogene

Protoonkogene codieren für die Zelle wichtige wachstumsfördernde Proteine, die innerhalb des physiologischen Zellzyklus für die Induktion der Zellproliferation verantwortlich sind (Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktorenrezeptoren, GTP- bindende Proteine und Zellkernproteine). Kommt es jedoch nun z.B. durch mutationsinduzierte Amplifikationen zu einer Überexpression solcher mitogenen Gene, kann ein ungehemmtes Wachstum induziert werden.

Tumorsupressorgene

Die Tumorsupressorgene codieren hingegen für Proteine, welche so genannte „Gatekeeper“ Funktionen übernehmen. Sie kontrollieren Zellzyklusabläufe, induzieren die sogenannte Apoptosen und sind an DNA Reparaturprozessen, Transkription und Signaltransduktion beteiligt. Kommt es durch Mutationen zur Inaktivierung von Tumorsupressorgenen, kann ebenfalls eine unphysiologische Zellproliferation angestoßen werden. Da in jeder Zelle zwei Allele der Tumorsupressorgene vorliegen und somit zwei intakte Genkopien zur Transkription zur Verfügung stehen, ist eine isolierte Veränderung zunächst rezessiv. Es müssen daher zur vollständigen Inaktivierung eines Tumorsupressorgens zwei mutagene Ereignisse stattfinden, welche die DNA nachhaltig verändern. Diese Theorie wurde erstmals 1971 durch den amerikanischen Genetiker Alfred G. Knudson postuliert, der durch Studien am Retinoblastom charakteristische Abläufe nachvollziehen konnte (Knudson 1971). Dabei können die beschriebenen Veränderungen, die zunächst zu einem Verlust der Heterozygotie führen und schließlich einen kompletten Ausfall des betroffenen Gens verursachen, sich über zwei denkbare Wege ereignen. Im Laufe eines Menschenlebens können zwei unabhängige somatische Mutationen in demselben Tumorsupressorgen zu dessen Ausfall führen und somit die Entstehung einer Neoplasie begünstigen. Wird nun aber bereits eine Mutation in einem

Tumorsupressorgen vererbt, liegt also eine Keimbahnmutation vor, so ist das Risiko, durch eine weitere somatische Mutation einen Funktionsverlust des betroffenen Gens zu erwerben, erhöht. Auch das Risiko im Laufe des Lebens an einer malignen Neoplasie zu erkranken steigt. Zwei der wichtigsten Tumorsupressorgene die diese Theorie verdeutlichen sind die Breast-Cancer-related-Gene BRCA1und BRCA2, die bei der Entstehung von hereditärem Brustkrebs von zentraler Bedeutung sind.

1.1.3 Klassifizierung der Mammakarzinome

Wie bereits erwähnt handelt es sich bei den malignen Neoplasien der Brustdrüse um verschiedene Typen, die sich in Ihrer Morphologie, Histologie und Mirkobiologie unterscheiden. Die Klassifizierung der unterschiedlichen Brustkrebsformen konnte im Laufe der Zeit auf der Grundlage immer neuer wissenschaftlicher Erkenntnisse weiterentwickelt werden. Früher stand die Einteilung nach histopathologischen Aspekten der Karzinome, also der von Epithelzellen ausgehenden Tumoren, im Vordergrund. Auch heute werden alle Tumorgewebe der feingeweblichen Untersuchung zugeführt und eine Einteilung findet entsprechend den von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) festgelegten Kriterien anhand der nachfolgenden Klassifizierung statt. Die invasiv-duktale Form stellt dabei die häufigste Entität dar.

WHO-Klassifikation der invasiven Mammakarzinome (WHO 2003)
Invasives duktales Karzinom, not otherwise specified, (NOS)
- Gemischter Typ – Pleomorphes Karzinom
- Karzinom mit osteoklastenartigen Riesenzellen
- Karzinom mit chorionkarzinomartigen Merkmalen
- Karzinom mit melanotischen Merkmalen
Invasives lobuläres Karzinom
Tubuläres Karzinom
Invasives kribriformes Karzinom
Medulläres Karzinom
Muzinöses Karzinom und andere Muzin-reiche Tumoren
- Muzinöses Karzinom
- Zystadenokarzinom und zylinderzelliges muzinöses Karzinom
- Siegelringzell-Karzinom
Neuroendokrine Tumoren
- Solides neuroendokrines Karzinom
- Atypischer Karzinoidtumor
- Kleinzelliges Karzinom
- Großzelliges neuroendokrines Karzinom
Invasives papilläres Karzinom
Invasives mikropapilläres Karzinom
Apokrines Karzinom
Metaplastische Karzinome
- Rein epitheliale metaplastische Karzinome
• Plattenepithelkarzinom
• Adenokarzinom mit Spindelzell-Metaplasie
• Adenosquamöses Karzinom
• Mukoepidermoides Karzinom
- Gemisches epithelial-/mesenchymales metaplastisches Karzinom
Lipidreiches Karzinom
Sekretorisches Karzinom
Onkozytäres Karzinom
Adenoid-zystisches Karzinom
Azinuszell-Karzinom
Glykogenreiches Klarzellkarzinom
Sebazeöses Karzinom
Inflammatorisches Karzinom

Tabelle 1: Histologische Einteilungen der invasiven Mammakarzinome, entnommen den S3 Leitlinien der DKG und der DGGG 2012 (e.V 2012)

Durch die Einführung immunhistochemischer Techniken konnten neue Erkenntnisse bezüglich der Oberflächeneigenschaften von Tumorzellen generiert werden. Daraus ergaben sich auch erstmals wichtige Erkenntnisse für gezielte Therapieoptionen und Prognosen. Heute werden alle Tumorgewebe immunhistochemisch aufgearbeitet. Dabei wird der Besatz der Tumorzellen mit Progesteron-, und Östrogenrezeptoren untersucht, sowie die Expression des Wachstumsfaktorrezeptors HER2-neu ermittelt. Grundsätzlich lassen sich demnach hormonrezeptor-positive und negative sowie HER2-positive und negative Tumoren unterscheiden.

Aufgrund der unterschiedlichen Reaktionsweisen und Muster der verschiedenen Tumoren der Brustdrüse, schienen die bisher getroffenen Klassifizierungen die Multiplizität jedoch nicht zu erfassen und Unterschiede in Verlauf und Prognose nicht zu erklären. Daher wurde im Jahre 2000 durch Perou et al. erstmals eine weitere Unterteilung eingeführt, die sich auf die Ergebnisse molekularbiologischer Expressionsstudien stützt (Perou, Sørlie et al. 2000). Die durch Miccroarry-Studien gewonnen Daten bezüglich des 500 Gene umfassenden Expressionsmuster der Brustkrebstumorzellen führten zur Unterscheidung von fünf intrinsischen Subtypen (Bertucci, Finetti et al. 2008). Wobei zwischen zwei hormonrezeptor-positiven und drei hormonrezeptor-negativen Gruppen zu unterschieden ist (Sørlie, Perou et al. 2001) .

Fünf intrinsische Subtypen der Mammakarzinome

- luminal A (ER+ und/oder PR+, HER2-)
- luminal B (Er+ und/oder PR+, HER2+)
- basal like (ER-, HER2-, cytokeratin 5/6+ und oder/ HER1+)
- HER-2-Expression (HER2+, ER-, PR-)
- Unklassifizierte Variante, entspricht den Mustern der normalen Brustzelle, man geht von einer Überrepräsentation normaler Zellen aus.

Abbildung 2: Intrinsische Subtypen des Mammakarzinoms nach Bertucci (Bertucci, Finetti et al. 2006)

In der Routinediagnostik wird bisher auf die Durchführung der doch recht aufwendigen Expressionsanalysen verzichtet, für molekularbiologische Forschung und das Verständnis von Genotyp/Phänotyp-Korrelationen sind sie von außerordentlicher Bedeutung. Auf der Grundlage dieser Stratifizierungen treten zwei sich zum Teil überlappende Gruppen in den Vordergrund, die sich durch die fehlende Überexpression der Rezeptortypen auszeichnen; Der so genannte tripel-negative Brustkrebs, respektive der basale Subtyp.

1.2 Tripel-negativer Brustkrebs (TNBC)

1.2.1 Definition des tripel-negativen Brustkrebs

Das tripel-negative Mammakarzinom ist gekennzeichnet durch eine negative Definition, das heißt, es zeichnet sich durch das Fehlen von Östrogen- und Progesteronhormon-Rezeptoren aus, sowie die mangelnde Expression des Wachstumsfaktor-Rezeptoren HER2. Bei dieser Einteilung handelt es sich, wie bereits beschrieben, um eine Klassifizierung, die mit Hilfe immunhistochemischer Routinediagnostik im klinischen Setting vorgenommen wird (de Ruijter, Veeck et al. 2011)

1.2.2 Unterscheidung zwischen dem tripel-negativen und dem basalen Brustkrebs

Auf der Grundlage der zwei beschriebenen Systematiken, die nach intrinsischen Subtypen oder dem Hormonrezeptorstatus klassifizieren, bestehen zwei zum Teil überlappende Gruppen, die Tumoren des basalen und des tripel-negativen Subtyps. Karzinome, welche dem basalen intrinsischen Subtyp zugeordnet werden, bilden den größten Anteil der tripel-negativen Mammakarzinome. Daher werden häufig die Begriffe des basalen und des tripel-negativen Brustkrebs synonym verwendet, ungeachtet der unterschiedlichen Definitionen. Eine exakte Abgrenzung ist jedoch von großer Bedeutung. Die Klassifizierung eines Tumors als basal beruht auf der Durchführung von Gen-Expressionsanalysen mittels Miccroarry-Technik und führt zu einer Beschreibung des molekularen Phänotyps, wobei sich die Definition des tripel-negativen Brustkrebses auf klinisch-immunhistochemische Untersuchungen stützt. Der tripel-negative- und der sogenannte „basal-like“-Brustkrebs bilden zwar eine recht große Schnittmenge und weisen viele Gemeinsamkeiten auf, jedoch liegt keine vollständige Konkordanz vor. Bertucci et al. fanden durch Metaanalysen heraus, dass ca. 71% der TNBC vom basalen Phänotyp sind (Bertucci, Finetti et al. 2008). Zu beachten ist, dass basale Tumoren durchaus auch eine Expression von Hormonrezeptoren zeigen können und somit per Definition nicht mehr tripel-negativ sind (Rakha, Tan et al. 2007). Diejenigen 30% der TNBC, die kein basales Expressionsmuster zeigen (NB-BBC), bilden wiederum eine inhomogne Gruppe von Tumoren, die unter anderem den „claudin-low“ Subtyp enthält (mit 5%) (Herschkowitz, Simin et al. 2007, Carey 2011).

Die folgende Darstellung setzt sich mit einer möglichen Entwicklung der beiden Subtypen und einer bestehenden Verbindung auseinander. De Ruijter entwickelte ein Modell, das davon ausgeht, dass bei der Entstehung des basalen tripel-negativen Brustkrebses Veränderungen im BRCA-Pathway von zentraler Bedeutung sind. So besteht die Möglichkeit, das Veränderungen im BRCA1-Gen zum TNBBC (tripel-negativen Brustkrebs vom basalen Subtyp) führen. Die daraus resultierende genetische Instabilität könnte wiederum Veränderungen induzieren, die bei einem Teil der Tumoren zur Entwicklung des NTN-BBC (nicht tripel-negativen basalen Brustkrebs) führen, zum Beispiel durch HER2 Überexpression (de Ruijter, Veeck et al. 2011).

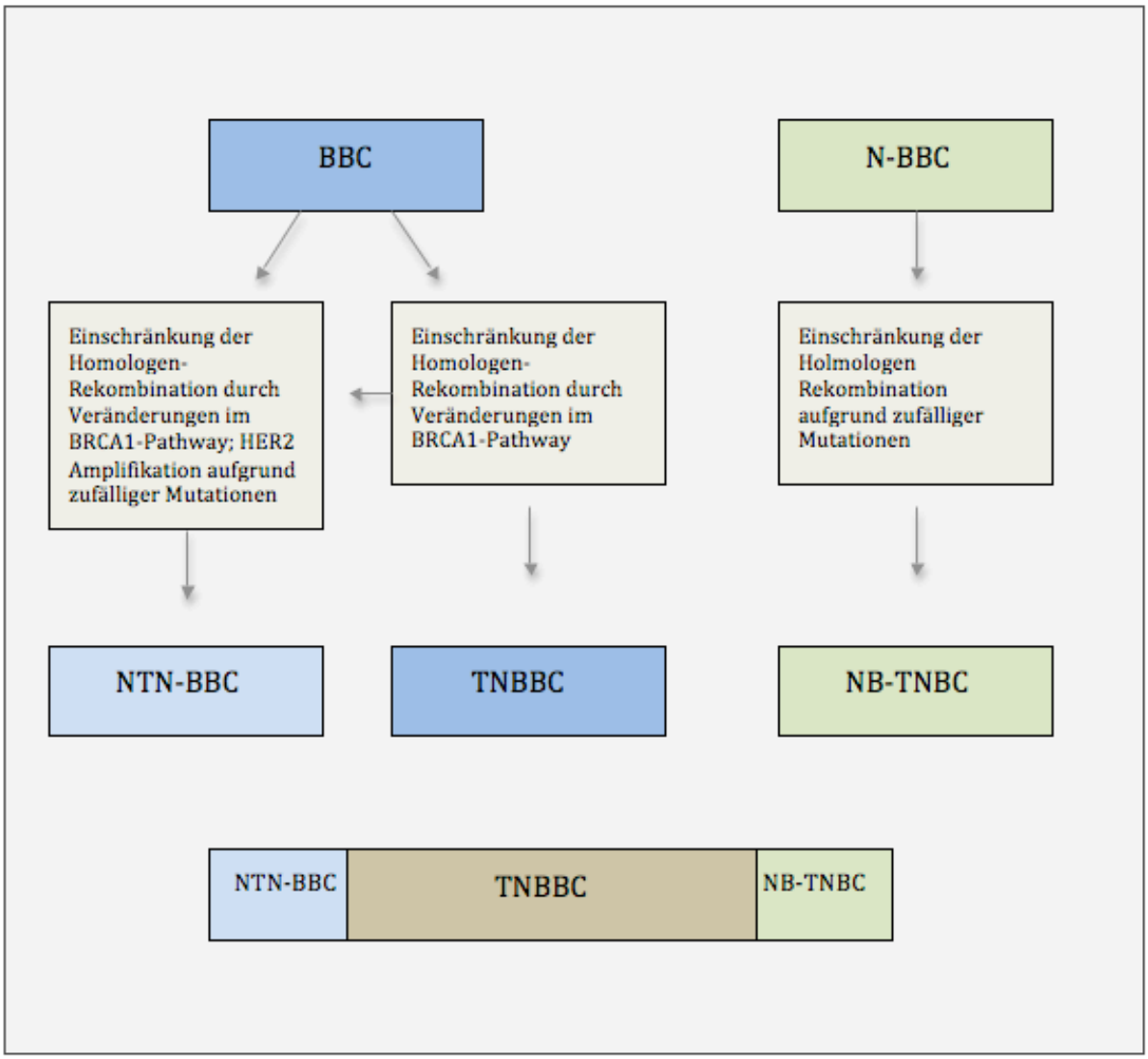


Abbildung 3: Darstellung einer möglichen Verbindung der beiden Subtypen in Anlehnung an die von de Ruijter et al. ausgearbeitete Darstellung. Folgende Abkürzungen werden verwandt: BBC= basale Brustkrebs; TNBBC = tripel-negative Brustkrebs vom basalen Subtyp, NB-TNBC= nicht-basale aber tripel-negative Brustkrebs (de Ruijter, Veeck et al. 2011)

Zudem geht man davon aus, dass der basale intrinische Subtyp aus wenig differenzierten Vorläufer-Stammzellen der myoepithelialen Zellen hervorgeht (Dairkee, Puett et al. 1988, Sarrió, Rodriguez-Pinilla et al. 2008) und so charakteristische Merkmale dieser Zellpopulation aufweist. Durch Expressionsanalysen, die mehr als 1000 Gene untersuchten, konnte ein spezifisches Expressionsmuster für das basale Cluster zusammengesetzt werden (Perou, Sørlie et al. 2000). Von besonderer Bedeutung sind dabei die Expression der basalen Cytokeratine CK5, CK6 und CK14 sowie die des Wachstumsfaktorrezeptors EGFR (HER1), des Tyrosinkinase-Rezeptors C-kit, des Vimentin sowie einiger weiterer basaler Marker (Sorlie, Tibshirani et al. 2003, Nielsen, Hsu et al. 2004). Bei Tumoren des basalen Subtyps liegen häufig Mutationen des Tumorsuppressors p53 vor. Zudem zeigen sich Zeichen der genomischen Instabilität, wie zum Beispiel die Häufung von Kopienzahlveränderungen (Perou, Sørlie et al. 2000, Hu, Stern et al. 2009). Die genaue Klassifizierung der beiden Subtypen ist vor allem für die prognostische Bewertung und im Hinblick auf neue therapeutische Ansätze von Relevanz. Tripel-negative Tumore, die auch einen basalen Phänoptyp aufweisen, haben eine schlechtere Prognose als die des tripel-negativen, jedoch nicht basalen Phänotyps (Sørlie, Perou et al. 2001, Rouzier, Perou et al. 2005). Es zeigt sich sogar, dass tripel-negative Tumore, die kein basales Expressionsmuster zeigen (NB-TNBC), eine bessere Prognose trotz geringeren Ansprechens auf adjuvante Chemotherapie aufweisen (Rouzier, Perou et al. 2005). Da jedoch in der aktuellen Literatur sowie den klinischen und molekularbiologischen Studien nicht immer exakt zwischen den beiden Klassifikationen unterschieden wird oder Ergebnisse nur zu einem Typ vorliegen, sollen im weiteren Verlauf dieser Dissertation beide Varianten mit einbezogen, jedoch immer ausdrücklich benannt werden.

1.2.3 Epidemiologie und Risikofaktoren des TNBC

Ungefähr 10%-17% der klinisch klassifizierten Mammakarzinome sind dem tripel-negativen Subtyp zuzuordnen. Das mittlere Erkrankungsalter dieses Subtyps liegt bei 57 Jahren. Patientinnen, die an einem tripel-negativen Mammakarzinom erkranken, sind somit jünger und befinden sich deutlich häufiger in der prämenopausalen Lebensphase als Patientinnen, die an hormonrezeptor-positiven Subtypen erkranken (Carey, Perou et al. 2006). Für das tripel-negative Mammakarzinom besteht ein spezielles Risikoprofil, das sich von dem anderer Brustkrebstypen unterscheidet. Auswertungen der Carolina Breast Cancer-Studie konnten zeigen, dass häufiger Frauen afroamerikanischer Abstammung vom tripel-negativen Mammakarzinom betroffen sind (Carey, Perou et al. 2006, Bauer, Brown et al. 2007). Der

Einfluss endogen hormoneller Faktoren (früh einsetzende Menarche und ein spätes Klimakterium) ist sowohl für die Entstehung des hormonrezeptor-positiven als auch für die Entwicklung des tripel-negativen Mammakarzinoms von Bedeutung. Im Gegensatz zu den hormonrezeptor-positiven Mammakarzinomen wirkt sich jedoch eine hohe Anzahl von ausgetragenen Schwangerschaften und ein junges Alter bei Erstschwangerschaft negativ auf das Risikoprofil aus (Yang, Pfeiffer et al. 2007, Yang, Sherman et al. 2007, Millikan, Newman et al. 2008, R. Kreienberg 2008). Die protektive Wirkung des Stillens wird zum Teil widersprüchlich gerade für hormonrezeptor-positive Mammakarzinome diskutiert. Ein Effekt könnte erst ab einer recht hohen Anzahl von gestillten Kindern auftreten. Für das tripel-negative Mammakarzinom konnte jedoch belegt werden, dass sich lange Stillperioden sowie die Anzahl der gestillten Kinder positiv auf das Risikoprofil auswirken (Yang, Sherman et al. 2007). Eine medikamentöse Unterdrückung der Laktation sowie ein erhöhter Taille-Hüfte Umfang (waist-hipp-ratio) erhöhen hingegen das Risko an triple-negativen Brustkrebs zu erkranken. Weitere Risikofakoren sind die Einnahme von oralen Kontrazeptiva (Dolle, Daling et al. 2009), ein geringer sozioökonomischer Status und das Vorliegen eines metabolischen Syndroms (Maiti, Kundranda et al. 2010).

1.2.4 Histologische und molekularbiologische Eigenschaften des TNBC

Tumore des tripel-negativen Subtyps zeigen zumeist ein charakteristisches histologisches Muster. Überdurchschnittlich häufig, in bis zu 90% der Fälle, treten wenig differenzierte high-grade Tumore (G3) vom invasiv ductalen Typ auf (Lakhani, Reis-Filho et al. 2005, Fulford, Easton et al. 2006). Zudem kommen sowohl die medulläre als auch metaplastischen histologischen Subtypen häufig in der Gruppe der tripel-negativen Tumore vor (Rakha, Putti et al. 2006). Es zeigen sich vermehrt Nekrosen, lymphozytäre Infiltrationen des umgebenden Gewebes, sowie invasives nicht infiltratives Wachstum und hohe Mitoseraten (Jones, Nonni et al. 2001, Foulkes, Brunet et al. 2004, Potemski, Kusinska et al. 2005, Fulford, Easton et al. 2006, Rakha, Putti et al. 2006). Auch Tumore, die im Speziellen dem basalen Subtyp zugeordnet sind, zeigen eine Entdifferenzierung (88%)(Bertucci, Finetti et al. 2008). Molekularbiologische Untersuchungen konnten zudem zeigen, dass die tripel-negativen Tumore ein sehr agressives Expressionsprofil aufweisen. Es zeigen sich eine geringe Expression von bcl-2, einem an der Apoptose beteiligten Protein und eine verstärkte Expression des Tumorsupressors p53 und des an der Regulation des Zellzyklus beteiligten Ki67(Foulkes, Brunet et al. 2004, Fulford, Easton et al. 2006).

1.2.5 Diagnostik des TNBC

Aufgrund des sehr aggressiven Wachstums manifestiert sich der TNBC häufig als sogenannter „Intervall-Krebs“ (Collett, Stefansson et al. 2005), das bedeutet, dass er zwischen zwei vorsorgenden Mammographieuntersuchungen diagnostiziert wird. Daher werden tripel-negative Tumore auch überdurchschnittlich häufig durch Tastuntersuchungen entdeckt. Zudem zeigt sich der TNBC meist unifocal und als große Läsion. Im MRT zeigen sich randständige Kontrastmittelanreicheungen und in der T2-Wichtung wird eine starke intratumorale Signalintensität beobachtet. Es besteht die Annahme, dass aufgrund der MRT-Daten eine prognostische Einschätzung über den Erfolg einer neoadjuvanten Therapie vorgenommen werden kann (Gluz, Liedtke et al. 2009).

1.2.6 Rezidivmuster und Metastasierung

Auch das Rezidivverhalten der tripel-negativen Tumore unterscheidet sich von dem anderer Mammakarzinome. Vor allem innerhalb der ersten drei Jahre werden beim tripel-negativen Brustkrebs Rezidive beobachtet. Dabei handelt es sich häufig um viszerale Metastasen und seltener um Lokalrezidive. Metastasen treten dabei vor allem in Weichteilorganen wie Lunge, Leber und auch dem Gehirn auf und auffällig seltener im Knochen, im Vergleich zu hormonrezeptor-positiven Tumoren. Bedeutend ist auch, dass nicht nur das Risiko eines Rezidivs erhöht ist, sondern auch das Risiko an diesem Rezidiv zu sterben (Mersin, Yildirim et al. 2008). Allerdings ist bemerkenswert, dass das Rezidivrisiko nach 5 Jahren unter dem von hormonrezptor-positiven Tumoren liegt (Carey 2011).

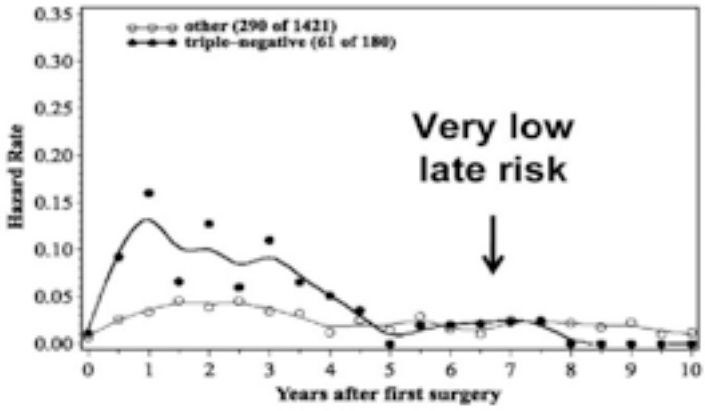


Abbildung 4: Rezidivverhalten der tripel-negativen Tumoren im Vergleich zu hormonrezeptor-positiven Tumoren. Deutlich zu sehen, ein erhöhtes Risiko innerhalb der ersten 5 Jahre für Patientinnen mit einem tripel-negativem Tumor im Vergleich zu anderen Subtypen. Dann, nach besagten Zeitraum Angleichung der Risiken zu erkennen. Die Abbildung entstammt der American Association for Cancer Research . (Carey 2011)

1.2.7 Prognose des TNBC

Patientinnen, die an einem tripel-negativen Mammakarzinom erkranken, haben eine signifikant schlechtere Prognose als Patientinnen hormonpositiver Subtypen (Nofech-Mozes, Trudeau et al. 2009). Die 4-Jahre Überlebensrate der an einem tripel-negativen Mammakarzinom erkrankten Frauen liegt bei 85,5% im Vergleich zu 94,2% bei Frauen mit nicht tripel-negativen Tumoren (Rhee, Han et al. 2008). Daher sind auch überproportional viele Sterbefälle und fortgeschrittene Erkrankungen auf die tripel-negativen Tumore zurückzuführen (Carey 2011). Ungefähr 25% aller Brustkrebs assoziierten Sterbefälle treten in der Gruppe der TNBC auf. Dabei stellt die Erkrankung an einem triple-negativen Tumor an sich einen unabhängigen Risikofaktor dar, der nicht mit dem Lymphknotenstatus, der Behandlung oder der Tumorgröße korreliert (Carey, Perou et al. 2006). Es werden sowohl beim tripel- negativen als auch beim basalen Subtyp häufig große Tumore mit einer Größe von über 2 cm mit geringgradiger Differenzierung gefunden. Paradoxerweise korreliert die Tumorgröße nicht positiv mit dem Lymphknotenbefall. Auch schon bei kleinen Tumoren kommen Lymphknotenmetastasen vor. Bei anderen Mammakarzinomen hingegen, lässt die Tumorgröße Rückschlüsse auf die Wahrscheinlichkeit der Lymphknotenmetastasierung zu. Es bestehen zudem Hinweise, dass die schlechte Prognose vor allem auf den Anteil an basalen Tumoren innerhalb der Gruppe der tripel-negativen Tumoren zurückzuführen ist (Sorlie, Tibshirani et al. 2003, Nielsen, Hsu et al. 2004, Carey, Perou et al. 2006). Dies wird auch durch nachstehende Grafik vermittelt.

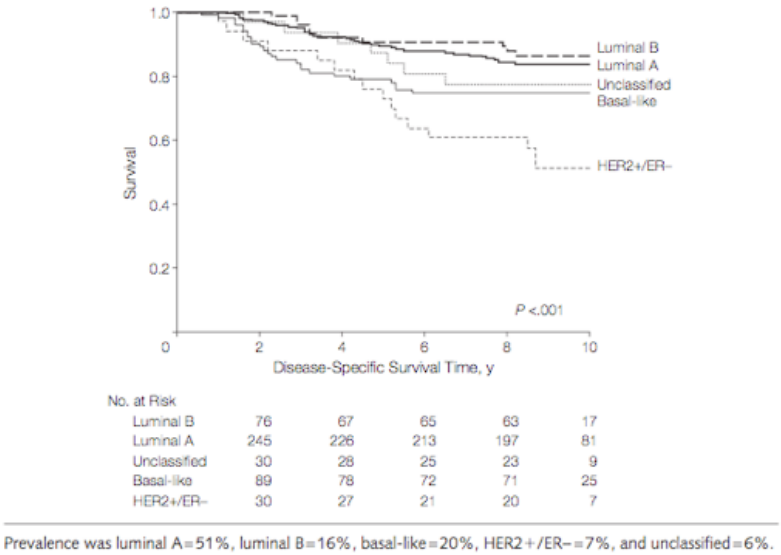


Abbildung 5: Überlebenskurven der fünf intrinischen Subtypen, im Rahmen der Carolina Breast Cancer Study. Gruppierung anhand der immunhistochemisch bestimmten intrinischen Subtypen. Hierbei erkennt man einen deutlichen Überlebensnachteil für Patientinnen mit einem negativen Hormonrezeptorstatus (Carey, Perou et al. 2006).

Neben dem basalen Subtyp zeigte auch ein weiteres östrogenrezeptor-negatives Mammakarzionom, der HER2-positive- Subtyp, einen prognostisch ungünstigen Verlauf. Jedoch besteht gerade für diese Gruppe im Gegensatz zu den tripel-negativen Tumoren eine gezielte und suffiziente Therapieoption mit dem HER2-Antikörper Trastuzumab, der die Prognose für betroffene Patientinnen deutlich verbessert. Zwar sprechen basale und tripel-negative Tumore grundsätzlich auf eine Therapie mit Chemotherapeutika an, das Rezidivrisiko bleibt für diese Frauen jedoch weiter erhöht. Frauen mit hormonrezeptor-positiven Tumoren weisen hingegen deutlich geringere Rezidivraten auf wie die nachstehende Grafik verdeutlicht.

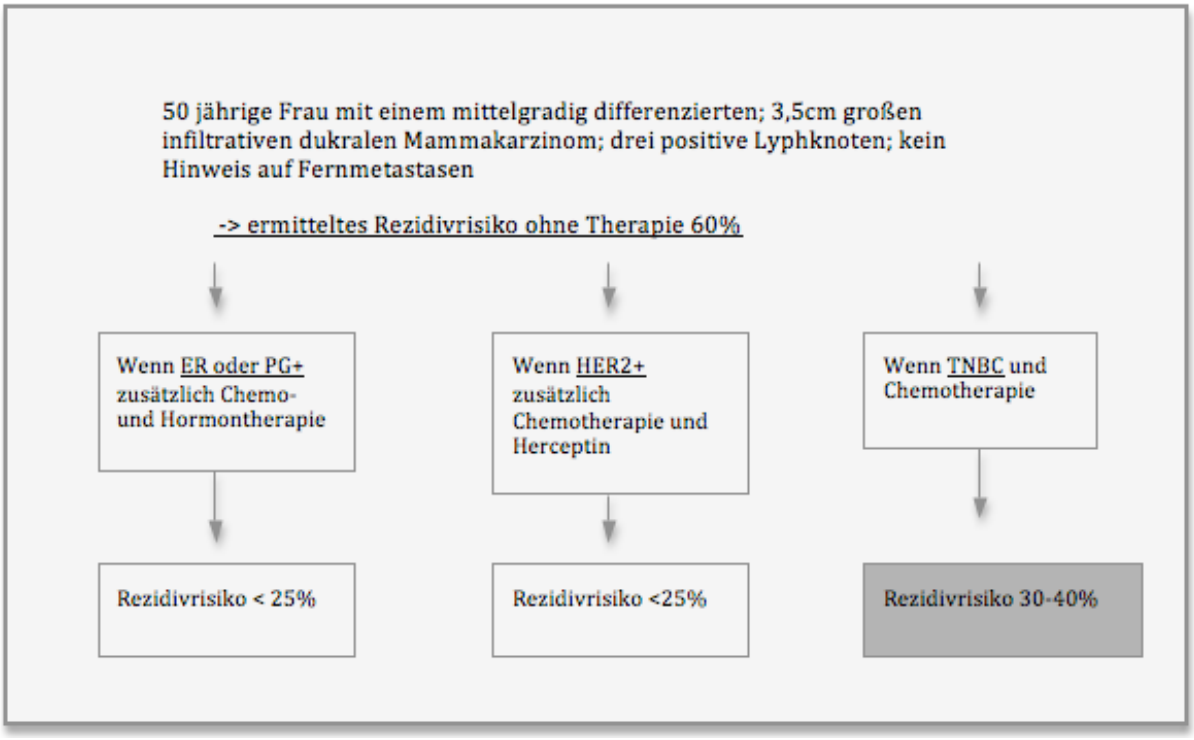


Abbildung 6: Rezidivrisiken nach adjuvanter Chemotherapie bei verschiedenen Subtypen im Vergleich, Abkürzungen; PG= Progesteron-Rezeptor positiv, EG= Östrogenrezeptor positiv, TNBC = tripel-negative Brustkrebs (Carey 2011)

1.2.8 Therapie des TNBC

Obwohl sich der tripel-negative Brustkrebs vielfach von den anderen Brustkrebssubtypen unterscheidet, werden bei dessen Behandlung die gleichen konventionellen Therapieregime eingesetzt. Gezielte Therapieoptionen wie die antihormonelle Therapie oder der Einsatz des Antikörpers Trastuzumab sind aufgrund der fehlenden Rezeptoren wirkungslos. Die Prognose des tripel-negativen Brustkrebses ist schlecht. Daher besteht großes wissenschaftliches Interesse an einer Verbesserung der bestehenden und Erforschung neuer Therapiestrategien für das tripel-negative Mammakarzinom.

Zunächst steht, wenn möglich, die Exzision des Tumorbefunds im Vordergrund. Bei brusterhaltender Operationstechnik wird wie bei allen Brustkrebssubtypen eine adjuvante Bestrahlung angeschlossen. Dabei werden die gesamte restliche Brust und die Thoraxwand mit insgesamt 50 Gy bestrahlt, wobei 5 mal pro Woche 1,8-2,0 Gy appliziert werden, bis die vollständige Dosis erreicht ist (Clarke, Collins et al. 2005). Eine zusätzliche Boost-Bestrahlung mit 16 Gy ist möglich (Antonini, Jones et al. 2007). Auch nach durchgeführter Mastektomie und bei hohem Lokalrezidivrisiko (T3/T4, N+, keine R0 Resektion) sollte eine adjuvante Bestrahlung der Brustwand durchgeführt werden (Clarke, Collins et al. 2005, Gebski, Lagleva et al. 2006, Shafiq, Delaney et al. 2007).

Anhand des ermittelten Risikoprofils, das für tripel-negative-Tumoren als hoch einzuschätzen ist, wird gemäß dem St. Gallenkonsensus eine adjuvante oder neoadjuvante Polychemotherapie durchgeführt. Es hat sich gezeigt, dass tripel-negative Tumore gut auf Therapieschemata ansprechen, die Anthrazykline und/oder Taxane enthalten (Rouzier, Perou et al. 2005, Carey, Dees et al. 2007, Wang, Yang et al. 2009). Zum Einsatz kommen z.B. Regime wie FEC oder EC. Bemerkenswerterweise zeigt sich, dass es gerade im neoadjuvanten Setting übermäßig häufig zu kompletten pathologischen Remissionen (cPR) bei den tripel-negativen Tumoren kommen kann (Liedtke, Mazouni et al. 2008). Patienten, die nach neoadjuvanter Therapie ein komplettes pathologisches Ansprechen zeigen, haben ungeachtet des Subtyps eine sehr gute Prognose. Für Therapieversagen ist die Prognose weiterhin schlecht. Insgesamt jedoch zeigt sich bei TNBC ein kürzeres Gesamtüberleben und rezidivfreies Intervall als bei den hormonrezeptor-positven Subtypen. Man spricht daher von dem tripel-neagtiven Paradoxon, auf das im Rahmen der Diskussion gezielt eingegangen werden soll.

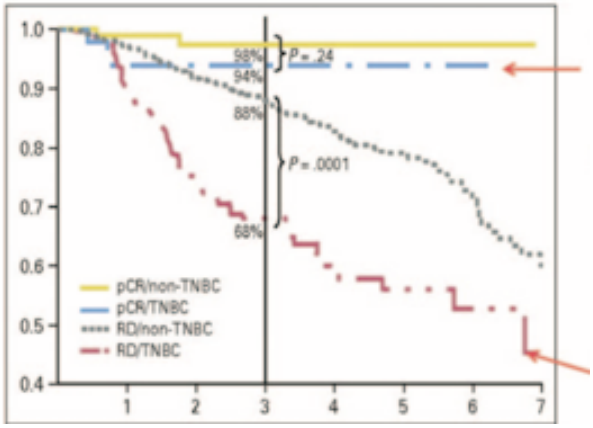
Gängige Chemotherapieregime in der Behandlung des Mammakarzinoms:

FEC: 5-Fluoruracil, Epirubicin, Cyclophophamid

EC: Epirubicin, Cyclophophamid

CMF: Cyclophosphamid, Methotrexat, 5-Fluoouracil

Taxane: Paclitaxel oder Docetaxel auch als Monotherapie bei Lymphknotenbefall



TNBC/basal-like, wenn komplette pathologische Remissionsrate erreicht wird, deutlich verlängertes Überleben

TNBC/basal-like, wenn kein Ansprechen deutlich reduziertes Überleben im Vergleich zu nicht-TNBC

(Carey 2011)

Abbildung 7: Ansprechen der tripel-negativen/basalen Tumoren nach neoadjuvanter Chemotherapie im Vergleich zu den nicht tripel-negativen Tumoren. Die Abbildung wurde dem J Clin Oncol 2008;26:1275-1281 entnommen.

In den letzten Jahren wurden auf Grund der schlechten Prognose des tripel-negativen Mammakarzinoms neue Therapieoptionen erprobt und sind Gegenstand klinischer Studien. Neue Optionen zur Verbesserung der Therapiestrategien für das tripel-negative Mammakarzinom sollen im Folgenden kurz dargestellt, im Rahmen der Diskussion jedoch weiter ausgeführt werden.

- **Platinhaltige Chemotherapieregime**

  Carboplatin und Cisplatin sind DNA-interkalierende Substanzen, die direkt an die DNA binden können und so Doppelstrangbrüche verursachen (Kelland 2007).
- **EGFR-Inhibitoren**

  Ungefähr 60% der TNBC zeigen eine vermehrte EGFR Expression (Nielsen, Hsu et al. 2004). Der EGFR-Rezeptor ist zudem Teil des basalen Clusters und scheint unter anderem verantwortlich für eine schlechtere Prognose (Miller, Wang et al. 2007). Es liegt daher nahe, den EGF-Rezeptor als gezielten Angriffspunkt für therapeutische Strategien auszunutzen. Derzeit wird in präklinischen Studien der monoklonale Antikörper Cetuximab, der gegen den EGF-Rezeptor gerichtet ist, getestet. Es scheint sich jedoch zu bestätigen, dass die Antikörper vor allem in Kombination mit Chemotherapeutika wie Carbolatin das „Outcome“ verbessern können (Carey, Rugo et al. 2012).
- **Angiogenese-Hemmer**

  Die Hemmung der Angiogenese zielt darauf ab, die Blutversorgung des Tumors einzudämmen. Aktuell wird in präklinischen Studien die Wirksamkeit des monoklonalen Antikörpers Bevacizumab getestet, der gegen den VEGF gerichtet ist (Miller, Wang et al. 2007).
- **Antitubulin-Agenzien**

  Die Antitubulin-Agenzien wie Ixabepilone bewirken eine Stabilisierung der Mikrotubuli, wodurch Zellzyklusarest und Apoptose eingeleitet werden. Vor allem Tumore des basalen Phänotyps zeigen eine erhöhte Expression von beta-Tubulin(Horak, Pusztai et al. 2013).
- **PARP-Inhibitoren**

  Die neue Substanzgruppe der PARP-Inhibbitoren kommt gezielt bei Zellen mit insuffizienter DNA Doppelstrang-Reparatur zum Einsatz.

1.3 Das familiäre Mammakarzinom

1.3.1 Epidemiologie des familiären Mammakarzinoms

Jährlich erkranken ungefähr 60.000 Frauen an einem Mammakarzinom, wobei bei 20% der Betroffenen eine familiäre Häufung von Karzinomfällen nachzuvollziehen ist (Meindl, Ditsch et al. 4/2011). Ungefähr 5% aller Mammakarzinome sind monogen-vererbten Ursprungs, das heißt sie sind auf Grund eines einzelnen Gendefekts entstanden (R. Kreienberg 2008, van der Groep, van der Wall et al. 2011). Dabei sind vor allem Mutationen der Tumorsupressorgene BRCA1 und BRCA2 ursächlich. Träger einer Keimbahnmutation dieser beiden Gene haben ein Lebenszeitrisiko von 80-90% an Brustkrebs zu erkranken (Kiechle 2007), wobei 60% der betroffenen bereits vor dem 60. Lebensjahr Brustkrebs entwickeln (Meindl, Ditsch et al. 4/2011). Auch das Lebenszeit-Risiko der Mutationsträgerinnen für die Entwicklung von malignen Neoplasien der Ovarien ist mit 20-50% deutlich erhöht. Keimbahnmutationen der BRCA1- und BRCA2-Gene werden durch einen autosomal-dominanten, monogenen Erbgang mit unvollständiger Penetranz weitergegeben. Die vererbte Kopie des mutierten Allels stellt also eine Prädisposition dar. Die Inaktivierung des zweiten intakten Allels in der somatischen Brustzelle führt schließlich analog der Knudsonschen Hypothese zur Ausbildung eines malignen Phänotyps (Meindl, Ditsch et al. 4/2011).

1.3.2 Genetische Beratung und Diagnostik

Unter diesen Aspekten ist die familiäre genetische Beratung zu einer wichtigen Säule der Diagnostik und Therapieplanung geworden. In Deutschland wird im Rahmen des Deutschen Konsortiums für Brust und Eierstockkrebs in 12 spezialisierten Zentren genetische Beratung und molekularbiologische Diagnostik für betroffene Familien angeboten. Anhand ausgearbeiteter S3-Leitlinien wird die Auswahl der sich für die genetische Testung qualifizierender Frauen und Männer nach folgenden Kriterien getroffen:

Kriterien zur Durchführung einer Genanalyse der Brustkrebsgene BRCA1 und BRCA2 bei einer Indexperson der Familie (S3-Leitlinie, 2008)

- mindestens zwei Familienangehörige an Brust- oder Eierstockkrebs erkrankt, davon mindestens eine Betroffene jünger als 51 Jahre bei der Erstdiagnose
- mindestens drei Angehörige mit Brustkrebs, unabhängig vom Alter bei Erstdiagnose
- eine Angehörige im Alter von 36 Jahren oder jünger an Brustkrebs erkrankt
- eine Angehörige mit beidseitigem Brustkrebs im Alter von 51 Jahren oder jünger
- Familie mit Brust- und Eierstockkrebs bei einer oder mehreren Angehörigen
- ein männlicher Verwandter mit Brustkrebs und eine Frau mit Brust- oder Eierstockkrebs

Abbildung 8: Kriterien zur Durchführung einer Genanalyse bei familiärer Belastung ausgearbeitet im Rahmen der (e.V 2012)

Als grundsätzliches Einschlusskriterium gilt nach den Vorgaben des Deutschen Konsortiums derzeit eine empirische Mutationswahrscheinlichkeit von 10%. Die folgende Übersicht zeigt die empirischen Wahrscheinlichkeiten für das Vorliegen von pathogenen Mutationen bei bestimmten familiären Konstellationen (Meindl, Ditsch et al. 4/2011).

Familiäre Konstellation und empirische Wahrscheinlichkeiten pathogener Mutationen in den BRCA-Genen (Anteil in Prozent der Indexpatientinnen mit Nachweis einer pathogenen Mutation in Abhängigkeit von der familiären Konstellation; Abweichungen: +/- 2%)	
Konstellationen	Empirische Mutationswahrscheinlichkeit
≥ 3 MaCa, davon 2 unter 51 J. kein OvCa, kein männliches MaCa	30,7%
≥ 3 MaCa, unabhängig vom Alter kein OvCa, kein männliches MaCa	22,4%
genau 2 MaCa, beide unter 51 J. kein OvCa, kein männliches MaCa	19,3%
genau 2 MaCa davon 1 unter 51 J. kein OvCa, kein männliches MaCa	9,2%
≥ 1 MaCa und ≥ 1 OvCa unabhängig vom Alter kein männliches MaCa	48,4%
2 oder mehr OvCa unabhängig vom Alter kein weibliches oder männliches MaCa	45,0%
1 MaCa unter 36 J. kein OvCa, kein männliches MaCa	10,1%
1 bilaterales MaCa, das erste unter 51 J. kein OvCa, kein männliches MaCa	24,8%
≥ 1 männliches MaCa und ≥ 1 weibliches MaCa oder OvCa	42,1%

Tabelle 2: Empirische Mutationswahrscheinlichkeiten- Deutsches Konsortium für familiären Brust- und Eierstockkrebs, (Meindl, Ditsch et al. 4/2011)

Unter Berücksichtigung der dargestellten Kriterien werden deutschlandweit bei ca. 25% der getesteten Familien kausale Mutationen gefunden (R. Kreienberg 2008). Bei 50% der ratsuchenden Familien kann eine hochpenetrante Mutation in den BRCA1/2-Genen ausgeschlossen werden. Für einen Teil der Betroffenen kommt es jedoch auch zu sogenannten nicht informativen Testresultaten, wenn zum Beispiel Varianten gefunden werden, deren kausale Bedeutung nicht bekannt ist. Darüber hinaus ist zu beachten, dass in einigen Bevölkerungsgruppen eine erhöhte Mutationsfrequenz vorliegt. So haben sich in der Bevölkerungsgruppe der Ashkenazi-Juden sogenannte Founder-Mutationen im Genpool angehäuft.

Eine genetische Assoziation bei Familien mit Häufungen von Brust- und Eierstockkrebs sowie dem Vorkommen von „early onset“-Brustkrebs, bei denen keine Mutation in den BRCA-Genen nachgewiesen werden konnte, ist jedoch nicht auszuschließen. Daher spricht vieles für die Existenz weiterer Suszeptibilitätsgene, die in unterschiedlicher Penetranz die

Entstehung eines invasiven Karzinoms fördern (Ford, Easton et al. 1998). Neben den wichtigen Genorten BRCA1 und 2 konnten mittlerweile auch seltenere prädisponierende Genloci identifiziert werden, die zur Ausbildung von Brustkrebs führen können. Dabei handelt es sich um Risikogene mit unterschiedlicher Penetranz. Zu erwähnen sind hier das ATM-Ataxie-Telangiektasie Gen sowie das CHEK2-Gen (Kiechle 2007). Aber auch im Rahmen von genetischen Syndromen, mit denen ihnen zu Grunde liegenden spezifischen genetischen Fehlfunktionen ist das Risiko für die Entwicklung von Brutskrebs erhöht (Li-Fraumeni-Syndrom, Peutz-Jeghers-Syndrom, Cowden-Syndrom). Weitere Suszeptibilitätsgene unterschiedlicher Penetranz werden derzeit untersucht, wie z.B. RAD51C, PALB2, deren Funktion vor allem bei der DNA-Doppelstrangreparatur von Bedeutung ist (Akbari, Tonin et al. 2010, Wong, Nordfors et al. 2011). Auch polygene Vererbungsmuster sind auf dieser Grundlage denkbar. Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über verschiedenen Gene, die an der Entstehung von Brustkrebs beteiligt sein können.

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
Niedrigrisikogene	0,7 bis 1,5-fach	FGFR2, TOX3, MAP3K1, CAMK1D, SNRPB, FAM84B/c-MYC, COX11, LSP1, CASP8, ESR1, ANKLE1, MERIT40 etc.

Tabelle 3: Risikomodifizierende Brustkrebsgene;(Meindl, Ditsch et al. 4/2011)

Von Bedeutung sind die Resultate genetischer Diagnostik für weitere Therapieplanung und Prävention. So kann Mutationsträgerinnen eine kontralaterale Mastektomie oder die Ovarektomie angeboten werden und eine Intensivierung der Früherkennungsuntersuchungen auch für diese Familien angeboten werden.

1.3.3 BRCA1-Tumorsupressorgen

Das BRCA1-Gen (Breast cancer susceptibility gene 1) wurde erstmals in den neunziger Jahren auf dem Chromosom 17q21 lokalisiert und mit der Entstehung von Brustkrebs in seiner Funktion als Tumorsupressorgen in Verbindung gebracht (van der Groep, van der Wall et al. 2011). Das Gen umfasst 24 Exone und ist 100kb lang (Miki, Swensen et al. 1994). Exon1 stellt eine nichtcodierende Region dar, wohingegen das Exon 11 ungewöhnlich groß ist und 62% der codierenden Information enthält. Das Gen verfügt über eine Progesteron-Rezeptorbindesequenz, jedoch keine vollständige Östrogen-Rezeptorbindesequenz (Smith, Lee et al. 1996).

Bei dem Genprodukt handelt es sich um ein sehr großes Protein, wobei das 7,8kb große Transkript in allen proliferierenden Geweben exprimiert wird. Die stärkste Expression wird dabei in der späten G1 und in der S-Phase beobachtet (Rajan, Wang et al. 1996). Das aus 1863 Aminosäuren bestehende Protein weist eine charakteristische dreidimensionale Strukur und Sequenzmotive auf, welche Voraussetzung für die vielfältigen Interaktionen des Moleküls im Zellzyklus sind (van der Groep, van der Wall et al. 2011).

Im N-terminalen Bereich des Proteins befindet sich eine Zink-bindendes RING-Finger-Motiv sowie ein sogenanntes nukleäres Exportsignal. C-terminal verfügt das Gen über zwei BRCA1-C-terminale Domänen (BRCT), welche als Transkriptionsfaktoren dienen. Zudem exsistieren zahlreiche weitere Domänen, die für die Interaktion mit weiteren Proteinen von Bedeutung sind und die vielfältigen Funktionen des Moleküls, wie z.B. die Zellzykluskontrolle, die Transkription und die DNA-Reperatur in den Kontext stellen. Von besonderer Bedeutung sind hierbei die Funktionen im Rahmen der DNA Doppel- und Einzelstrangreparatur.

Funktion und Interaktionen von BRCA1 im Rahmen der DNA-Reparatur

Die Rolle des BRCA1-Gens bei der Entstehung des hereditären Brustkrebs wird vorallem im Zusammenhang mit seiner Funktion als Tumorsupressorgen und aufgrund seiner Aufgaben bei der DNA-Reparatur gesehen. Hier übernimmt das BRCA1-Protein sowohl regulatorische Funktionen als auch eine direkte Rolle bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen mittels Homologer Rekombination (HR) sowie nicht-homologer End-zu-End-Reparatur (NHEJ). Die beiden Wege der Doppelstrangreparatur unterscheiden sich dabei in ihrer Genauigkeit. Während bei der Homologen Rekombination Schwesterchromatide als Matritze dienen,

werden bei der weniger korrekten Form der NHEJ lediglich die Enden der beschädigten DNA zusammengeführt und ligiert, was überweigend in den frühen Phasen des Zellzyklus stattfindet (G0,G1, und frühe S1-Phase). Bei der Homologen Rekombination, welche vorallem in der S- und G2-Phase erfolgt, werden im Bereich der geschädigten DNA die Stränge durch Endonukleasen gekappt, sodass überlappende Enden am 3'Ende entstehen. Diese werden durch Nukleoproteinfilamente derart in räumliche Beziehung (Loop-Struktur) zu dem als Matritze dienenden Schwesterchromatid gebracht, dass DNA-Polymerasen anhand des Templates den Strang auffüllen können (Hoeijmakers 2001). Die für diesen Prozess notwendigen Interaktionen und die Funktion des BRCA1-Proteins in diesem Kontext sollen kurz skizziert werden.

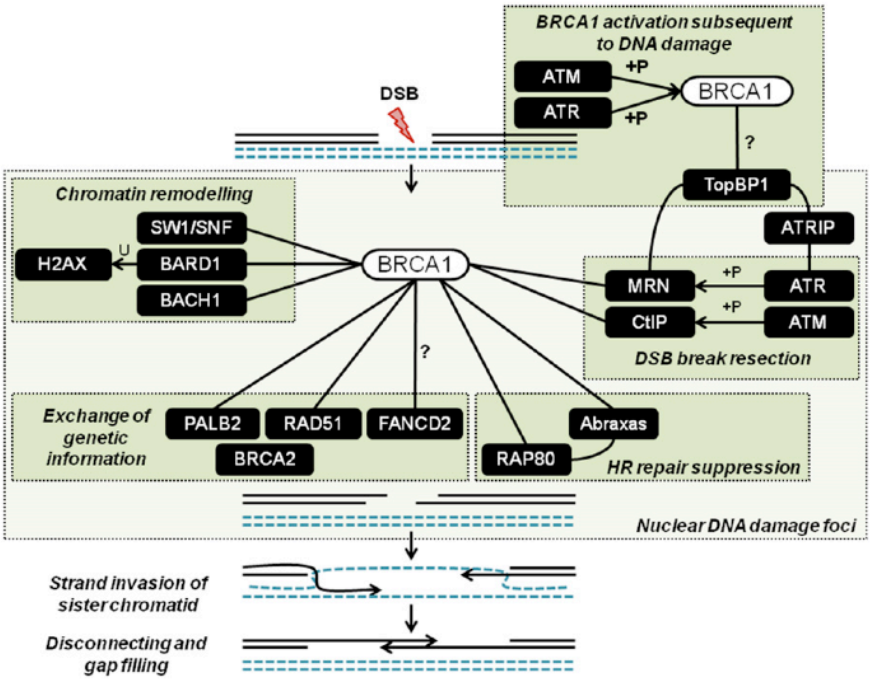


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Funktion des BRCA1 im Kontext der DNA-Reparatur. Erläuterung der Grafik im untenstehenden Fließtext (Caestecker and Van de Walle 2013)

Tritt ein Doppelstrangbruch auf, so führt dies zu einer Aktivierung der Proteinkinasen ATM (ataxia telangiectasia mutated) und ATR (ataxia telangiectassia mutated rad3-related Protein) welche ihrerseits durch Phosphorylierung weiterer Proteine zur Rekrutierung von BRCA1 führen und Einfluss auf den Ablauf des Zellzyklus nehmen. Im weiteren Verlauf der DNA-Reparatur treten zahlreiche weitere Moleküle mit dem BRCA1-Protein in Interaktion, was in obenstehendem Schaubild von Caestecker et al. skizziert wird. Zu nennen ist hier das Topoisomerase IIB binding Protein 1 (TopBP1) welches einerseit zur Aktivierung des ATR (ataxia telangiectassia mutated rad3-related Protein) beiträgt, andererseits an der Vermittlung

zwischen dem ATR und dem MRN-Komplex (Mre11-RAD50-NSB1) beteiligt ist. Neben den aktivierenden Signalwegen sind auch solche der Suppression der Homologen Rekombination zu nennen, an denen unter anderem die Proteine Abraxas und RAP80 beteiligt sind. Voraussetzung für eine suffiziente DNA-Reparatur ist zudem die Zugänglichkeit der DNA für den Reparaturapparat, welche durch das sogenannte Chromatinremodeling erreicht wird. Von Bedeutung ist hier unter anderem das Zusammenspiel der C-terminalen Region des BRCA1 mit dem BARD1 (BRCA1-associated RING domain), welche in ihren Funktionen als Ubiquitin-E3-Ligasen zur Ubiquitinylierung anderer, an der DNA-Reparatur beteiligter Proteine führen. Zu nennen sind hier das CtIP (CtBP interacting protein), welches durch Chromatinbindung Funktion in der Checkpoint-Kontrolle übernimmt oder das H2AX, welches in seiner ubiquitinylierten Form zu Chromatinveränderungen führt und somit die Zugänglichkeit der Reparaturproteine zur DNA ermöglicht (Wu, Wang et al. 1996). Ebenfalls beteiligt am Remodelling sind SW1/SNF sowie das Transkriptionsregulationsprotein BACH1. Einen weiteren wichtigen Partner stellt das PALB2 (Partner and localizer of BRCA2) dar, das durch Interaktion mit dem BRCA2 und der BRCT-Domäne des BRCA1 die direkte Verbindung der beiden Proteine herstellt. Es wird angenommen, dass PALB2 für die Kolokalisation von BRCA1 und BRCA2 sowie dem RAD51-Protein von Bedeutung ist (Caestecker and Van de Walle 2013).

Das Verständnis der genauen Struktur des Proteins und die daraus resultierenden Funktionen sind von wesentlicher Bedeutung für den Effekt auftretender Mutationen dieses Gens. Gerade im Hinblick auf die Funktion des BRCA1 im Rahmen der Doppelstrangreparatur ergeben sich Anhaltspunkte für mögliche künftige Therapieoptionen, auf die im Folgenden eingegangen wird.

Derzeit sind 1639 bekannte pathogene BRCA1-Mutationen und 1853 Polymorphismen ohne Krankheitswert in der BIC – Datenbank (Breast Cancer Information Core) registriert(Institute 2013).

1.3.4 Klinik und Histopathologie des BRCA1-assoziierten Mammakarzinoms

BRCA1-assoziierte Tumorerkrankungen entwickeln sich entsprechend der genetischen Prädisposition häufig schon bei jungen Frauen. Eine Besonderheit des BRCA1- assoziierten Mammakarzinoms besteht in seiner häufig typischen histopathologischen und immunhistochemischen Ausprägung (R. Kreienberg 2008). Die meisten BRCA1-assozierten Mammakarzinome zeigen in der Mehrheit einen tripel-negativen Phänotyp, der basale

Expressionsmuster aufweist. Es handelt sich zudem häufig um invasiv wachsende Tumore, die unter anderem auch medulläre Wachstumsmuster zeigen können und immer einen hohen Grad der Entdifferenzierung aufweisen (Lakhani, Reis-Filho et al. 2005). Zudem zeigt sich wie bei den tripel-negativen Tumoren ein typisches Rezidivmuster innerhalb der ersten drei Jahre nach Diagnosestellung und eine schwache Korrelation von Tumorgröße und einem positiven Lymphknotenstatus (Meindl, Ditsch et al. 4/2011) (Dent, Trudeau et al. 2007), wohingegen das BRCA2-assoziierte Karzinom keinen spezifischen Phänotyp aufweist.

1.3.5 Therapie des BRAC1-assoziierten Mammakarzinoms

Neben den bereits erwähnten operativen Maßnahmen wie der prophylaktischen beidseitigen oder kontralateralen Mastektomie und der Salpingo-Oopheroektomie können BRCA1-assoziierte Tumore sowohl im neoadjuvanten als auch adjuvanten Setting mit Chemotherapeutika behandelt werden. Es gibt Anhaltspunkte dafür, dass bestimmte Optionen aufgrund der bestehenden BRCA1-Insuffizienz und der somit verminderten Potenz der Doppelstrangreparatur besonders wirksam sind. Studien konnten eine erhöhte Sensitivität gegenüber interkalierenden platinhaltigen Zytotoxika belegen (Byrski, Gronwald et al. 2010), wohingegen eine verminderte Wirksamkeit der Spindelgifte wie Taxanen und Vincaalkaloiden gezeigt werden konnte (Lafarge, Sylvain et al. 2001). Zudem wurde erstmals bei BRCA-assoziierten Tumoren der Einsatz der neuen Substanzgruppe der PARP-Inhibitoren erprobt.

1.3.6 PARP (Poly(ADP-Ribose) Polymerase)-Inhibitoren

Zu der Gruppe der PARP-Proteine gehören bisher 18 bekannte Proteine unterschiedlichster Funktion mit wichtigen Aufgaben innerhalb des Zellzyklus, welche durch die Ribosylierung von Histonen und anderen nukleären Proteinen umgesetzt werden. Einer der wichtigsten Vertreter dieser Gruppe ist das PARP1-Gen, welches für ein chromatinassoziiertes Proteine codiert, das viele nukleäre Proteine beeinflusst (Anders, Winer et al. 2010). PARP1 ist von essenzieller Bedeutung für die Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen mit Hilfe der Basenexzisionsreparatur (Dantzer, de La Rubia et al. 2000, Carey, Dees et al. 2007). Wird nun PARP1 gehemmt, so kommt es zur Anhäufung von DNA-Einzelstrangbrüchen und somit in der Replikation zur Ausbildung von Doppelstrangbrüchen (Anders, Winer et al. 2010). In einer intakten Zelle sind BRCA1 und 2 für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen mittels homologer Rekombination verantwortlich, wofür eine korrekte Kopiervorlage, ein sogenanntes „Template“ benötigt wird. Bei BRCA1 defizienten Zellen jedoch können die DNA Schäden nun nicht mehr repariert werden, das Genom wird instabil und die Zelle leitet

die Apoptose ein (de Ruijter, Veeck et al. 2011). Dieses Phänomen wird als synthetische Letalität bezeichnet. Derzeit laufen zahlreiche Studien, um diese Theorie der induzierbaren synthetischen Letaliät für BRCA-assoziierte Tumore auch bei tripel-negativen Karzinome zu verifizieren, auf die im Rahmen der Disskussion genauer eingegangen werden soll.

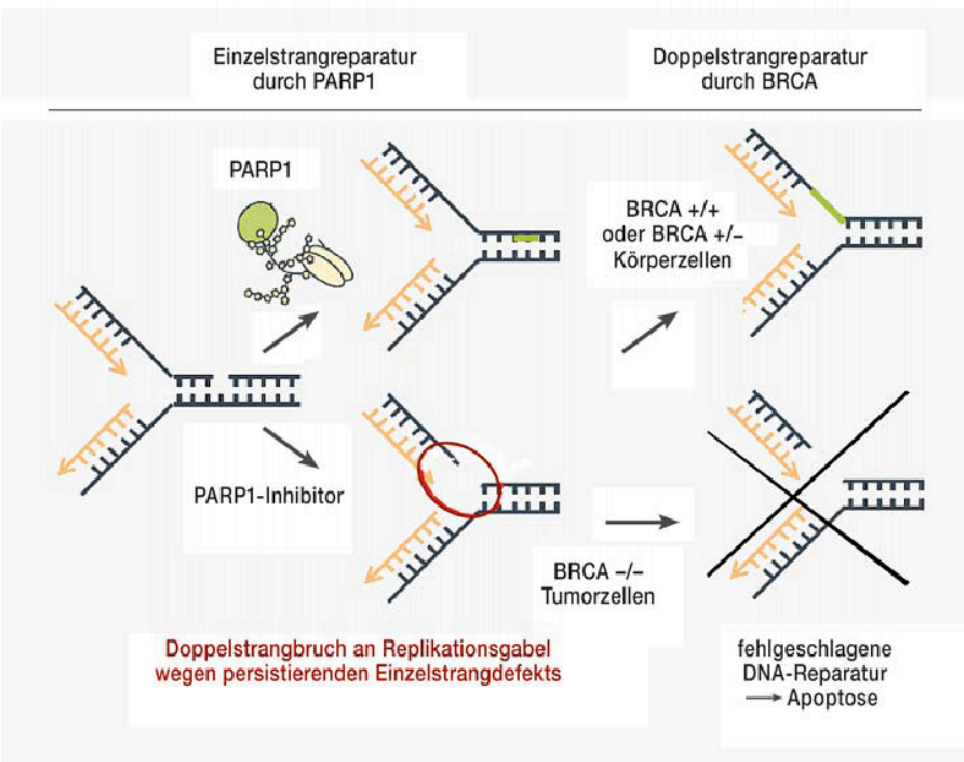


Abbildung 10: PARP- Inhibitoren –Wirkungsweise (Meindl, Ditsch et al. 4/2011)

1.4 BRCA1 und TNBC

BRCA1-assoziierte und tripel-negative Tumore weisen relevante Gemeinsamkeiten in ihrer klinischen und histologischen sowie ihrer molekularbiologischen Präsentation auf. Gemeinsam ist ihnen das frühe Erkrankungsalter, der hohe Grad der Entdifferenzierung sowie Zeichen der genetischen Instabiliät (häufig p53-Mutationen). Zudem zeigen sich ähnliche Ansprechraten auf gleiche Therapiestrategien (platinhaltige Chemotherapeutika, Antrazykline und Taxane). Darüberhinaus bestätigen auch Genexpressionsstudien die Ähnlichkeiten zwischen TNBC und den BRCA1-assoziierten Tumoren. Aufgrund dieser Ähnlichkeiten wurde der Begriff des BRCAness-Phänotyps der tripel- negativen Tumore geprägt (Turner, Tutt et al. 2004).

Gemeinsame Eigenschaften von BRCA-assoziierten und sporadischem tripel-negativem Brustkrebs (BRCAness)
• Hochgradige Entdifferenzierung
• ER- und HER2-
• Amplifikation von c-myc
• Medullär
• Verdrängendes Wachstum- „pushing margins“
• Weniger häufig DCIS
• Lymphozytäre Infiltrate
• TP53 Mutationen
• Basaler Phänotyp
• EGFR- Expression
• Muster der X-chromosomalen Inaktivierung
• Sensitiv für DNA-zerstörende Substanzen

Tabelle 4: In Anlehnung an den von Turner et al. erstmals geprägten Begriff des „BRCAness" Subtyp; (Turner, Tutt et al. 2004, Carey 2011)

Dass eine Verbindung dieser beiden Entitäten besteht, zeigt sich zunächst vor allem darin, dass die Mehrheit der BRCA1-assoziierten Tumore einen tripel-negativen oder basalen Phänotyp aufweist (Foulkes, Brunet et al. 2004, Lakhani, Reis-Filho et al. 2005). Die Mehrzahl der an einem tripel-negativen/basalen Karzinom erkrankten Frauen weisen jedoch im Umkehrschluss keine Mutationen im BRCA1-Gen auf und sporadische Mutationen im BRCA1-Gen sind selten (Turner, Tutt et al. 2004). Internationale Untersuchungen konnten

zeigen, dass ca. 10-20% der tripel-negativen Tumore eine BRCA1-Mutation aufweisen (Young, Pilarski et al. 2009, Gonzalez-Angulo, Timms et al. 2011). Nichts desto trotz wird bei der Entstehung der tripel-negativen Tumoren eine Beteiligung des BRCA1-Pathway diskutiert (de Ruijter, Veeck et al. 2011). Laut de Ruijter et al. besteht die Möglichkeit, dass es aufgrund einer Insuffizienz des BRCA-Pathways zur Entstehung des tripel-negativen basalen Phänotyps kommen könnte. Neben den Mutationen im klassischen Sinn könnten für eine Verminderung der BRCA1-Expression auch epigenetische Veränderungen von Bedeutung sein. Zudem wird die Beteiligung anderer Gene an der Regulation der BRCA-Expression dikutiert (ID4 negativ Regulator der BRCA Expression)(Richardson, Wang et al. 2006). Die Hypothese, dass ein Verlust der BRCA1 Funktion eine wichtige Rolle bei der Entstehung des TNBC spielt, wurde durch weitere Untersuchungen gestützt (Foulkes, Stefansson et al. 2003, Lakhani, Reis-Filho et al. 2005, Richardson, Wang et al. 2006, Diaz, Cryns et al. 2007). Vor allem der tripel-negative Brustkrebs, der ein basales Expressionsmuster zeigt, scheint davon betroffen zu sein (de Ruijter, Veeck et al. 2011). Aus dieser Hypothese ergibt sich vor allem ein neuartiger Ansatz für die Verbesserung der Therapie tripel-negativer Tumore. Hierbei stellt die BRCA-Insuffizienz die Voraussetzung für die Wirksamkeit von direkt DNA-zerstörender Chemotherapeutika oder von PARP-Inhibitoren dar. Von großem Interesse ist daher die tatsächliche BRCA1-Mutationsfrequenz im tripel-negativen Kollektiv innerhalb der deutschen Population.

2. Fragestellung

Wie aus der Einleitung hervorgeht, handelt es sich beim TNBC um eine spezielle Entität des Brustkrebses. Aufgrund der histologischen und molekularbiologischen Besonderheiten und der immer noch schlechten Prognose richtet sich das Interesse auf die Erforschung dieser Untergruppe. Ziel ist die Verbesserung der Therapie im Sinne der individualsierten Medizin. Da vor allem auch junge Patientinnen betroffen sind, ist eine Optimierung der Therapiestrategien von großer Bedeutung. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit der besseren Kategorisierung der heterogenen Gruppe des TNBC, um so für Therapie und Prognose solide Kriterien erarbeiten zu können. Da die Mehrzahl der BRCA1-assoziierten Tumore einen tripel-negativen/basalen Phänotyp aufweisz, stellt sich im Umkehrschluss die Frage, wie viele der TNBC-Fälle eine Mutation im BRCA1-Gen zeigen. Vorangegangene Untersuchungen ermittelten eine Mutationsfrequenz im tripel-negativen Kollektiv von 10-20% (Young, Pilarski et al. 2009, Gonzalez-Angulo, Timms et al. 2011). Das Ziel dieser Arbeit ist, die BRCA1-Mutationsfrequenz innerhalb eines deutschen tripel-negativen Kollektives zu ermitteln und zu untersuchen, ob der Mutationsstatus Einfluss auf die Prognose und den Therapieverlauf hat, um daraus Konsequenzen für mögliche Therapieoptionen abzuleiten. Zudem hätte eine Häufigkeit von >10% von BRCA1-Mutationen beim TNBC auch Bedeutung bezüglich einer Überarbeitung der Einschlusskriterien für die genetische Testung. Durch die Ermittlung des BRCA1-Status mittels genetischer und somatischer Testung könnten sich neue Ansatzpunkte für gezielte Therapiestrategien ergeben. So könnte eine mögliche Patientengruppe isoliert werden, die am meisten von einer Therapie mit der neuen Substanzgruppe der PARP-Inhibitoren profitiert, oder die aufgrund der BRCA1-Insuffizienz ein besseres Ansprechen auf klassische, direkt DNA-schädigende Chemotherapeutika, wie beispielsweise platinhaltige Substanzen, zeigt.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Chemikalien

In der folgenden Tabelle werden die verwendeten Chemikalien und Reagenzien, sowie deren Hersteller aufgeführt.

CHEMIKALIEN	HERSTELLER
Aqua ad iniectabila	Diaco, Triest, Italien
Borsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
DNA Molekular Weight Marker V	Rouch Diagnostics, Mannheim, Deutschland
dNTP Set 100mM Solution	Fermentas GmbH, Leon-Rot, Deutschland
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	Klinik-Apotheke
Ethanol 100%	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid 1mg/ml	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ficoll 400	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Orange G	Carl Roth + Co KG Karlsruhe, Deutschland
PeqGold Universal Agarose	PEQLAB Biotechnologie GmbH Erlangen, Deutschland
Titriplex® III (Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tris-Base	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Xylencyanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 5: Verwendete Chemikalien mit Herstellerangaben

3.1.2. Molekularbiologische Kits

Zur Durchführung der Realtime-PCR und der Sequenzierung wurden folgende Kits verwendet:

KIT	HERSTELLER
LightCycler®480 High Resolution Melting Master	Roche Applied Science, Mannheim
ABIPRISM® BigDye TERMINATOR v1.1.Cycle Sequenzing Kit	Applied Biosystems, Foster City USA
10xPCR Buffer GeneAmp®	Applied Biosystems, Foster City USA

Tabelle 6: Verwendete molekularbiologische Kits

3.1.3. Enzyme

Zur Durchführung der Polymerase-Kettenreaktionen, im Kontext verschiedener Reaktionsschemata, wurde das folgende Enzym verwendet:

ENZYM	HERSTELLER
AmpliTaq Gold® DNA Polymerase	Applied Biosystems, California, USA

Tabelle 7: Verwendetes Enzym

3.1.4. Lösungen, Puffer, für die Gel-Elektrophorese

Die folgende Auflistung zeigt die verwendeten und selbst hergestellten Lösungen.

Auftragspuffer

200mg Ficoll (25%), 10ml TE Puffer, Bromphenolblau, orange, grün, Verdünnung der Stammlösung mit TE Puffer auf 1:5.

Längenstandard

100µl DNA molcular weight Marker V, 150µl TE Puffer, 1800µl Auftragspuffer, Einfrieren der Aliquots bei -20°C.

10xTBE Puffer

510g Tris-Base, 275g Borsäure, 372gEDTA, pH 8,0 mit H2O auf 5000ml auffüllen

TE Puffer

10mM TRIS, 1mM EDTA, pH 7,4

50xTEA Puffer

242g Tris-Base, 57,1ml Essigsäure, 100ml EDTA pH 8,0 mit H_2O auf 1000ml auffüllen

Alkohol 77%

39ml Alkohol 100%, 50ml Aqua dest.

Elektrophoresegel

75g Agarose, 60ml TE Puffer, 15µl Ethidiumbromid

dNTP-Lösung

4µl dATP, 4µl dGTP, 4µl dCTP, 4µl dTTP, 186µl Wasser

3.1.5. WAVE® Transgenomic Pufferlösungen

Pufferlösung A

Wasser, Triethylammoniumacetat

Pufferlösung B

Wasser, Trietyhlammoniumacetat, Acetonitril

PufferlösungC

75% Acetonitril in Wasser

Pufferlösung D

8% Acetonitril in Wasser

3.1.6. Primer und Primerdesign

Für die Mutationsanalysen des BRCA1 Gens wurden M13-Primer der Firma Metabion international AG verwendet. Wobei für jedes Exon, ein spezielles Primerpaar verwendet wurde, das mit Hilfe der bereitgestellten Software bestellt und in Anlehnung an die von van der Stoep und Kollegen verwendeten Primer zusammengestelt wurde (van der Stoep, van Paridon et al. 2009). Die lyophilisierten Primer wurden nach Anweisung der Firma Metabion so gelöst, sodass 100pmol/µl als Stocklösung vorlagen. Die Primer wurden sowohl bei der

Schmelzkurvenanalyse als auch bei der Sequenzierung nach weiterer Verdünnung von 1:10 eingesetzt. Im Anhang finden sich die verwendeten Primer in einer tabellarischen Auflistung.

3.1.7. Verbrauchsmaterialien

MATERIAL	HERSTELLER
Falconröhrchen	Sarstedt AG&Co Deutschland Nümbrecht
LC®480 Multiwell Platte 96	Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland
LC®Sealing Folie	Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland
Microseal A Film	Biozym Scientific GmbH Deustchland Obendorf
Microtubes 1,5µl	Sarstedt AG&Co Deutschland Nümbrecht
Multiply®Pro Gefäß 0,5ml	Sarstedt AG&Co Deutschland Nümbrecht
MultiScreen®FilterPlates Millipore	Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland
PCR-Softstrips 0,2ml farblos	Biozym Scientific GmbH Deutschland Obendorf
Pipetten, Pipet lite Rainin (10µl, 100µl, 1000µl)	Mettler-Toledo GmbH, Deuschland Gießen
Pipettenspitzen (1000µl, 200µl, 100µl, 10µl) ungestopft, RNAse free	Sarstedt AG&Co Deutschland Nümbrecht
Pipettenspitzen (10µl, 200µl) gestopft	Biozym Scientific GmbH Deutschland Obendorf

Tabelle 8: Verbrauchsmaterial

3.1.8. Geräte

GERÄT	HERSTELLER
ABI PRISM Sequncer 3130xl Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Biofuge pico	Heraeus, Osterode, Deutschland
Feinwaage	Kern, Balingen Deutschland
Gel Dokumentationssystem UV solo	Biometra, Göttingen, Deutschland
Gelelektrophorese Apparatur Power Supply	Consort, Turnhout, Belgien
Light Cycler® 480 Roche	Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland
Multifuge 3L-R Thermo Scintific	Heraeus, Osterode, Deutschland
Nanodrop Spectralphotometer	Peqlab, Erlangen, Deustchland
PTC-200 Thermo Cycler	MJ Research, Massachusets USA
Vortex Mixer VM-300	Migge, Heidelberg, Deutschland
WAVE® DNA Fragment Analyse System	Transgenomic Limited,Hillington Park, UK

Tabelle 9: Geräteliste

3.1.9. Patientenkollektiv und Datenbank MACA

Bei dem ausgewählten Patientenkollektiv wurde auf die MACA Datenbank der Frauenklinik des Universitätsklinikum München Rechts der Isar zurückgegriffen. Es wurden Patientinnen, ausgewählt, die zwischen 1999-2009 an einem histopathologisch gesicherten tripel-negativen Mammakarzinom erkrankten. Dabei wurden die gängigen Kriterien der immunhistochemischen Diagnostik angewandt. Der Besatz der Tumorzelle mit Hormonrezteptoren wurde gemäß den Bewertungskriterien des St. Gallen- Konsensus 2005 durch das Pathologische Institut des Klinikums Rechts der Isar durchgeführt. Die Beurteilung der immunhistochemischen Anfärbung des Zellkerns mittels Peroxidase-markiertem Antikörper wurde dabei entsprechend dem Remmle Score von 0 bis 12 angegeben.

3.2. Methoden

3.2.1. Die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion stellt eine der wichtigsten molekularbiologischen Methoden dar. Erstmals wurde sie durch Kary Mullis 1983 ausgeführt und beschrieben (Mullis 1994). Das Prinzip beruht auf der quantitativen Vervielfältigung eines durch ein Primerpaar festgelegten DNA-Abschnitts mittels einer DNA-Polymerase. Diese exponentielle Vervielfältigung wird dabei *in vitro*, in einer festgelegten Anzahl von Zyklen durch spezifische Temperaturveränderungen ausgeführt.

Die für eine PCR wichtigen Komponenten werden im Folgenden aufgeführt:

- Die zu replizierende DNA, die den Abschnitt enthält, welcher vervielfältigt werden soll und als „Template“ bezeichnet wird.
- Jeweils ein Vorwärts- und ein Rückwärtsprimer der spezifisch und gegenläufig an die DNA Einzelstränge bindet und das zu vervielfältigende Template festlegt, sowie den Startpunkt für die DNA-Polymerase darstellt.
- Die DNA-Polymerase ist hitzestabil und hat ihr Temperaturoptimum bei 72°C. Es handelt sich hierbei um eine Taq-Polymerase, die erstmals aus *Thermus aqauaticus* isoliert wurde. Sie führt die Replikation des Templates durch. Dabei wird der komplementäre DNA-Strang in 5´-3´Richtung verlängert.
- Die Substrate für die DNA-Polymerase stellen die Desoxyribonucleosidtriphosphate dar, welche die neu synthetisierten DNA-Stränge aufbauen und im Überschuss vorliegen müssen.
- Mg^{2+}-Ionen, sind wichtig für die Funktion der DNA-Polymerase. Die Konzentration muss für einen gut funktionierenden Reaktionsablauf spezifisch eingestellt werden.
- Eine Pufferlösung, welche das optimale Milieu für die ablaufenden Reaktionen bildet. Das optimale Reaktionsmilieu der Taq-Polymerase liegt bei einem pH-Wert > 8 (Mühlhardt 2009)

Die Reaktion läuft in einem geschlossenen Reaktionsgefäß (PCR-Platte oder Tube) ab, welches in den Thermoblock der PCR-Maschine platziert wird. Das Erhitzen und Abkühlen des Reaktionsgefäßes wird durch den Thermocycler der PCR Maschine ausgeführt.

Ablauf der Polymeraseketten-Reaktion

Der PCR Prozess läuft nach festgelegten, sich wiederholenden Zyklen ab. Am Ende jedes Zyklus steigt die Konzentration des Amplifikationsproduktes exponentiell an.

- Der erste Schritt, die Denaturierung umfasst eine Erhöhung der Temperatur auf 94 °C, wodurch sich die DNA-Doppelstränge trennen.
- Im zweiten Schritt wird die Temperatur abgesenkt, sodass es zur Hybridisierung der Primer an die DNA-Einzelstränge kommt. Die sogenannte Annealingtemperatur ist primerspezifisch und liegt je nach Sequenz zwischen 55°C-60°C.
- Nun kommt es im dritten Schritt zu der Elongation. Dabei wird die Temperatur auf die für die Taq-Polymerase spezifische Arbeitstemperatur erhöht und der als Matrize dienende Einzelstrang wird zu einem Doppelstrang ergänzt.

Die beschriebenen Zyklen werden 30-40 mal wiederholt. Zunächst häufen sich längere, über den Primer der Komplementärsequenz hinausgehende Fragmente an. Nach einigen Zyklen wird jedoch das PCR-Hauptprodukt konsequent vermehrt. Gegen Ende der PCR Reaktion nimmt die Aktivität der Vermehrung ab aufgrund des Verbrauchs an Substrat und Primer. Zur Beurteilung des PCR- Produktes wird eine Gelelektrophorese durchgeführt.

3.2.2. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung von DNA Fragmenten anhand ihrer Größe. Die Methode eignet sich so zur Überprüfung der Qualität einer PCR. In einem von außen angelegten elektrischen Feld wandern die negativ geladenen DNA Fragmente entsprechend ihrer Größe und Ladung unterschiedlich schnell. Zudem spielt die Porenweite des Agarosegels eine Rolle. Das im Gel enthaltene Ethidiumbromid, ein interkalierender Farbstoff, dient der Darstellung der gewanderten DNA unter UV-Licht. Die Stärke der Bande im Verhältnis zum Längenstandard gibt Auskunft über die Qualität des PCR-Produktes, die Position der Bande über die Größe des DNA-Fragments.

3.2.3. Schmelzkurvenanalyse mit dem Light Cycler® 480

Bei der High Resolution Melting Analysis, zu deutsch Schmelzkurvenanalyse, handelt es sich um eine gut etablierte Methode zur Erkennung von genetischen Varianten (Mutationen, Polymorphismen, SNPs). Der Vorteil dieser präsequentiellen Methode liegt in der schnellen und kostengünstigen Durchführbarkeit. Sensitivität und Spezifität sind mit früher etablierten Methoden, z.B. der DHPLC, vergleichbar. Zudem können mehrere Proben parallel auf einer 96 Multiwellplatte und somit in einem geschlossenen Reaktionsgefäß durchgeführt werden. Zunächst wird eine PCR der Proben nach dem Prinzip der Echtzeit-PCR durchgeführt, wobei die quantitative Zunahme der DNA-Konzentration verfolgt werden kann. Dies ist aufgrund eines speziellen interkalierenden Fluoreszenz-Farbstoffs möglich, der sich ausschließlich an

doppelsträngige DNA bindet, und den normalen Ablauf der PCR nicht stört. Nach Abschluss des letzten PCR-Zyklus', an dessen Ende die DNA in doppelsträngiger Form vorliegt, werden also starke Floureszenz-Signale detektiert. Im nächsten Schritt wird nun die Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dazu wird langsam die Temperatur erhöht, bis sich die Doppelstränge denaturieren. Es kommt somit zur Abnahme des Fluoreszenzsignals. Die Temperatur, bei welcher die Doppelstränge aufschmelzen, ist charakteristisch für die jeweilige Sequenz. Liegt eine genetische Variante/Mutation in einem oder sogar in beiden Allelen vor, so wird dieser Doppelstrang bei einer anderen Temperatur aufgeschmolzen als der Wildtyp und stellt sich mit einer anderen Schmelzkurve da. Auf diese Weise können Mutationen (Punktmutation, Deletione, Insertion) detektiert und zwischen homozygoten oder heterozygoten Veränderungen unterschieden werden.

Abbildung 11: Light Cycler® 480 (Roche)(Science 2011)

Durchführung

Die Analysen wurden auf dem Light Cycler®480 von Roche durchgeführt. Hierzu wurde der *LightCycler®480 High Resolution Melting Master Kit* verwendet. Das Protokoll wurde an die Herstellerangaben angelehnt und modifiziert. Es wurden jeweils 10 Proben der Patientinnen zusammen mit einem Wildtyp und einem Leerwert analysiert, sodass die LightCycler®480 Multiwellplatte mit 8 Exons je 10 Patientenproben befüllt werden konnte. So wurden nacheinander alle 24 Exons des BRCA1-Gens für das Kollektiv aus 100 Patientenproben analysiert. Zur Vorbereitung der Analyse wurde zunächst ein Master Mix angesetzt. Hierzu

wurde der von Roche empfohlene Melting Master Mix (zweifach konzenetriert) verwendet, welcher Fast Start Taq Polymerase, Reaktionspuffer, dNTPs und den High Resolution Melting Dye enthält. Nach dem Auftauen des Melting-Mastermixes musste dieser gründlich gemischt werden. Hierbei war zügiges Arbeiten angezeigt, da der Fluoreszenzfarbstoff nicht zu lange dem Tageslicht ausgesetzt werden durfte. Zur Optimierung der Funktion der Polymerase wurde eine 25mM $MgCl_2$-Lösung hinzugefügt. Die bereits gelösten Primer (100pmol/µl) wurden im Verhältnis 1:10 verdünnt. Die folgende Tabelle zeigt das Pipettierschema für den Mastermixansatz, nach dem bei allen Reaktionen vorgegangen wurde.

KOMPONENTE	VOLUMEN FÜR 1 PROBE	VOLUMEN FÜR 12 PROBEN
Melting Master Mix (2xconc.)	10µl	130µl
$MgCl_2$ (25mM)	3,2µl	41,6µl
Primer (10mmol) vorwärts	0,5µl	6,5µl
Primer (10mmol) rückwärts	0,5µl	6,5µl

Tabelle 10: Pipettierschema LightCycler Master Mix

Es wurden nun je 14µl des Mastermix in ein Reaktionsgefäß der LightCycler® 480 Multiwellplatte pipetiert, sodass eine horizontale Reihe komplett befüllt war. Im nächsten Schritt wurden nun die zu analysierenden DNA-Proben hinzugefügt. Hierbei war es wichtig, dass alle DNA- Proben in gleicher Konzentration vorlagen, um die Ergebnisse zu standardisieren. Da es sich um aus Tumorgewebe isolierte DNA handelte, erwies es sich als günstig, 6µl einer 10ng/µl konzentrierten Lösung einzusetzen. Somit wurde das von der Arbeitsgruppe Meindl zur Diagnostik eingesetzte Schema leicht abgeändert, was sich durch die unterschiedliche Art der DNA-Präperation (Blut/Tumor) erklären lässt. In der Routinediagnostik werden die Mutationsanalysen mit DNA durchgeführt, die mittels DNA-Extraktion aus Leukozyten gewonnen wird. In unserem Fall wurde die DNA jedoch aus tripel-negativem Tumorgewebe gewonnen, weshalb die Reaktionsbedingungen für die Realtime-PCR angepasst werden mussten. Das Volumen pro Well wurde auf 20 ul erhöht und mehr geringer konzentrierte DNA eingesetzt. Es zeigte sich, dass die Qualität der aus Tumormaterial gewonnenen DNA nicht mit der aus Blutzellen extrahierten DNA zu vergleichen ist. Nach dieser Vorgehensweise wurde nun die gesamte Multiwellplatte befüllt und anschließend mit einer LightCycler® 480 Sealing Folie bedeckt. Die Folie durfte dabei

nur an den dafür vorgesehen weißen Papierenden berührt werden, da die Registrierung der Emission durch die Folie hindurch geschieht. Die versiegelte Platte wurde dann in den Block des LightCycler® 480 eingestellt. Mit Hilfe der LightCycler® 480 Software wurde nun die Beschriftung der Reaktionsgefäße und die Einstellung des Reaktionsprotokolls durchgeführt. Das verwendete Reaktionsprotokoll wird aufgrund seiner Komplexität im Anhang dargestellt.

Auswertung

Die Auswertung wurde im Gene Scanning Modus ausgeführt. Zunächst führte das Programm eine Normalisierung der Fluoreszenzsignale durch, wobei die initialen Signale aller Proben auf den relativen Wert 100% und die finalen Fluoreszenzsignale auf 0% umgerechnet wurden. Zum Teil war es von Vorteil die vom System vorgeschlagene Normalisierung abzuändern. Im nächsten Schritt führte das Programm das sogenannte Temperatur Shifting aus. Dabei wurde die Temperaturachse auf den Punkt normalisiert, bei dem alle DNA in denaturierter Form vorliegt. Im letzten Schritt analysierte das Programm im Modus Difference Plot die Unterschiede in den Schmelzkurven im Bezug zu einem selbst festgelegten Wildtyp. Gleichförmige Kurven wurden in Gruppen zusammengefasst und farbig markiert. Zur Auswertung wurden je 10 Patientenproben in Bezug zu einer Wildtyp DNA beurteilt. Hierbei wurde auf ungewöhnliche Kurvenverläufe geachtet. Zudem wurden bekannte Polymorphismen berücksichtigt und versucht eine Einschätzung abzugeben, ob es sich bei vom Wildtyp abweichenden Schmelzkurven um homo- oder heterozygote Veränderungen handelt. Suspekte Befunde wurden sequenziert.

3.2.4. Denaturierende Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit WAVE®

Das Exon 11-A wurde aufgrund unbefriedigender Ergebnisse mit dem LightCycler® 480 mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie durchgeführt.

Die denaturierende Hochleistungsflüssigkeitschromatographie DHPLC (denaturating high performance liquid chromatography) ist eine gut etablierte Methode, die zur Analyse von Mutationen der DNA, vor allem auch vom BRCA1-Gen verwendet wird. Hierzu wird zunächst eine Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion des zu analysierenden Fragments durchgeführt. Das Produkt wird auf 95°C erwärmt, sodass sich die DNA-Doppelstränge separieren. Durch die anschließende Abkühlung kommt es zu einer Neupaarung der Doppelstränge. Liegt nun eine Mutation oder Sequenzvariante vor, bilden sich neben komplementären auch nicht komplementären Paarungen aus. Man spricht von

sogenannten Homo- und Heteroduplexen. Liegt hingegen nur der Wildtyp vor, bilden sich ausschließlich Homoduplexe (Schwarzer 2000). Mit Hilfe einer Chromatographiesäule können die Heteroduplexe von den Homoduplexen getrennt werden, da sie unterschiedliche physikalische Eigenschaften und somit verschiedende Retentionszeiten besitzen. Die stationäre Phase besteht aus einer hochauflösenden Polymermatrix aus Polystyren-Divinylbenzol (DNASep®Cartridge), an welche sich DNA vermittelt über das Eluentensystem bindet (Schwarzer 2000). Das Eluentensystem wird durch die kationische Form des amphiphilen Moleküls Triethylammonium gebildet. Triethylammonium, kurz TEAA, bindet mit seiner positiv geladenen Ammonium-Gruppe die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA. Durch die neutralen Alkylgruppen des TEA hingegen wird eine Bindung an die hydrophobe Polymatrix über Van-der Waals Wechselwirkungen vermittelt, sodass die DNA-Doppelstränge an der Trägersäule gehalten werden. Im nächsten Schritt werden die DNA-Stränge durch eine steigende Konzentration von Acetonitril wieder von der Säule gewaschen, indem die hydrophoben Alkylketten von der Säule verdrängt werden. Dieser Vorgang entspricht der Ionenpaar-Umkehrphasechromatographie. Das besondere bei der für die Mutationsalnalysen eingesetzten Methode ist, dass die erneute Eluation der DNA-Moleküle unter denaturierenden Bedingungen stattfindet. Die Heteroduplexe werden aufgrund von inkomplementärer Basenpaarung und somit minimalen physikalischen Unterschieden bei niedrigeren Temperaturen von der Säule gewaschen. Die eluierten Heteroduplexe werden von einem UV-Detektor bei 260nm registriert und bilden so charakteristische Peaks im Chromatogram aus. Mit weiterem Ansteigen der Temperatur werden auch die Homoduplexe denaturiert und von der Säule gewaschen und ebenfalls detektiert. Es kann so ein Eluationsprofil mit bis zu vier Peaks dargestellt werden, was folgenden Kombinationen entspräche: Homoduplexe des Wildtyps und der Mutanten sowie zwei in der Strangrichtung unterschiedliche Heteroduplexe. Oft liegen jedoch nur zwei bis drei Peaks mit oder ohne Schulter vor, da die Retentionszeiten der jeweiligen Hetero- oder Homoduplexe sehr nahe beieinander liegen können. Die Identifikation von homozygoten Mutationen stellt sich zum Teil als problematisch dar. Ausschließlich ein Peak findet sich bei den, dem Wildtyp entsprechenden Proben, da hier nur Homoduplexe vorliegen. Die Form und Anzahl der Peaks im Chromatogram ist also spezifisch für eine Mutation, einen Polymorphismus oder den Wildtyp eines bestimmten Exons. Daher muss immer eine Mutationsvorlage und ein Wildtyp zur Kontrolle mitanalysiert werden. Zudem ist die Denaturierungstemperatur für jedes Exon spezifisch und von Bedeutung für die Qualität der Ergebnisse (Alistair C. Jones 1999)

Durchführung

Wie bereits erwähnt, wurde für alle 100 Patienten für das Exon 11-A eine denaturierende Hochleistungsflüssigkeitschromatographie durchgeführt. Es wurde hierzu zunächst eine Amplifikation des Exon 11-A mittels Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt. Die Reaktion wurde nach folgendem Protokoll angesetzt und in einer Thermowellplatte ausgeführt.

KOMPONENTEN	VOLUMEN
Wasser	22,5µl
Puffer	2,8µl
dNTPs (100mM)	2,4µl
Primer (10mmol) vorwärts	0,6µl
Primer (10mmol) rückwärts	0,6µl
Taq-Polymeras (250 Units)	0,2µl
DNA (10ng/µl)	10µl

Tabelle 11: Pipetierschema PCR für DHPLC

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde wie bereits in 2.2.1 beschrieben vorbereitet. Das verwendete Reaktionsprotokoll wird im Folgenden beschrieben. Es wird im letzten Raektionsschritt keine Kühlung vorgenommen, sondern bereits mit der Denaturierung bei 95°C begonnen. Als Mutationsvorlage wird die Probennummer 19454 aus dem Bestand der AG Meindl verwendet. Der Wildtyp stammt aus dem Patientenkollektiv.

REAKTIONSSCHRITT	TEMPERATUR	DAUER
1.Denaturierung	95°C	10 Minuten
2.Denaturierung	95°	30 Sekunden
3.Annealing	58°C	30 Sekunden
4.Elongation	72°C	45 Sekunden
Zykluswiederholung	goto 2	38 times
5.Denaturierung	95°C	10 Minuten

Tabelle 12: Reaktionsprotokoll Thermocycler für DHPLC-Analalyse

Das amplifizierte Produkt wurde im Anschluss direkt mit der Thermowellplatte in den sogenannten Autosampler (96 Well) des Wave-Systems eingesetzt. Es wurde mit Hilfe der Navigator™Software eine Zuordnung der Proben (sample sheet) und eine Einstellung der Denaturierungstemperaturen sowie die Injektionsmenge (8µl) vorgenommen. Für das Exon 11-A wurden die spezifische Denaturierungstemperaturen 56°C und 59°C verwendet.

Auswertung

Die Auswerung wurde mit Hilfe der Wave® Navigator Analyse-Software ausgeführt.

3.2.5. Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde mittels Kettenabbruch-Synthese nach Sanger durchgeführt (Sanger, Nicklen et al. 1992). Dabei handelt es sich um eine molekularbiologische Methode, die zur Darstellung der Nukleotidabfolge der DNA und somit zur Entschlüsslung des genetischen Codes verwendet werden kann. Dabei können Basenaustausche, Polymorphismen sowie kleinere Deletionen, sowie Insertionen identifiziert werden. Zunächst werden die vorliegenden DNA-Doppelstränge denaturiert, sodass Einzelstränge vorliegen. Einer der komplementären Einzelstränge wird mit einem Primer hybridisiert und als Matrize für eine Neu-Synthese verwendet. Das Prinzip nach Sanger sieht für diese Reaktion neben der Zugabe von normalen PCR-Komponenten (siehe oben) die Zugabe von Didesoxynukleotiden vor. Die Didesoxynukleotide stellen sogenannte Antimetabolite dar. Werden sie eingebaut, kommt es aufgrund der fehlenden OH-Gruppe am 3´Kohlenstoff zum Abbruch der Polymerase-Kettenreaktion. Da die Didesoxy-Nukleotide zufällig in die neu synthetisierten Stränge eingebaut werden, kommt es zur Bildung unterschiedlich langer DNA-Fragmente. Die ddNTPs sind jeweils mit 4 unterschiedlich fluoreszierenden Farbstoffen markiert. Die unterschiedlich langen DNA-Fragmente werden nun mittels Kapillarelektrophorese nach ihrer Länge aufgetrennt und die ddNTPs durch einen Laser zur Emission angeregt. So kann die Reihenfolge der Nukleotide in der Sequenz detektiert werden. Durch die Auswertung der Signale entsteht ein sogenanntes Elektropherogramm, von dem direkt die Sequenz und eventuelle Varianten abgelesen werden können.

Durchführung

- Zunächst wurde eine Polymerase-Kettenreaktion zur Vervielfältigung der zu sequenzierenden Patienten-DNA durchgeführt. Dabei wurde nach dem in 2.2.1. beschrieben Prinzip vorgegangen. Für die Polymerase-Kettenreaktion wurden die gleichen Primer wie bei der Schmelzkurvenanalyse verwendet. Es wurde zur Kontrolle ein Leerwert mitgeführt. Der Ansatz für eine Polymerase-Kettenreaktion umfasste also:

KOMPONENTE	VOLUMEN
H_2O	39µl
PCR-Puffer	5µl
dNTPs (100mM)	4µl
Primer (10 mmolar) vorwärts	1µl
Primer (10mmolar) rückwärts	1µl
Taq-Plymerase (250 Units)	0,3µl
DNA (10ng/µl)	5µl

Tabelle 13: PCR-Ansatz für Sequenzierung

Es wurde zunächst ein Mastermix nach oben beschriebem Protokoll hergestellt, je nach Anzahl der zu sequenzierenden Proben. Dieser wurde gut gemischt und je 50,3µl wurden in ein geschlossenes Reaktionsgefäß gegeben. Hierzu wurden PCR-Softstrips 0,2ml mit Kappe verwendet. Die DNA wurde in einer Konzentration von 10ng/µl hinzugefügt, sodass das PCR- Volumen insgesamt rund 55µl betrug. Die vorbereiteten Softstrips wurden zum Start der Reaktion in den PCR-Thermocycler platziert. Es wurde folgendes PCR-Programm verwendet.

REAKTIONSSCHRITT	TEMPERATUR
Denaturierung	95°C
Denaturierung	95°
Annealing	58°C
Elongation	72°C
Zykluswiederholung	Go to 2
Kühlung	10°C

Tabelle 14: PCR-Reaktionsschema für Thermocycler

- Zur Überprüfung der Qualität der PCR wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Dabei wurde das Agarosegel wie oben beschrieben im Vorfeld hergestellt. Als DNA Längenstandard wurde die hergestellte Lösung mit dem Molecular-Weight Marker V verwendet. Eine Geltasche wurde mit 7µl Auftragspuffer und 3µl PCR-Produkt beladen und ein Strom von 120 A für 20 Minuten angelegt. Zur Darstellung des Gels wurde es mit Hilfe des UV-Gerätes GelFotoBiometra UV solo bestrahlt und direkt fotodokumentiert. Wurde eine angemessene Bandenstärke registriert, konnte die amplifizierte DNA gereinigt werden.
- Um das PCR Produkt von überschüssigen Primern und Nukleotiden zu befreien, wurde eine Filterplatte Multi Screen®Milipor mit einem Porendurchmesser von 10/pk verwendet. Dazu wurden 120µl Wasser in die Wells vorgelegt und das gesamte PCR Produkt hinzugefügt. Die Platte wurde nun für 6 Minuten an eine Vakuumpumpe angeschlossen, sodass sich alle Flüssigkeit durch die Filtermembran entziehen lässt. Die auf der Filtermembran getrocknete und gereinigte DNA wurde anschließend mit 30µl H_20 durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wieder gelöst und in ein sauberes und sorgfältig beschriftetes Eppendorfgefäß gefüllt. So konnte mit einem möglichst reinen Produkt weiter gearbeitet werden.
- Es erwies sich als günstig, dem Reinigungsvorgang direkt eine weitere Agarosegelelektrophorese anzuschließen, um nochmals die Stärke des nun gereinigten PCR-Produktes, zu überprüfen. Zudem konnte so besser eingeschätzt werden, wie viel

DNA für die Sequenzierung eingesetzt werden sollte. (Denn aufgrund der schlechteren Qualität der aus Tumorgewebe isolierten DNA gestaltete sich die Durchführung der PCR zum Teil schwierig.) Die Agarosegelelektrophorese wurde wie bereits beschrieben durchgeführt.

- Die gereinigte und wieder gelöste DNA wurde nun amplifiziert. Bei diesem Reaktionschritt werden Einzelstränge nach dem Prinzip der Kettenabbruchmethode synthetisiert und so die mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Didesoxynukleotide eingebaut. Es wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen.

REAGENZ	VOLUMEN
ABIPRISM® BigDye TERMINATOR v1.1.Cycle Sequenzing Kit	1,7µl
Primer	0,4µl
DNA (amplifizieret und gereinigt)	8,0µl

Tabelle 15: Reaktionsansatz der Sequenzierung

Der Reaktionsansatz wurde in einer Thermowellplatte 96 Well Platte angesetzt, die je nach Probenzahl zugeschnitten wurde. Nach sorgfältigem Mischen wurden 1,7µl Big Dye pro Well vorgelegt. Hierbei musste, aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Fluoreszenzfarbstoffe, auf zügiges Arbeiten geachtet werden. Es wurden 0,4µl Primer hinzugegeben. Dabei wurde exonspezifisch der Vorwärts- oder Rückwärtsprimer eingesetzt. Für diese Entscheidung wurden die Erfahrungswerte der Arbeitsgruppe Meindl herangezogen. Zuletzt wurden noch 8µl der amplifizierten und gereinigten DNA hinzugefügt. Das Reaktionsgefäß wurde mit einer Microseal A Folie gut verschlossen in den Thermocycler platziert, der auf folgendes Reaktionsschema programmiert wurde.

REAKTIONSSCHRITT	DAUER	TEMPERATUR
Denaturierung	00:30	95°C
Annealing	00:15	52°C
Elongation	04:00	60°C
Zykluszahl	Go to 1 27x	
Kühlung	10:00	10°C

Tabelle 16: Reaktionsprotokoll Cycle

- Das Reaktionsprodukt wurde im nächsten Schritt mittels alkoholischer Fällung von überschüssigen Fluoreszenzfarbstoffen und Primern befreit. Das Reaktionsprodukt wurde mit 125µl 77% Ethanol überschichtet und 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Thermowellplatte bei 3000xg für 30 Minuten zentrifugiert. Dafür wurde die Multifuge 3L-R Thermo Scientific von Heraeus verwendet, wobei immer auf eine exakte Tarierung der Gegengewichte geachtet werden musste. Der alkoholische Überstand wurde dann durch zügiges Stürzen der Thermowellplatte auf ein Filterpapier verworfen. Das DNA Pellet wurde noch mal mit 125µl 775 Alkohol überschichtet und für weitere 10 Minuten bei 3000xg zentrifugiert. Nach wiederholtem Verwerfen des Überstands wurde im letzten Schritt die Thermoplatte umgedreht und ohne Folie für 1 Minute bei 600xg zentrifugiert, sodass ein reines und trockenes DNA-Pellet zurückblieb.
- Das DNA Pellet wurde nun in Wasser zurückgelöst. Die verwendete Menge an Lösungsmittel richtete sich dabei nach der Stärke des PCR-Produkts, beurteilt anhand der Bandenstärke in der Gelelektrophorese. So wurden Mengen zwischen 30-60µl verwendet.
- Im letzen Schritt wurde das Sequenziergerätes mit den Proben beladen. Dabei wurde pro Well eine spezifische Menge an Probenmaterial zwischen 1-5µl eingesetzt und je auf 30µl Gesamtansatz aufgefüllt.
- Nach der Anfertigung eines Sample Sheet, konnte nun die Sequenzanalyse im Anwendungsmodus „Sequencing Analysis“ durchgeführt werden.

Auswertung

Die Auswertung wurde mithilfe der Programme „Sequenz Navigator“ von Perkin Elmer ABIprism Version 1.0.1 sowie dem Programm „Seqencing Analysis Software“ Version 2.1.2, PE Applied Biosystems durchgeführt. Dafür wurden die gesammelten Daten für die Nutzung mit einem Apple Betriebssystem konvertiert. Des Weiteren wurden das Programm Human Blat Search der NCBI (http://genome.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) herangezogen, in das Sequenzteile hochgeladen und mit dem humanen Genom verglichen werden konnte. Zur Überprüfung der Bedeutung einer gefundenen Mutation wurde eine Vergleichsdatenbank aus Leipzig (Deutsches Konsortium für familiären Brust- und Eierstockkrebs) bemüht, die viele bekannte Mutationen des BRCA1-Gens auflistet und klassifiziert. Konnte der Verdacht über

das Vorliegen einer Mutation bestätigt werden, wurde die genaue Position und der resultierende Aminosäureaustausch bestimmt. Des Weiteren wurde zur in silico-Abschätzung des Effekts der Mutation auf dieProteinstruktur das Programm Mutation Taster (http://www.mutationtaster.org/MutationTaster/) verwendet

3.2.6. Statistische Analysen

Die klinischen Eigenschaften der Patientinnen wurden zunächst in tabellarischer Form dargestellt. Die statistischen Analysen wurden mittels des Software-Programms SPSS 19.0 von IBM durchgeführt. Der Zusammenhang zwischen klinisch-pathologischen Variabeln wurde mittels Chi-Quadrat-Testung untersucht. Der Wert einzelner klinisch-pathologischer Variabeln für die Prognose wurde zudem mit Hilfe des Cox-Regressions-Modells analysiert. Dabei wurden sowohl multi- als auch univariate Analysen durchgeführt. Die Bedeutung prognostischer Parameter für das Überleben innerhalb verschiedener Subgruppen wurde durch Kaplan-Meier-Überlebenskurven dargestellt und ihre Signifikanz mittels log-Rank Testung definiert. Alle statistischen Tests wurden zweiseitig durchgeführt, ein p-Wert unter 0,05 wurde für alle statistischen Untersuchungen als Signifikanzniveau festgelegt. Das 95%-Konfidenzinteravall wurde für alle Analysen berücksichtigt. Als statistische Endpunkte wurden das Gesamtüberleben (overall survival = OS) und das progressionsfreie Überleben (progressionfree survival = PFS) gewählt. Das Gesamtüberleben wurde dabei vom Zeitpunkt der Operation bis hin zum Tod ungeachtet der Todesursache definiert. Das progressionsfreie Überleben wurde ebenfalls vom Zeitpunkt der operativen Intervention bis hin zum Krankheitsprogress jeglichen Ausmaßes (sowohl Lokal- als auch Fernrezidivs) definiert.

4. Ergebnisse

4.1. Klinische Daten des Patientenkollektivs und statistische Auswertungen

Mit Hilfe der klinischen Datenbank MaCa des Frauenklinikums Rechts der Isar konnten die klinischen Parameter der 97 Patientinnen erhoben und ausgewertet werden. Das tripel-negative Kollektiv wurde dabei auf die vorliegenden Tumoreigenschaften (TNM-Status und Grading), das Erkrankungsalter, den histopathologischen Subtyp sowie auf erfolgte Therapien hin überprüft. Die folgende Tabelle stellt die wichtigsten klinischen Parameter dar.

KLINISCHE PARAMETER	N=97	PROZENT (%)
Alter		
< 50	33	34
> 50	64	66
Mittleres Alter	57,8	0
Menopausenstatus		
Prämenopausal	30	32
Postmenopausal	62	66
Perimenopausal	1	1
unbekannt	4	0
Tumorgröße		
pT1	37	39
pT2	44	46
pT3	5	5
pT4	9	9
unbekannt	2	0
Nodalstatus		
N0	49	52
N1	33	35
N2	10	11
N3	2	2

unbekannt	3	0
Fernmetastasen		
M0	81	92
M1	7	8
unbekannt	9	0
Histologisches Grading		
G1	4	4
G2	15	16
G3	76	83
unbekannt	2	0
Histopathologischer Subtyp		
Invasiv duktal	73	85
Invasiv lobulär	5	6
Medullär	8	9
andere	11	13
Therapie		
Keine	21	22
FEC	25	27
EC-CMF	19	20
EC	16	17
Anthrazykline/Taxane	6	6
Andere	7	7
unbekannt	3	0

Tabelle 17: Klinische Daten

4.1.1. Klinische Daten

Das durchschnittliche Erkrankungsalter im tripel-negativen Patientenkollektiv lag bei 57,8 Jahren und somit sechs Jahre unter dem durchschnittlichen Erkrankungsalter bei anderen Brustkrebstypen. Ein jüngeres Erkrankungsalter als Charakteristikum für die Entität des TNBC wurde somit auch in dem vorliegendem Patientenkollektiv bestätigt. Folglich ergab sich auch ein erhöhter Anteil an prämenopausal erkrankten Frauen von 32% im Gesamtkollektiv.

Bei der Auswertung der beobachteten Tumorgrößen konnten die meisten Tumore in den Stadien pT1 und pT2 beobachtet werden. 37 Patientinnen wiesen einen pT1 Tumor auf, also einen Tumor bis zu einer Größe von 2cm. Den größten Anteil machten mit 41 Betroffenen die Tumore der pT2 Kategorie aus, welche durch eine Tumorgröße von 2 cm bis 5 cm gekennzeichnet sind. Tumore, die größer als 5cm im Durchmesser waren, konnten bei 5 Patientinnen im pT3 Stadium beobachtet werden. Eine dem pT4 Stadium entsprechende Ausdehnung des Tumors bis auf die Brustwand oder Haut konnte bei 9 Patientinnen beobachtet werden. Die Brustwand schließt dabei Rippen, interkostale Muskulatur und den Serratusmuskel mit ein. Bei 2 Patientinnen lagen keine Angaben zur Größe des Primärtumors vor.

Bei 45 Patientinnen lagen bereits bei der Exzession des Primärtumors weitere Lymphknotenmetastasen vor. In 33 Fällen handelte es sich dabei um 1-3 befallene bewegliche ipsilaterale axilläre Lymphknoten, was dem Nodalstatus N1 entspricht. Bei 10 Patientinnen liegt ein N2 Status vor, d.h. es kommen 4-9 befallene ipsilaterale Lymphknoten vor, die zum Teil untereinander oder an anderen Strukturen fixiert sind oder es finden sich klinisch erkennbare ipsilaterale Lymphknoten entlang der A. mammaria interna ohne axilläre Lymphknotenmetastasen. In zwei Fällen konnte ein N3 Status beschrieben werden. Die N3 Kategorie umfasst den Befall von mindestens 10 ipsilateralen axillären Lymphknoten oder den Befall von ipsilateralen infraklavikulären Lymphknoten oder das Vorkommen von klinisch erkennbaren Lymphknotenmetastasen entlang der A. mammaria interna mit zusätzlichem axillärem Lymphknotenbefall. 49 Patientinnen waren frei von Lymphknotenmetastasen und zeigten so den nodal negativen N0 Status. Bei drei der Patientinnen konnten der Datenbank keine Informationen zum Nodalstatus entnommen werden. Die nachfolgende Tabelle zeigt den Nodalstatus in Beziehung zu der zugrundeliegenden Tumorgröße des Primarius. Bei den Tumoren zwischen 2-5cm zeigte sich bereits bei der Hälfte der Patientinnen ein positiver Lymphknotenstatus.

	NODALSTATUS	
TUMORGRÖßE	Positiv (%/n)	Negativ (%/n)
pT1	27% (10)	72% (26)
pT2	50% (22)	50% (22)
pT3	100% (4)	0%
pT4	100% (8)	0%

Tabelle 18: Lymphknotenstatus in Beziehung zur Tumorgröße

Bei sieben Patientinnen wurden im Rahmen der Staging-Untersuchung Fernmetastasen gefunden, wohingegen bei 81 ein M0 Status, also keine Fernmetastasierung verzeichnet werden konnte.

Durch histopathologische Untersuchungen konnte eine Klassifizierung des Differenzierungsgrades der Tumore vorgenommen werden. Dabei wurden eine tubuläre Differenzierung, Polymorphien und der Anteil der Mitosen berücksichtigt. Es zeigten 76 der Tumore eine geringgradige Differenzierung (G3) und somit ein aggressives Wachstumsprofil. Lediglich bei 4 Tumoren konnte ein G1- und bei 15 ein G2-Stadium mit geringer Entdifferenzierung beobachtet werden.

Die histologische Klassifiktaion der Tumore wurde durch Pathologen des Pathologischen Institutes des Klinikum MRI vorgenommen. Dabei zeigte die Mehrheit der Tumore einen invasiv duktalen Subtyp, also einen von den Epithelzellen der Milchgänge ausgehenden Tumor. 73 Patientinnen, also 75% des Kollektivs zeigten diesen histologischen Typ. Bei ca. 5% der Tumore handelte es sich um ein invasiv lobuläres Malignom, wohingegen 8% einen medullären Phänotyp zeigten.

21 Patientinnen aus dem Kollektiv wurden adjuvant nicht weiter mit Zytostatika behandelt. Bei 3 Patientinnen ist der weitere Therapieplan unbekannt, die restlichen 73 Patientinnen wurden mit unterschiedliche Therapiestrategien adjuvant behandelt. In 25 Fällen wurde das FEC-Therapieschema angewandt. Die Patientinnen wurden dabei mit 5-FU, Epirubicin und Cyclophosphamid in 6 Zyklen im Abstand von 3 Wochen behandelt. Bei 19 Patientinnen wurde ein kombiniertes Therapieschema angewandt. Es wurde mit dem EC-Protokoll

begonnen und in der Regel 3 Zyklen CMF angeschlossen. Bei dieser Polychemotherapie wurden folglich die vier folgenden Zytostatika eingesetzt: Epirubicin, Cyclophosphamid, Methotrexat und 5-FU. 16 Patientinnen wurden hingegen nur mit Epirubicin und Cyclophosphamid im Rahmen des EC- Schemas in 6 Zyklen dreiwöchigen Abstand behandelt. Eine anthrazyklin und taxanhaltige Therapie wurde bei der Behandlung von 6 Patientinnen eingesetzt. Im Rahmen von Studien und experimentellen Therapien wurde die Behandlung von 7 Patientinnen mit unterschiedlichen Schemata durchgeführt. In drei Fällen konnte nicht ermittelt, werden welche Therapien eingesetzt wurden. Nachstehende Tabelle gibt Überblick über die Therapiestrategien die bei Mutationsträgerinnen angewandt wurden und diejeigen die bei Wildtypen zum Einsatz kamen.

CHEMOTHERAPIE DER „NICHT-BRCA1-PATIENTINNEN		
Therapie	Anzahl	Prozent (%)
FEC	25	26,3
EC	20	21,1
CMF	14	14,7
Antrazyclin + Taxan	6	6,3
Andere	7	7,4
keine	20	21,1
Keine Auskunft	1	1,1
abgesetzt	2	2,1

Tabelle 19: Chemotherapieregime Wildtypen; insgesamt wurden 51 Patientinnen mit antrazyklin-haltigen Regimen behandelt.

CHEMOTHERAPIE BEI BRCA1-MUTATIONTRÄGERINNEN		
Therapie	Anzahl	%
FEC	3	30%
EC	2	20%
CMF	2	20%
Antrazyclin + Taxan	0	0
Andere	2	20%
keine	1	10%
Keine Auskunft	0	0
abgesetzt	0	0

Tabelle 20: Einsatz von Chemotherapeutika bei Mutationsträgerinnen

4.2. Mutationen

Nach der Durchführung der HRM-Analysen aller Exons wurden abweichende Schmelzkurven mittels Sequenzierung auf Sequenzvarianten und Mutationen untersucht. Dabei musste aufgrund der zum Teil schlechteren Qualität der Tumor DNA im Vergleich zur Routinediagnostik, die DNA aus Lymphozyten verwendet, häufiger eine Sequenzanalyse angeschlossen werden. Bei den Analysen der gesamten codierenden Region des BRCA1-Gens der suspekten Proben konnten zehn pathologische Mutationen identifiziert werden.

4.2.1. Unbekannte Mutationen

Es wurden zwei unbekannte Mutationen identifiziert, die nicht in der BIC Datenbank, einer frei zugänglichen Online-Datenbank, welche Mutationen in den BRCA-Suszeptibilitätsgenen listet, registriert sind. Dabei handelt es sich um eine neuartige Nonsens-Mutation im Exon 16 (c.5007G>T; E1630X) und eine Spleißmutation im Exon 19 (c.5313delG). Die Nonsens-Mutation im Exon 16 wurde als klinisch relevant eingestuft, da sie einen Abbruch der Proteinkette ab Aminosäure 1630 verursacht und somit für die Funktion des Genprodukts relevant ist. Die Spleißmutation sollte ebenfalls in einem verkürzten Protein resultieren, da durch die Veränderung der Konsensus-Spleißstelle an der Exon19/Intron19-Grenze (Deletion des G) die korrekte Entfernung des Intron 19 nicht mehr gewährleistet ist.

Die oben genannte Mutation in Exon 16 (c.5007G>T) wurde bei einer Patientin nachgewiesen die im Alter von 46 Jahren erkrankte. Eine positive Familienanamnese konnte nicht mehr erhoben werden, so dass nicht zu eruieren war, ob es sich um eine rein somatische Mutation handeln könnte. Die zweite unbekannte Mutation in Exon 19 (c.5313delG) wurde bei einer im Alter von 78 Jahren erkrankten Patientin nachgewiesen. Auch hier war bei unklarer Familienanamnese nicht mehr zu beweisen, dass eine somatische Mutation vorliegt, wovon jedoch aufgrund des hohen Alters auszugehen ist.

4.2.2. Bekannte Mutationen

Es konnten noch 7 weitere Mutationen identifiziert werden, die bereits in der BIC Datenbank registriert sind: Darunter befanden sich die häufig vorkommenden „Founder“- Mutationen c.300T>G (C61G) in Exon 5, sowie c.5385-5389insC in Exon 20, welche in unserem Kollektiv zweifach zu beobachten war. Bei den „Founder“- Mutationen handelt es sich um Keimbahnmutationen, die in bestimmten Bevölkerungsgruppen gehäuft vorkommen. Auch in der deutschen Bevölkerung konnte ein vermehrtes Vorkommen der beschriebenen Mutationen in Exon 5 und 20 nachgewiesen werden (Meindl and Cancer 2002). In der BIC Datenbank

wurde die Mutation c.300T>G in 228 Fällen und die Insertion c.5385-5389 in 1063 Fällen registriert. Bei c.300T>G handelt es sich interessanterweise um einen pathogenen Aminosäureaustausch (Missense-Mutation), der das 5-RING-Finger Motiv des BRCA1-Proteins betrifft.

Im Exon 5 wurde zudem eine beschriebene Spleißmutation (IVS5+1G>T) entdeckt. Dabei kommt es durch den Basenaustausch G>T an der ersten Position des Introns 5 zu einer Veränderung der Spleißkonsensussequenz. Dies bewirkt den Verlust der Nukleotide 310-331 und somit den Abbruch der Translation bereits bei Codon 64. Diese Mutation führt nachweislich zu einer nicht korrekt gespließten mRNA und so zu einer Reduktion des funktionsfähigen Proteins (Szabo, Worley et al. 2004). Die Mutation wurde in der BIC Datenbank 4 mal registriert.

Zwei weitere bekannte Mutationen betrafen das Exon 11. Es handelt sich dabei um eine Deletion von 4 Basenpaaren an Nukleotidposition c.3875, die eine Leserasterverschiebung zur Konsequenz hat und bereits in 121 Fällen in der BIC Datenbank registriert wurde. Obwohl das Exon 11 das größte Exon mit einer Länge von mehr als 5000 Basenpaaren und 62% der codierenden Information darstellt, konnten insgesamt nur 2 Mutationen gefunden werden. Eine weitere Mutationträgerin (Deletion c.3819del5bp im Exon 11) wurde bereits im Rahmen der tumorgenetischen Sprechstunde der Frauenklinik MRI identifiziert. Diese Mutation wurde für 60 weitere Trägerinnen in der Datenbank beschrieben.

Im Exon 19 konnte durch die Sequenzanalyse eine weitere bekannte Nonsens-Mutation identifiziert werden. Bei Nukleotidposition c.5298 wurde ein Basentausch von A nach T beobachtet, der den Einbau eines Stopp-Signals (K1727X) zur Folge hat. Die Mutation wurde 8 mal in der Datenbank verzeichnet.

Im Exon 20 wurde schließlich ein weiterer beschriebener Basentausch, c.5370C>T (R1751X), nachgewiesen, der ebenfalls zum frühzeitigen Ablesen eines Stoppcodons und somit zu einem verkürzten Protein führt. Diese pathogene Variante wurde 32 mal in den Registern der Datenbank verzeichnet.

4.2.3. Tabellarische Darstellung der Mutationen

SAMPLE	*EXON*	*NUKLEOTID-POSITION*	*EFFEKT*	*ERKRANKUNGS-ALTER*	*FAMILIENANAMNESE*
1	5	c.300T>G	C61G°	57	unklar
2	5	IVS5+1G>T	Spleißdefekt	54	unklar
3	11	c.3819del5bp	Frameshift	37	Tumorrisikosprech-stunde
4	11	c.3875del4bp	Frameshift	46	unklar
5	16	c.5007G>T	E1630X*	46◆	unklar
6	19	c.5298A>T	K1727X	47	MaCa Schwester mit 51
7	19	c.5313delG	Spleißdefekt*	78◆	unklar
8	20	c.5370C>T	R1751X	49	Somatisch
9	20	c.5385-5386insC	Frameshift°	25	unklar
10	20	c.5385-5386insC	Frameshift°	56	unklar

Tabelle 21: Tabellarische Darstellung der analysierten und bestätigten Mutationen. Dabei wurden die erstmals beschriebenen Mutationen mit einem Stern * markiert. MaCa = Mammakarzinom. ◆verstorben

Mutationstypen	
Frameshift Mutation (FS)	Bei Frameshift-Mutationen kommt es aufgrund von Deletionen oder Insertionen von einer oder mehreren Basen zu einer Verschiebung des Leserasters, sodass bei der Translation keine sinnvolle Information für eine Proteinstruktur abgelesen wird. Meist kommt es durch die Verschiebung des Rasters zum vorzeitigen Ablesen eines Stoppkodons und somit zu einem verkürzten Protein.
Spleißmutation (Sp)	Aufgrund einer Spleißmutation kommt es zu einem fehlerhaften Zuschneiden der mRNA und somit zu einem veränderten Protein.
Missense-Mutation (MS)	Bei der Missense-Mutation handelt es sich um eine Punktmutation, die dazu führt, dass das betroffene Kodon für eine andere Aminosäure kodiert. Somit kann es zu Veränderungen in der Proteinstruktur kommen
Nonsense-Mutation (NS)	Durch eine Nonsense-Mutation kommt es, aufgrund des Austauschs eines Nukleotids zur frühzeitigen Kodierung eines Stopp-Signals

Tabelle 22: Erläuterung einzelner Mutationskategorien

4.2.4. Darstellung der Schmelzkurven und der Sequenzen

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Schmelzkurvenanalysen mit den dazugehörigen Sequenzmustern dargestellt. Dabei wird zur Verdeutlichung der mutierten Sequenz ein Wildtyp mit dargestellt, wobei sich die Wildtypsequenz stets im unteren Feld befindet.

1. Exon 5 – c.300T<G

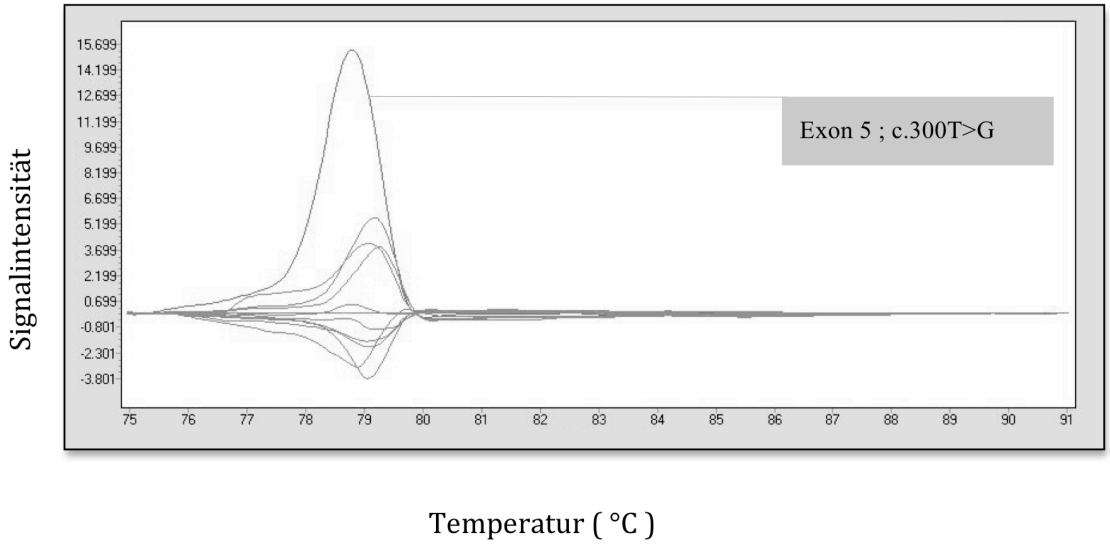


Abbildung 12: Schmelzkurvenanalyse, Exon 5

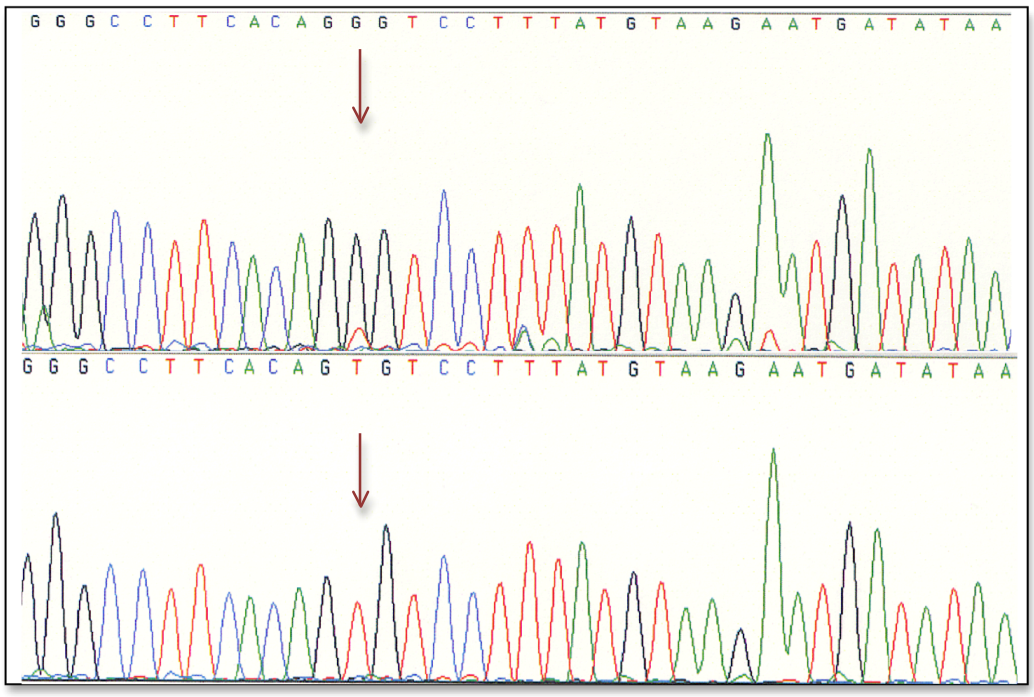


Abbildung 13: Sequenz mit Basenaustausch; Mutation c.300T>G; in der mutierten Sequenz ist der Wildtyp nur noch minimal sichtbar, es könnte sich dabei auch um Reste von Normalgewebe handeln, es handelt sich daher wahrscheinlich um ein LOH.

2. Exon 5 IVS5+1G>T

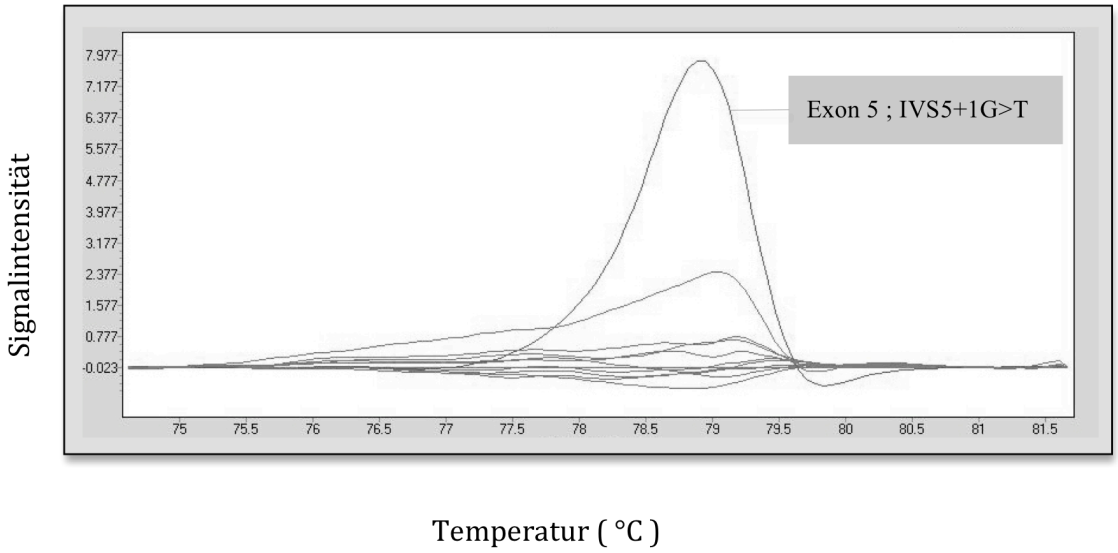


Abbildung 14: Schmelzkurvenanalyse Exon 5

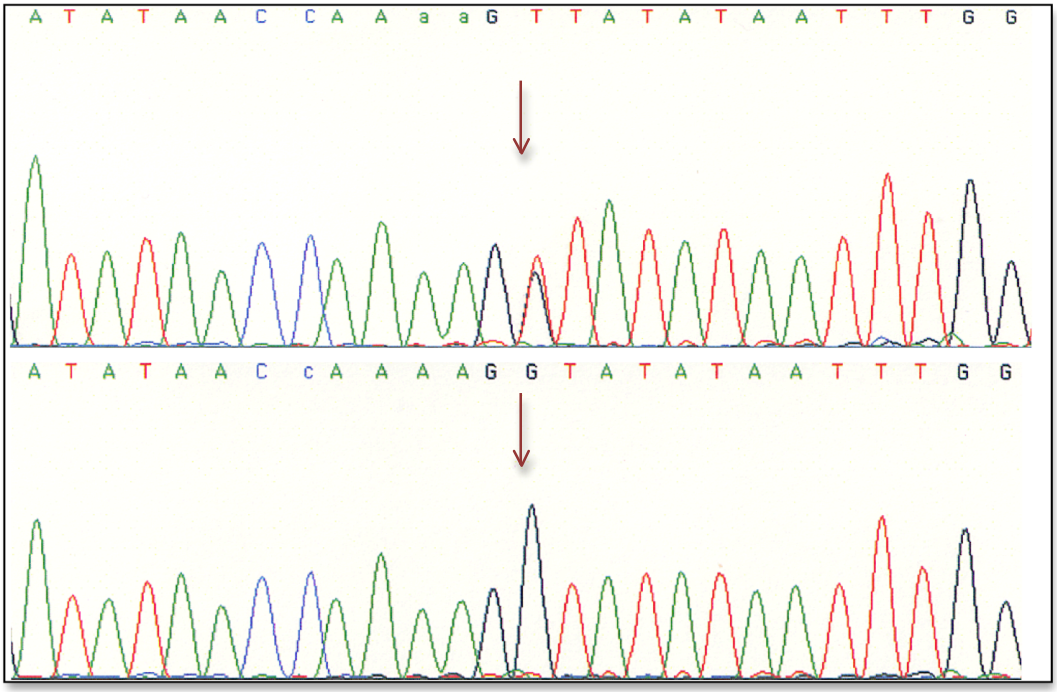


Abbildung 15: Sequenz mit Basenaustausch; Mutation IVS5+1G>T führt zum Spleißdefekt, Wildtypsequenz gut erkennbar, es handelt sich wahrscheinlich um eine heterozygote Mutation im Tumor, oder einen größeren Anteil an Normalgewebe.

3. Exon11-c.3875del4bp

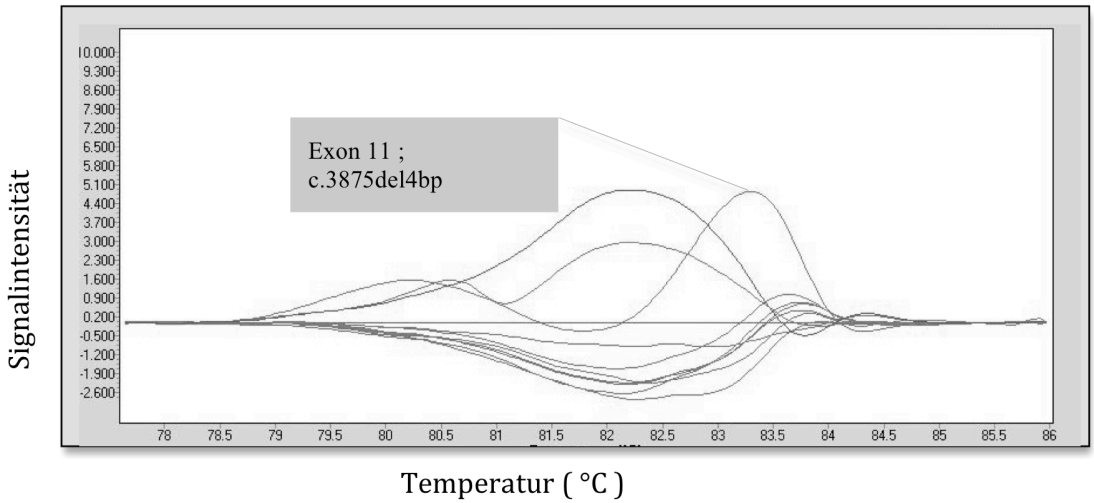


Abbildung 16: Schmelzkurvenanalyse Exon 11

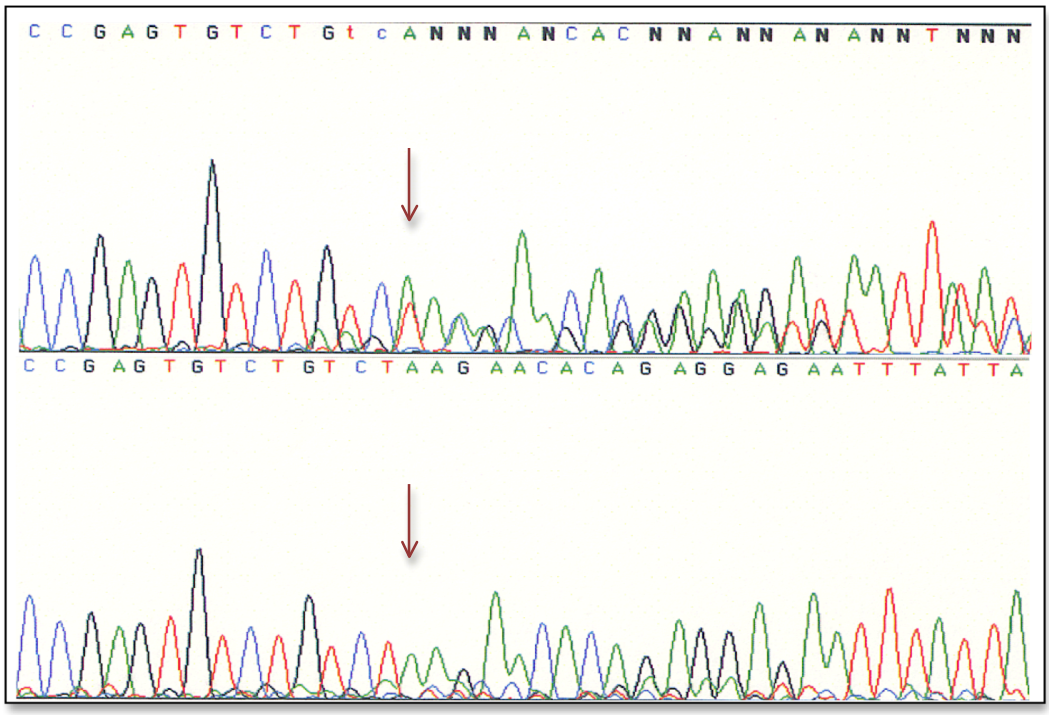


Abbildung 17: Sequenz mit Deletion von 4 bp und Leserasterverschiebung; Mutation c.3875del4bp

4. Exon 16 – c.5007G>T

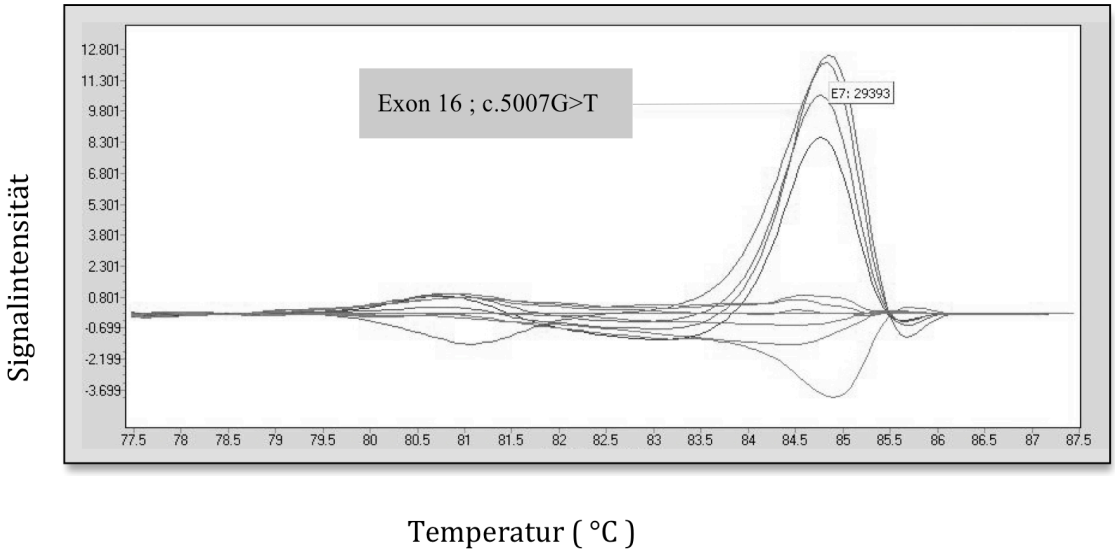


Abbildung 18: Schmelzkurvenanalyse Exon 16

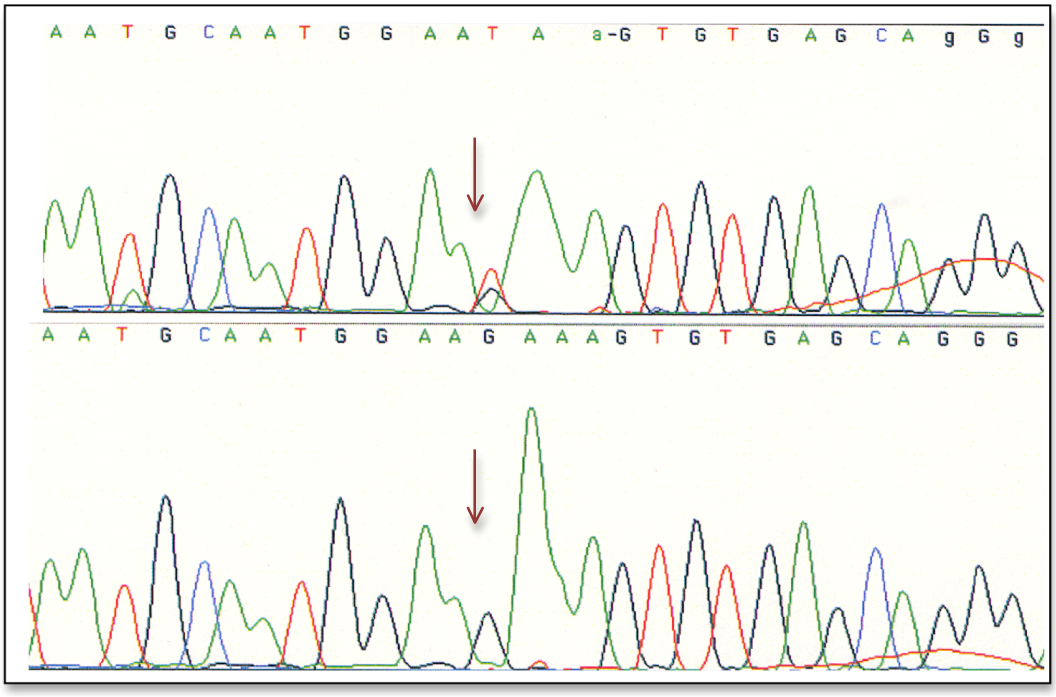


Abbildung 19: Sequenz mit Basenaustausch; Mutation c.5007G>T, in der mutierten Sequenz ist der Wildtyp gut sichtbar, es handelt sich wahrscheinlich um eine heterozygote Mutation oder viel Normalgewebe.

5. Exon 19-c.5298A>T

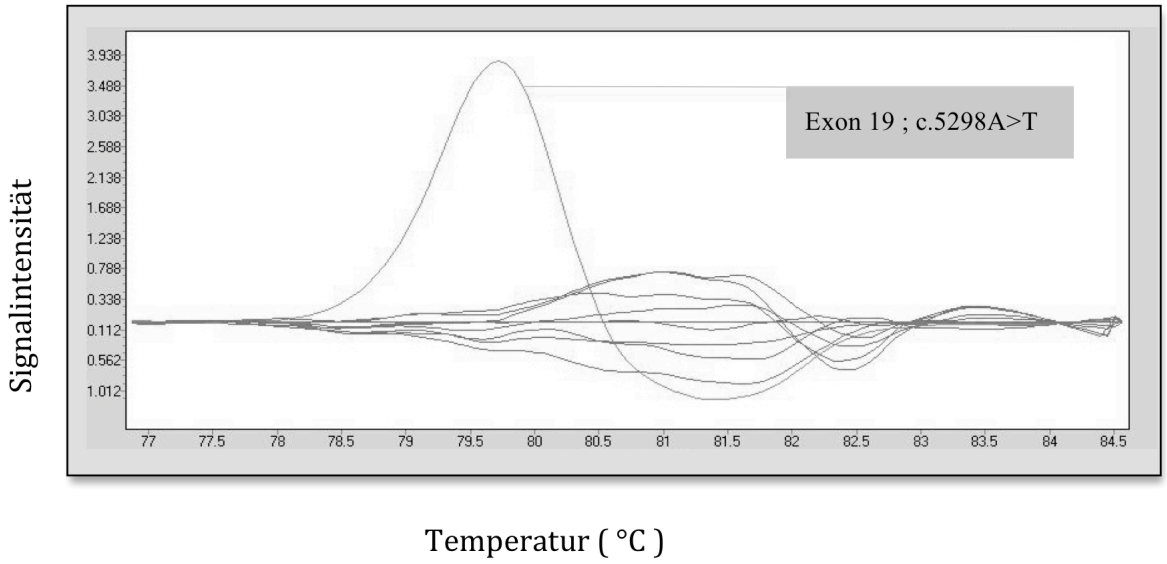


Abbildung 20: Schmelzkurvenanalyse Exon 19

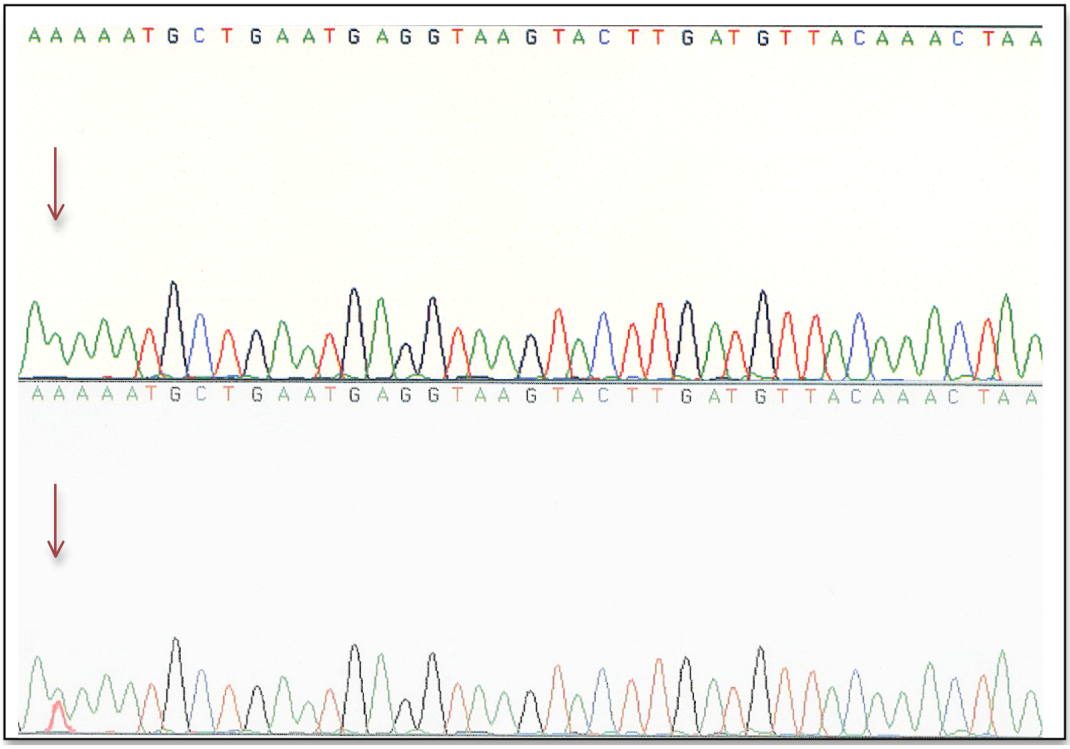


Abbildung 21: Sequenz: Punktmutation A>T, aufgrund verarbeitungstechnischer Gründe und Defekt des Speichermediums mangelhafte Qualität der Darstellung.

6. Exon 19-c.5313delG

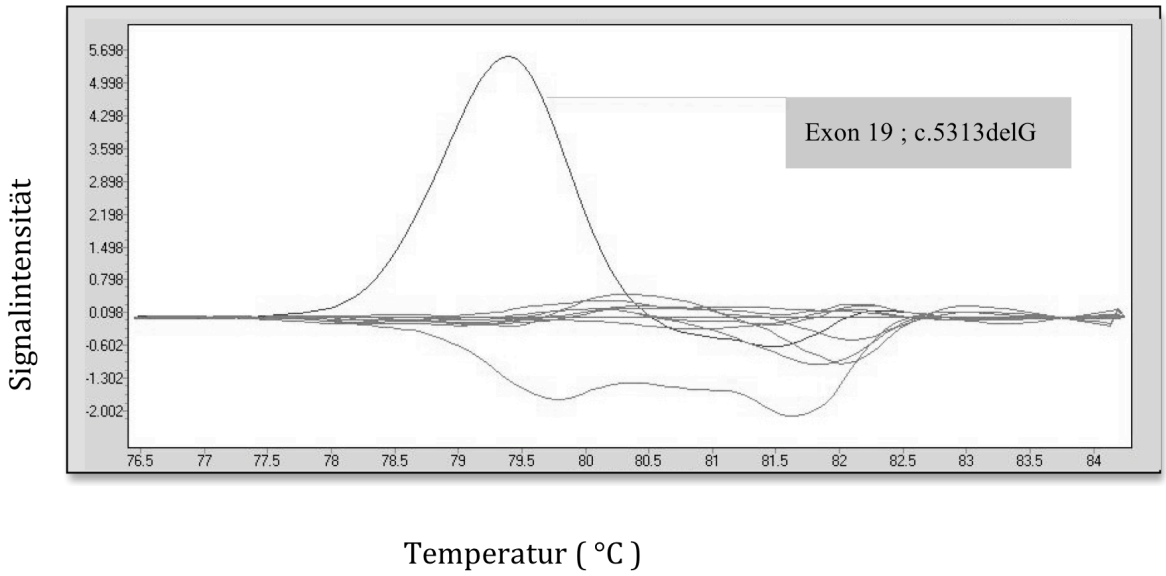


Abbildung 22: Schmelzkurvenanalyse Exon 19

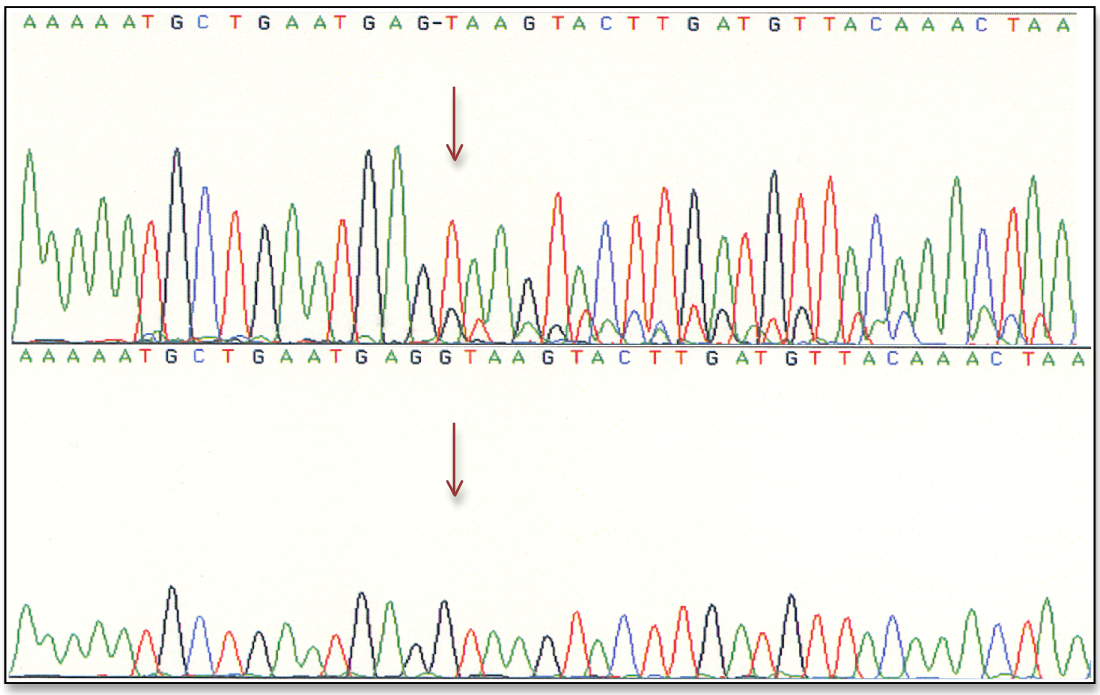


Abbildung 23: Sequenz mit Deletion eines G, dadurch Verschiebung des Leseraster, es ist neben der Wildtypsequenz die mutierte Sequenz zu erkennen, daher handelt es sich wahrscheinlich um eine heterozygote Mutation.

7./8. Exon 20 c.5370C>T und Exon 20 c.5385-5386insC

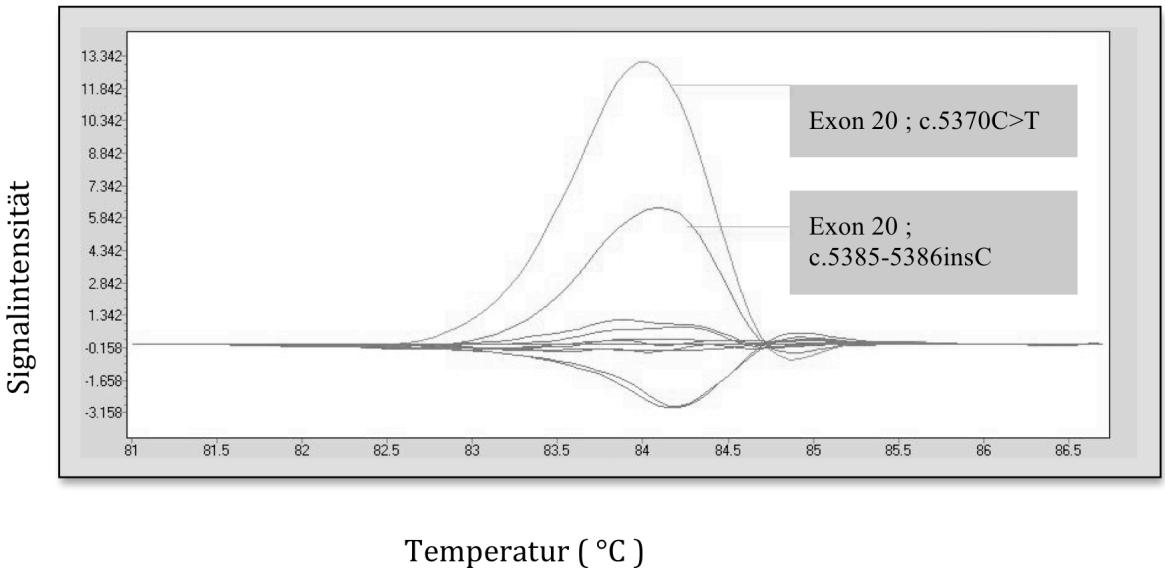


Abbildung 24: Schmelzkurven Exon 20

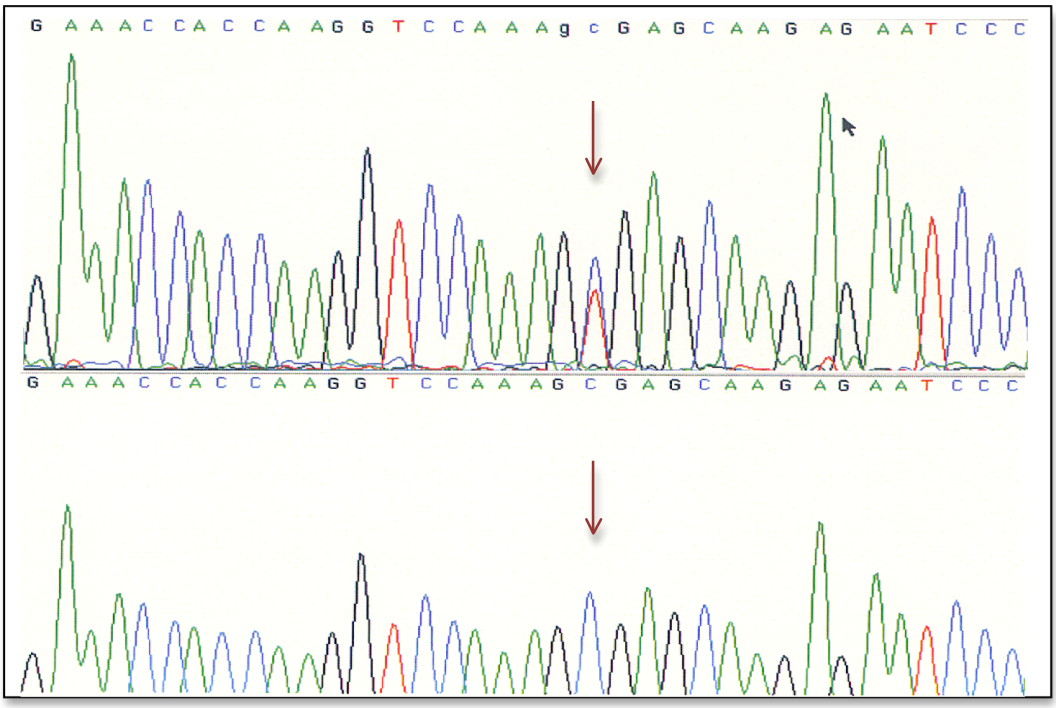
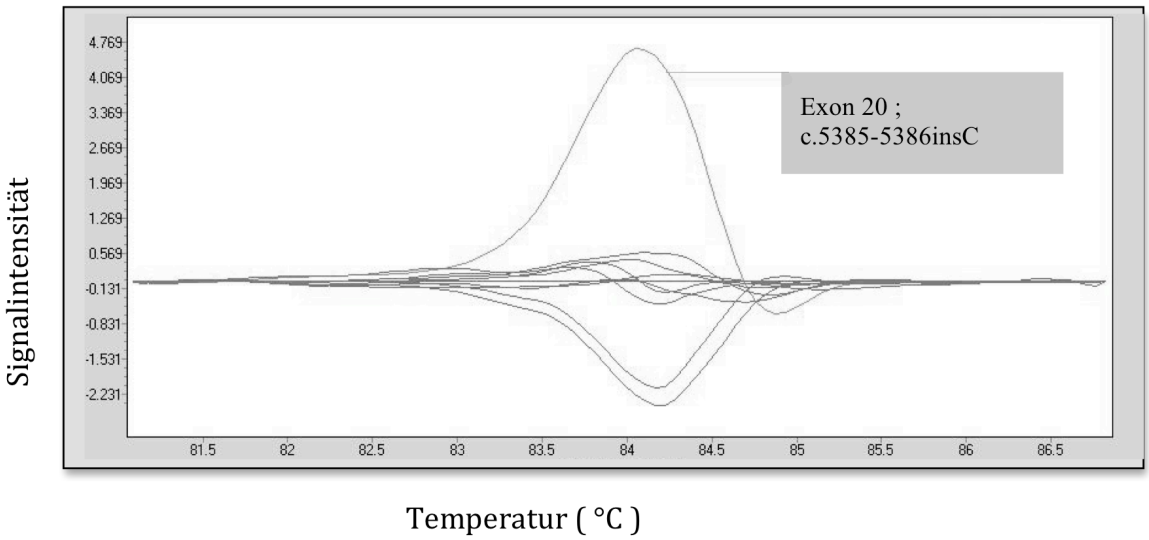


Abbildung 25: c.5370C>T

9. Exon 20 – c.5385-5386insC



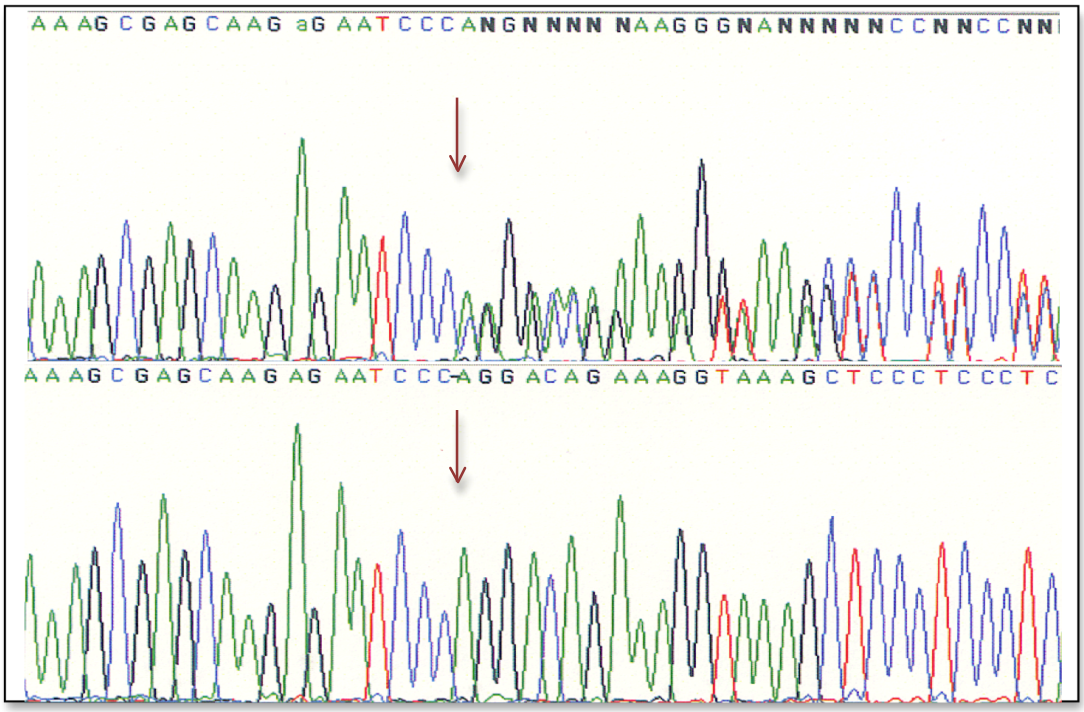


Abbildung 26: c.5385-5386insC

10. Exon 20 – c.5385-5386insC

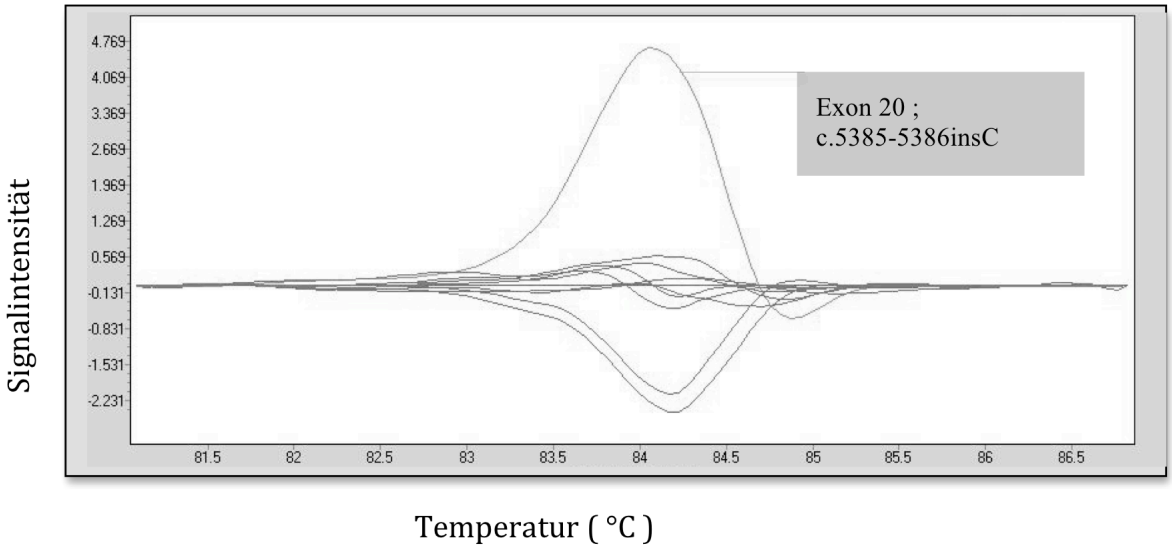


Abbildung 27: Schmelzkurvenanalyse Exon 20

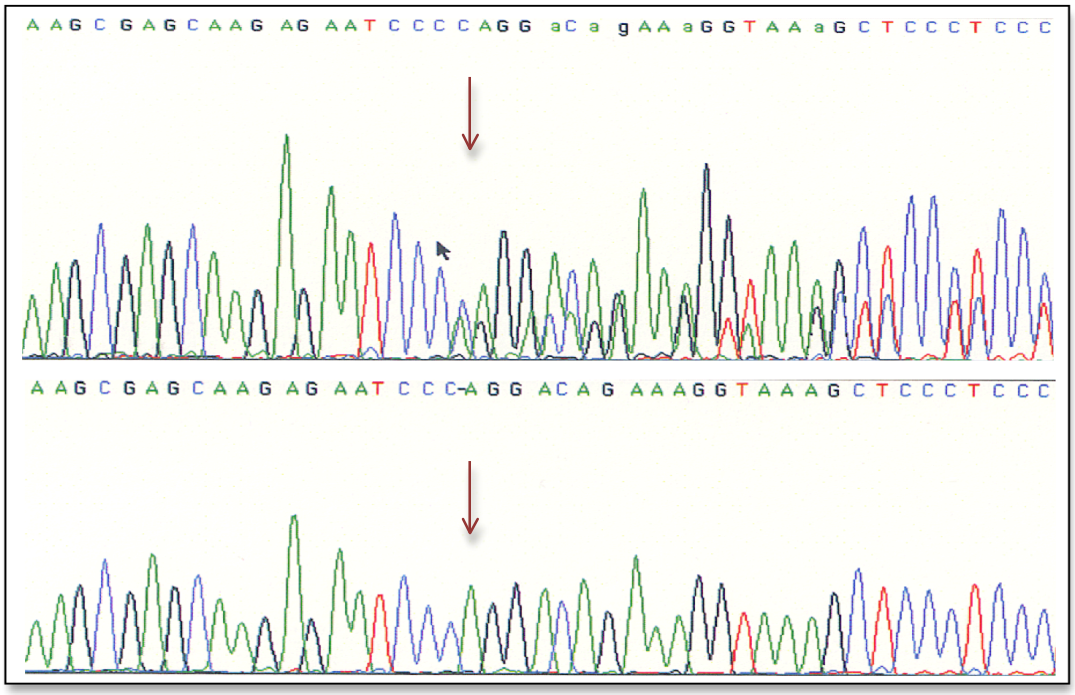


Abbildung 28: Sequenz mit Insertion c.5385-5386ins C und daraus resultierender Leserasterverschiebung, wobei es sich wahrscheinlich um eine heterozygote Mutation handelt.

4.3. Polymorphismen

Neben den pathogenen Mutationen konnten auch zahlreiche Polymorphismen beobachtet werden. Dabei handelte es sich um Einzelnukleotidpolymorphismen, die unter dem englischen Begriff der SNPs (Single nucleotid polymorphismen) zusammengefasst werden können und mit einer Häufigkeit von 1% in großen Populationen vorkommen. SNPs sind mit 90% die häufigsten genetischen Veränderungen im menschlichen Genom. In bestimmten Regionen des Genoms kommen SNPs gehäuft vor, so auch im BRCA1 Gen. Es kann sich dabei um Punktmutationen handeln, die häufig eine stille Mutation darstellen und den Einbau gleichartiger Aminosäuren zur Folge haben. Ein Basenaustausch kann aber auch zu dem Einbau einer anderen Aminosäure führen. Kommt es jedoch durch den Einbau der neuen Aminosäure nicht zur Veränderung der Tertiärstruktur des Proteins, so kann dieses voll funktionsfähig sein. Diese Punktmutationen tragen zur Varianz im menschlichen Genpool bei. Dabei ist die ihnen zukommende Funktion noch nicht vollständig geklärt. Es wird unter anderem vermutet, dass ihr Vorkommen in regulatorischen Regionen zu einer veränderten Transkription führen kann. Es besteht zudem die Annahme, dass sie die Entwicklung von Krankheiten oder auch die Wirksamkeit von Medikamenten beeinflussen können oder auch Hinweise auf weitere im Genom vorliegende Veränderungen geben können. Für die Entwicklung von Brustkrebs und dem Vorliegen von SNPs im BRCA1 Gen konnte jedoch bisher kein eindeutiger Zusammenhang nachgewiesen werden.

Für das BRCA1-Gen ist das Auftreten von so genannten gekoppelten Polymorphismen (Cluster-Polymorphismen) charakteristisch. Kommt bei einem Individuum ein SNP an einer Position des Clusters vor, so finden sich bei ihm auch auf den weiteren Positionen des Clusters die bekannten Polymorphismen. Für die Analyse des BRCA1-Gens umfasst das Cluster gekoppelte SNPs im Exon 11 bis hin zu Exon 16. Die folgende Tabelle zeigt die Cluster-umfassenden Polymorphismen.

EXON/INTRON	NUKLEOTIDPOSITION	CODON	VERÄNDERUNG	AS-AUSTAUSCH
Exon 11	2201	694	C>T	Ser/Ser
Exon 11	2430	771	T>C	Leu/Leu
Exon 11	2731	871	C>T	Pro/Leu
Exon 11	3232	1038	A>G	Glu/Gly
Exon 11	3667	1183	A>G	Lys/Arg
Exon 13	4427	1436	T>C	Ser/Ser
Exon 16	4956	1613	A>G	Ser/Gly
Intron 16	-92	-	A>G	-
Intron 16	-68	-	A>G	-

Tabelle 23: Gekoppelte Polymorphismen des BRCA1 Gen, wie aus der Tabelle hervorgeht findet sich bei 4 Clusterpolymorphismen ein Aminosäureaustausch

4.3.1. Gekoppelte Polymorphismen im Patientenkollektiv

Aufgrund des enormen Aufwandes der Sequenzierung wurde nach der Durchführung des Präscreenings mittels des Light Cyclers exemplarisch ein gekoppelter Polymorphismus des Musters seqenziert. Konnte hier eine Veränderung nachgewiesen werden und das Muster der LightCycler Ergebnisse stimmte überein, wurde der gekoppelte Polymorphismus zugeordnet. In dem Kollektiv konnte so bei 53% der Patientinnen das Auftreten von gekoppelten Polymorphismen nachgewiesen werden, wobei dazu 4 von 10 Mutationsträgerinnen zählten. Es resultiert daraus, dass die Frauen, welche keine pathologische Mutation aufweisen, in 55% der Fälle einen gekoppelten Polymorphismus zeigen. Bei den Mutationsträgerinnen ist dies jedoch nur bei 40% der Frauen der Fall.

4.3.2. Gekoppelte Polymorphismen mit unvollständigem Verlauf

Bei größeren Deletionen im Genom besteht die Möglichkeit, dass es zu Verlusten im Bereich der Clusterpolyregionen kommt. Es kann so dazukommen, dass das Muster der gekoppelten Polymorphismen nicht einheitlich ist. Das heißt der gekoppelte Basenaustausch zeigt sich nicht an allen Loci. Diese Unterbrechung des Musters kann Hinweis auf einen Verlust von Genmaterial sein.

In dem Patientenkollektiv konnten nach genauen Analysen der HRM-Kurven Hinweise darauf gefunden werden, dass bei einer Patientin ein solcher Verlust vorliegt. In einem Fall konnte keine Kontinuität des Clusterpolymorphismus mittels Light Cycler nachgewiesen werden. Hier wurde eine Sequenzierung mehrerer gekoppelter Polymorphismen vorgenommen und es konnte so ein LOH nachgewiesen werden. Der Clusterpolymorphismen zeigte sich nur auf einem Allel, die Patientin ist also heterozygot für diese Variante und hat durch Verlust der Heterozygotie die Sequenz mit dem gekoppelten Polymorphismus teilweise verloren.

4.3.3. Polymorphismen außerhalb des Clusters

Neben den Clusterpolymorphismen kommen im BRCA1- Gen noch weitere Polymorphismen vor, die keinen Krankheitsrelevanz aufweisen. Ihre Bedeutung ist weitgehend unbekannt. Die im Kollektiv gefundenen Polymorphismen werden in der folgenden Tabelle dargestellt.

EXON	POLY	HÄUFIGKEIT ABSOLUT	HÄUFIGKEIT IN %
Exon 11	1186A>G	12	12%
Exon 11	2196G>A	5	5%
Exon 11	3238G>A	4	4%

Es wurde ebenfalls in der BIC Datenbank recherchiert, in welchen Häufigkeiten die Polymorphismen beschrieben wurden. Hier zeigte sich, dass der SNP 1186A>G bereits 82 mal, der SNP 2196G>A 16mal und die Variante 3238G>A 45mal registriert wurden. Aus der Datenbank ist darüber hinaus zu entnehmen, dass der Polymorphismus 2196G>A basierend auf den derzeit verfügbaren Daten keine klinische Bedeutung hat, da der Basenaustausch neutral ist und somit das Protein in seiner Funktion dem des Wildtyps entspricht.

4.3.4. Unklassifizierte Varianten

Es wurde darüber hinaus bei einer Patientin ein Basenaustausch festgestellt, der von der BIC Datenbank als unklassifizierte Variante kategorisiert wird. Es handelt sich dabei um eine Punktmutation, bei der auf Position 4447 anstelle eines G ein A auftritt und es somit zu einem Aminosäureaustausch von Arginin zu Glycin kommt. Jedoch scheint dies nach gegenwärtigem Wissensstand die Funktion des BRCA-Proteins nicht zu verändern.

4.4. Korrelationen und Kreuztabellen

Zur Überprüfung beobachteter Zusammenhänge klinischer Variabeln wurden mit dem tripel-negativen Patientenkollektiv Korrelationsanalysen durchgeführt und. Für niedrige kategoriale Variablen wurden Kreuztabellen erstellt und eine Chi-Quadrat-Testung durchgeführt.

4.4.1. Kreuztabellen

Die Kreuztabellen stellen in Verbindung mit dem durchgeführten Chi-Quadrat-Test den Zusammenhang kategorialer Variabeln des Patientenkollektivs dar und zeigen, ob von dem Kollektiv auf die Grundgesamtheit rückgeschlossen werden kann. Dabei sind folgende Ergebnisse hervorzuheben, die einen klaren statistischen Zusammenhang aufweisen. Hierbei werden die rein klinischen Parameter in Teil A dargestellt, wohingegen die Korrelationen klinischer Parameter mit dem BRCA1-Status im Teil B dargestellt werden.

A) Korrelationen rein klinischer Parameter

Nodalstatus und Metastasen

Die Kreuztabelle stellt den Zusammenhang zwischen Nodalstatus und dem Auftreten von Metastasen dar. Durch statistische Tests mittels Chi-Quadrat Tests konnte gezeigt werden, dass dieser Zusammenhang in dem Patientenkollektiv übertragen auf die Grundgesamtheit bestätigt werden kann. Dabei zeigt sich in der Gruppe, die pN2 und pN3 zusammenfasst, ein vermehrtes Auftreten von Metastasen im Vergleich zu der Gruppe mit den Nodalstadien pN0 und pN1.

		Metastasen		
		Keine	**ja**	**Gesamt**
Nodalstatus	**pN0+pN1**	74	3	77
	pN2+pN3	6	4	10
Gesamt		80	7	87

Tabelle 24: Kreuztabelle mit Darstellung der Häufigkeiten der Variabeln Nodalstatus und Metastasen. Der Nodalstatus bezieht sich auf ein zusammengefasste Variabelen Dabei wurden die Nodalstadien pN0 und pN1 zusammengefasst sowie pN2 und pN3. Die Variabeln für Metastasen wurde in die Kategorien Vorhandensein und Nichtvorhandensein eingeteilt.

	Asymptotische Signifikanz (2 seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	<0,001

Tabelle 25:Chi-Quadrattest nach Pearson

Tumorstadium und Metastasen

Durch die Darstellung der im Kollektiv vorkommenden Tumorstadien und den im Bezug dazu auftretenden Metastasen mit Hilfe der Kreuztabelle wird deutlich, dass höhere T Stadien mit dem Auftreten von Metastasen assoziiert sind. Dieser sich darstellende Zusammenhang konnte mit Hilfe der Chi-Quadrat Testung verifiziert werden, bei einem statistisch signifikanten p-Wert von <0,001.

		Metastasen		
		0	**1**	**Gesamt**
Tumorstadium	**1**	76	1	77
	2	5	6	11
Gesamt		81	7	88

Tabelle 26: Kreuztabelle mit Darstellung der Variabelnhäufigkeiten. Das Tumorstadium stellt eine zusammengesetzte Variable dar. Dabei werden unter 1 die Stadien pT1 und pT2 zusammengefasst, unter 2 die Variablen pT3 und pT4. Die Variabeln für die Metastasen werden nach Vorhandensein und nicht Vorhandensein klassifiziert.

	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	<0,001

Tabelle 27: Chi -Quadrat Test nach Pearson

Nodalstatus und Tumorgröße

Es besteht ein positiver Zusammenhang zwischen Tumorgröße und Lymphknotenbefall.

		Nodalstatus		
		0	**1**	**Gesamt**
Tumorgröße	**1**	48	32	81
(pTzus)	**2**	1	12	14
Gesamt		49	44	95

Tabelle 28: Kreuztabelle zur Darstellung von Tumorgröße und Nodalstatus. Dabei werden unter 1 die Stadien pT1 und pT2 zusammengefasst, unter 2 die Variablen pT3 und pT4.

	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	<0,001

Tabelle 29: Chi-Quadrat nach Pearson

B) Korrelationen klinischer Parameter mit dem BRCA1-Status

Statistisch nicht signifikante zusammenhängende Variablen

Eine Abhängigkeit der folgenden Variabeln konnte hingegen nicht auf die Grundgesamtheit übertragen werden. Es bestand somit kein Zusammenhang zwischen den Mutationsträgern und dem vermehrten Auftreten von Metastasen, höheren Nodal-Stadien oder Tumorgrößen, Darüberhinaus konnte auch kein statistisch signifikanter Unterschied in den angewendeten Therapieregimen zwischen Nicht-Mutationsträgerinnen und Mutationträgerinnen nachgewiesen werden. Es bestand zudem sowohl kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Clusterpolymorphismen als auch dem von übrigen SNPs in Bezug zum Mutationsstatus. Obwohl ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Alter und dem Menopausenstatus im gesamten BRCA1-Kollektiv besteht, das sowohl die Mutationsträgerinnen als auch die BRCA1-Methylierung berücksichtigt (unpublizierte Ergebnisse der Arbeitsgruppe), konnte dieser Zusammenhang nicht für die BRCA1-Mutationsträgerinnen allein bestätigt werden. Der Chi-Quadrat Test erbrachte für den Zusammenhang von BRCA1-Mutationstatus und Menopausenstatus einen p-Wert von 0,137. Die Auswertung der Beziehung zwischen dem Mutationsstatus und dem Alter über bzw. unter 50 Jahre erbrachte einen durch Chi-Quadrat-Testung ermittelten p-Wert von 0,067.

Alter und BRCA1-Mutation

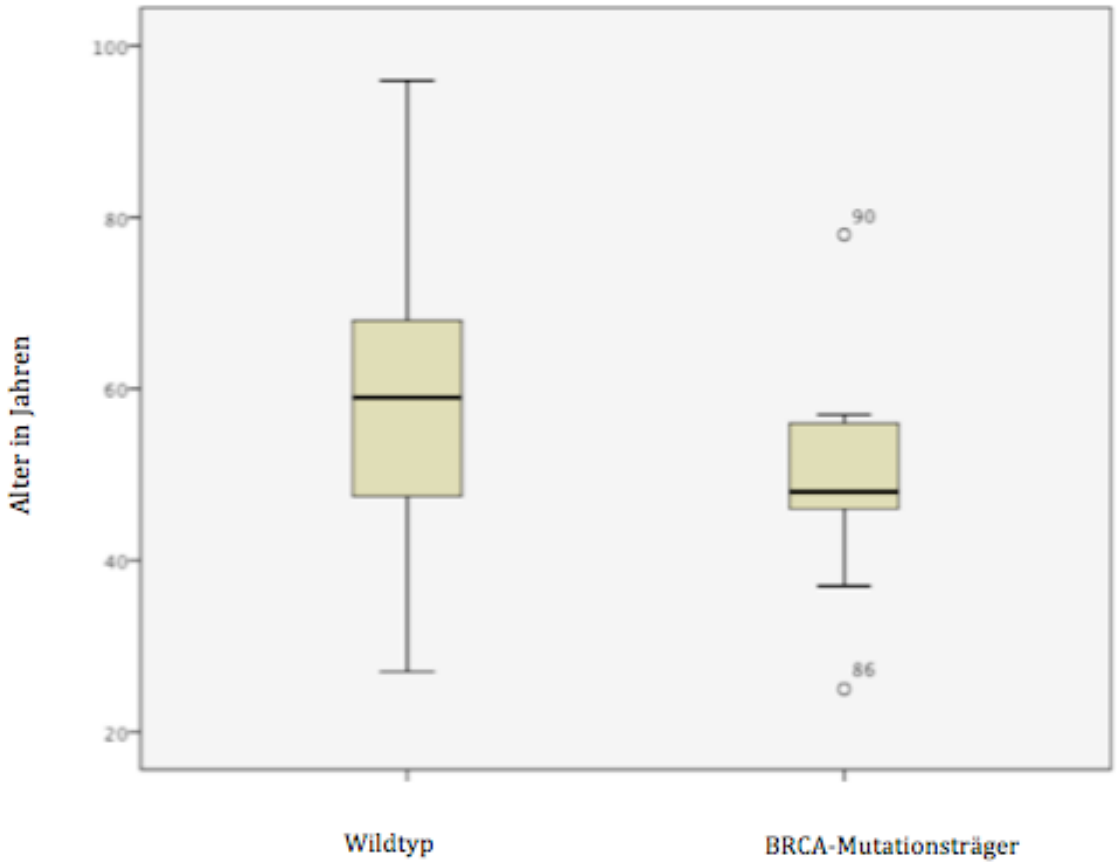


Abbildung 29: Altersstruktur der Mutationsträger und Wildtypen im Box-Plot. Die folgende Abbildung stellt das Erkrankungsalter der Wildtypen und der Mutationsträgerinnen gegenüber. Obwohl sich graphisch der Eindruck eines früheren Erkrankungsalters bei den Mutationsträgerinnen ergibt, konnte dies nicht mit statistischer Signifikanz bestätigt werden.

4.4.2. Klinische Eigenschaften von Wildtypen und Mutationsträgern im Vergleich

Die folgende Tabelle zeigt eine Gegenüberstellung klinischer Eigenschaften von Wildtypen (WT) und Mutationsträgerinnen im Vergleich. Die statistische Bewertung wurde mittels Chi-quadrat Testung durchgeführt.

CHARAKTERISTIKA	TOTAL		BRCA1-MUTATION		BRCA1-WILDTYP		P-WERT
Alter bei Diagnose	57,8						
Alter<50 Jahre	33	34%	6	60%	27	31,7%	
Alter >50 Jahre	64	66%	4	40%	60	68,9%	
							0,067
Menopausenstatus							
Premenopausal	30	32%	5	55%	26	30,8%	
Postmenopausal	62	66%	4	45%	58	68,2%	
Perimenopausal	1	1%					
							0,137
Tumorstatus							
pT1	37	39%	5	50%	32	37%	
pT2	44	46%	4	40%	40	47%	
pT3	5	5%	0	0%	5	5,8%	
pT4	9	9%	1	10%	8	9,4%	
							0,792
Histol. Grading							
G1	4	4%	0		4	4,7%	
G2	15	16%	3	30%	12	14,2%	
G3	76	83%	7	70%	69	81,2%	
							0,361
Nodal-Status							
Positiv	45	52%	1	10%	45	53,5%	
Negativ	49	48%	9	90%	40	47,6%	
							0,031
Polymorphismen							
Ja	61	62,9%	6	60%	55	63,2%	
Nein	36	37,1%	4	40%	32	36,8%	
							0,842
Metastasen							
Ja	7	8%	1	10%	7	8,8%	
Nein	81	92%	9	90%	72	91,1%	
							0,325

Tabelle 30: Klinische und histopathologische Kriterien im Vergleich zwischen Mutationsträgerinnen und Wildtypen

Nur eine Mutationsträgerin weist einen positiven Lymphknotenstatus auf, wohingegen 53,5% der Patientinnen ohne BRCA1-Mutation einen Lymphknotenbefall zeigen (p=0,031).

4.5. Statistiken zum Überleben und rezidivfreien Intervall

Zur Auswertung des Gesamtüberlebens und der rezidivfreien Intervalle im Patientenkollektiv wurden absolute und relative Häufigkeitsberechnungen durchgeführt. Die rezidivfreien Intervalle und das Gesamtüberleben wurden im zeitlichen Verlauf betrachtet. Zudem wurden zur graphischen Darstellung der Überlebensstatistik Kaplan-Meier-Kurven für Gesamtüberleben und rezidivfreie Intervalle berechnet.

4.5.1. Rezidivfreies Überleben

	Häufigkeiten	Gültige Prozent (%)
rezidivfrei	63	71,5
rezidiv	25	28,4
gesamt	88	100
fehlend	9	0
gesamt	97	100

Tabelle 31: Häufigkeitsverteilungen zum rezidivfreien Überleben mit Darstellung der aufgetretenen Rezidive und Anzahl an rezidivfreien Patientinnen

In 25 Fällen wurde im Verlauf ein Rezidiv innerhalb des beobachteten Zeitintervalls (bis zu 194 Monaten bei einem medianen Followup von 63 Monaten) nachgewiesen, dies entspricht einem Anteil von 28,4% an dem Patientenkollektiv. 63 der Patientinnen, also 71,5%, sind bis heute rezidivfrei und es konnte keine Krankheitsprogression nachgewiesen werden. Bei 9 Patientinnen konnten keine Daten zum aktuellen Zustand erhoben werden. Beim Vergleich der Gruppe der BRCA1-Mutationsträgerinnen mit Patientinnen mit Wildtyp-BRCA1 zeigte sich, dass der Anteil an Rezidiven in der Gruppe der Mutationsträgerinnen geringer war. Eine Mutationsträgerin erlitt allerdings ein Rezidiv im Alter von 37 Jahren

	Rezidiv	Relative Anteil
Mutationsträger (n= 8)	1	20%
Keine Mutation (n= 90)	24	27,2%

Tabelle 32 Rezidivhäufigkeit bei Mutationsträgerinnen und Wildtypen

4.5.2. Rezidivfreies Überleben nach 1, 2 und 5 Jahren

Jahre	Rezidivfreiefreies Überleben(%)	Standardfehler (%)
1	88%	+/- 3,4%
2	86%	+/-4,3%
5	68%	+/-5,3%

Tabelle 33: Mediane rezidivfreie Intervalle

Wählt man eine Darstellung, welche das rezidivfreie Überleben nach 1, 2 und 5 Jahren schätzt, so zeigt sich für das erste Jahr, dass 88% (bei einem Standardfehler von +/- 3,4%) der Patientinnen kein Rezidiv erlitten haben. Innerhalb des postoperativen Intervalls von 2-5 Jahren fällt der Median des progressionsfreien Überlebens um 18% von 86% auf 68% ab, wobei der Standardfehler sich vergößert.

4.5.3. Rezidivmuster

Gesamtzahl Rezidive n=25	Rezidiv innerhalb 3 Jahre	Prozent
Jahr 0-3 postoperativ	22	88%
Ab dem dritten Jahr p.o.	3	12%

Tabelle 34: Zeitliche Verteilung der Rezidive

Wie bereits erwähnt, konnte bei 25 Patientinnen das Auftreten eines Rezidivs beobachtet werden, wobei bei 88% der Patientinnen der Krankheitsrückfall innerhalb der ersten drei Jahre postoperativ stattfand. Bei lediglich drei der Patientinnen trat das Rezidiv nach einer Zeitspanne auf, die länger als drei Jahre betrug. Es wird also deutlich, dass im Falle eines Rezidivs dies mit einer hohen Wahrscheinlichkeit innerhalb der ersten drei Jahre auftritt. Nach drei Jahren ist das Risiko für ein Rezidiv in dem tripel-negativen Patientenkollektiv mit 12% gering. Dabei traten die drei beobachteten Rezidive im 4. bis 5. Jahr postoperativ auf.

4.5.4. Kaplan-Meier-Kurven zum progressionsfreie Überleben

Zur graphischen Darstellung wurden Kaplan-Meier Kurven erstellt, die das rezidivfreie Überleben von BRCA1-Mutationsträgerinnen im Vergleich zu Patientinnen mit Wildtyp-BRCA1 wiedergeben.

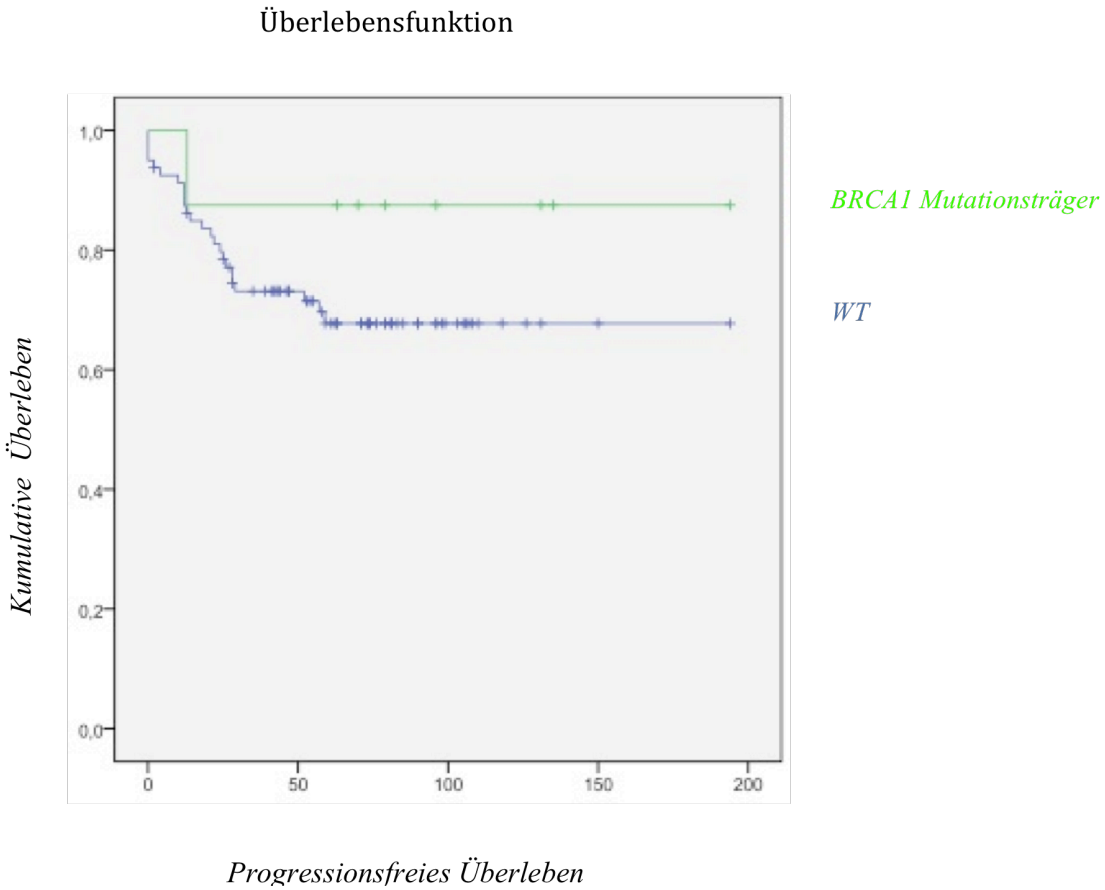


Abbildung 30: Kaplan-Meier-Kurve zum progressionsfreien Überleben

Obwohl sich ein Vorteil im rezidivfreien/progressionsfreien Überleben für Mutationsträgerinnen in der graphischen Darstellung abzeichnet, liegt hier keine statistische Signifikanz vor. Die im Log-Rank-Test ermittelten Werte zur Signifikanztestung ergaben einen p-Wert von 0,284. Dieser Test ermittelt, ob Gleichheit der Überlebensverteilung bei den verschiedenen Stufen des BRCA1 Status vorliegt. Es konnte kein signifikantes progressionsfreies Überleben der Mutationsträgerinnen bestätigt werden.

4.5.5. Gesamtüberleben

	Häufigkeiten	Gültige Prozent (%)
überlebt	65	72,2
verstorben	25	27,7
gesamt	90	100
fehlend	7	0
gesamt	97	100

Tabelle 35: Häufigkeitsverteilung zum Gesamtüberleben mit Darstellung der lebenden und verstorbenen Patientinnen

Bis zum heutigen Zeitpunkt konnten die Überlebensdaten von 90 Patientinnen des Kollektivs erhoben werden. Es sind im Verlauf 25 Patientinnen verstorben, was einem Anteil von 27,7% entspricht, wobei sich die Beobachtungszeiträume für die einzelnen Patientinnen unterscheiden. Derzeit sind 72,2% der Patientinnen des Kollektivs am Leben.

4.5.5. Gesamtüberleben im Verlauf nach 1, 2 und 5 Jahren

Jahre	Medianes Überleben (%)	Standardfehler (%)
1	94%	+/- 2,5%
2	79%	+/-4,4%
5	72%	+/-4,9%

Tabelle 36: Medianes Gesamtüberleben

Um den Verlauf der auftretenden Sterbefälle besser beurteilen zu können, wurde das Gesamtüberleben für das erste, das zweite und das fünfte Jahr postoperativ geschätzt. Dabei muss, wie obige Tabelle zeigt, der Standardfehler berücksichtigt werden. Nach einem Jahr waren noch 94% der Patientinnen am Leben wobei sich eine Reduktion zum zweiten postoperativen Jahr von 15% auf 79% anschloss. Im fünften Jahr konnte eine Überlebensrate für das mediane Überleben von 72% beobachtet werden mit zunehmender Unsicherheit des Standardfehlers.

4.5.6. Todesfälle bei Mutationsträgerinnen und Wildtypen im Vergleich

Bei einer Beobachtungszeit von bis zu 194 Monaten und einem medianen Followup von 63 Monaten verstarben 25,7% der Patientinnen. Dabei war der Anteil bei den Mutationsträgerinnen etwas geringer. Das Alter der verstorben Mutationsträgerinnen lag einmal bei 46 Jahren und einmal bei 47 Jahren.

	verstorben	Relativer Anteil
Mutationsträger (n=10)	2	20%
Keine Mutation (n=87)	23	26,4%

Tabelle 37: Todesfälle bei Mutationsträgerinnen und Patientinnen mit Wildtype-BRCA1

4.5.8. Kaplan-Meier-Gesamtüberleben

Es folgt die graphische Darstellung des Gesamtüberlebens des Patientenkollektives, vergleichend für BRCA1-Mutationsträgerinnen und Patientinnen mit BRCA1-Wildtyp.

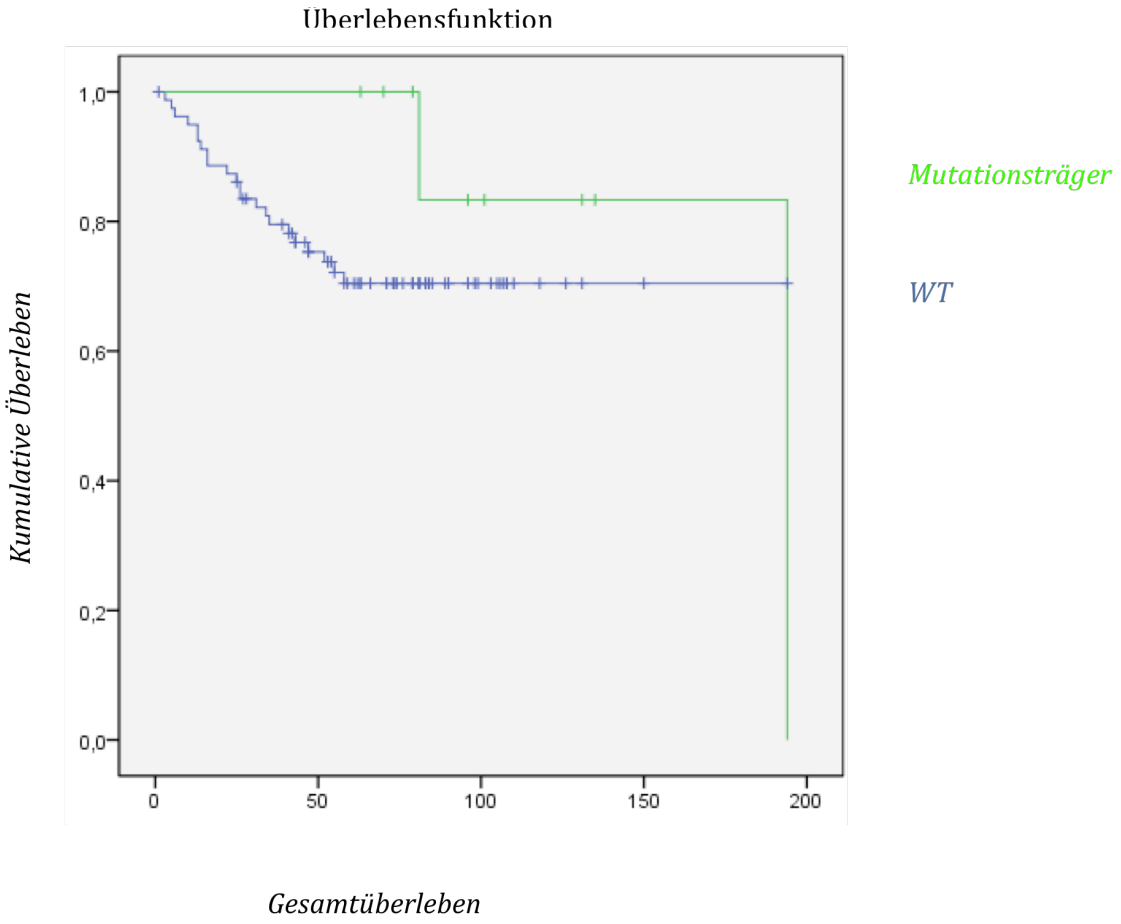


Abbildung 31: Kaplan-Meier-Gesamtüberleben

Die für das Gesamtüberleben ermittelte Kaplan-Meier-Kurve und der durchgeführte Log-Rank Test (p-Wert = 0,395) ergaben keinen signifikanten Vorteil für Mutationsträgerinnen.

4.6. Regressionsanalysen und prognostisch relevante Parameter für das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben

4.6.1. Cox-Regression und Hazard-Ratio

Um den prognostischen Wert klinischer und molekularbiologischer Parameter für das Gesamtüberleben (OS) und auch das progressionsfreie Überleben (PFS) festzulegen, wurde das COX- Modell und der Hazardratio bemüht. Es wurden sowohl multivariate als auch univariate Analysen durchgeführt.

4.6.2. Univariate Cox-Regressionsanalysen

Vorhersagende Parameter für das progressionsfreie Überleben.

Vorhersagende Parameter für das progressionsfreie Überleben		
Variabeln	Univariate Analyse [1]HR (95%KI)	p
Alter		
<50 Jahren	1	
>50 Jahre	2,294 (0,861-6,116)	0,097
Menopausenstatus		
Prämenopausal	1	
postmenopausal	2,299 (0,862-6,128)	0,096
Tumorgröße		
pT1+2	1	
pT3+4	6,524 (2,819-15,100)	<0,001*
Nodalstatus		
pN0+1	1	
pN2+3	4,135 (1,703-10,042)	0,002*
Histolog. Grading		
G1+2	1	
G3	1,124 (0,485-2,603)	0,785
Adj. Chemotherapie		
Ja	1	
Nein	0,644 (0,257-1,618)	0,349
Mutationsstatus		
WT-BRCA1	1	
Mutant-BRCA1	0,353 (0,048-2,615)	0,308
1 Cox –Regressionsanalyse, HR = Hazard Ratio , * statitisch signifikant		

Tabelle 38: Univariate Cox-Regressionsanalyse für das progressionsfreie Überleben (PFS)

In der univariaten Analyse zeigte sich, dass die klinischen Parameter Nodalstatus und T-Stadium mit einem schlechteren Rezidivfreien Überleben assoziiert sind.

Vorhersagende Parameter für das Gesamtüberleben		
Variabeln	Univariat HR (95%KI)	p
Alter		
<50 Jahre	1	
>50 Jahre	2,463 (0,917-6,620)	0,074
Menopausenstatus		
Prämenopausal	1	
Postmenopausal	2,943 (1,000-8,666)	0,050*
Tumorgröße		
pT1+2	1	
pT3+4	8,166 (3,585-18,600)	0,0001
Nodalstatus		
pN0+1	1	
pN2+3	3,992 (1,658-9,614)	0,002*
Histol. Grading		
G1+2	1	
G3	1,358 (0,520-3,548)	0,532
Adj. Chemotherapie		
Ja	1	
Nein	0,377 (0,159-0,893)	0,027*
Mutationsstatus		
WT	1	
Mutant	0,532 (0,121-2,335)	0,403
1 Cox –Regressionsanalyse, HR = Hazard Ratio , * statitisch signifikant		

Tabelle 39: Univariate Regressionsanalyse für das Gesamtüberleben (OS)

In der univariaten Analyse des Gesamtüberlebens zeigt sich, dass die klinischen Parameter Nodalstatus, T-Stadium und eine fehlende Chemotherpie mit einer schlechteren Prognose für das Gesamtüberleben assoziiert sind.

4.6.3. Multivariate Cox Regressionsanalysen

Die multivariaten Cox-Regressionsanalysen schließen die wichtigsten prognostischen Parameter ein und zeigen deren Bedeutung sowohl für das Gesamtüberleben als auch für das progressionsfreie Überleben.

Multivariate COX Regression des PFS		
Variable	HR (95%KI)	p
Tumorstadium	5,196(2,026-13,329)	,001
Nodalstatus (zusammengesetzt)	3,747 (1,424-9,861)	,007
BRCA1-Mutationsstatus	0,154 (0,019-1,250)	,080

Tabelle 40: Multivariate Cox-Regressionsanalyse für DFS und BRCA1-Mutationsstatus

Multivariate COX Regression des OS		
Variable	HR (95%KI)	p
Tumorstadium	6,383 (2,521-16,157)	,000
Nodalstatus	2,606 (0,974-6,974)	,057
BRCA-Mutationstatus	,230 (0,39-1,371)	,107

Tabelle 41: Multivariate Cox-Regressionsanalyse für OS und BRCA1-Mutationsstatus

Im Zusammenhang mit dem BRCA1-Mutationsstatus zeigen sich der Nodalstatus und die Tumorgröße als unabhängige prognostische Parameter für das rezidivfreie Überleben. Für das Gesamtüberleben stellt nur die Tumorgröße einen unabhängigen prognostischen Faktor dar.

4.6.4. Confounder-Effekte in Bezug auf das Gesamtüberleben und den BRCA1-Mutationsstatus

Es erfolgte eine konsekutive Berücksichtigung der potentiellen Confoundervariablen pT und Nodal Status.

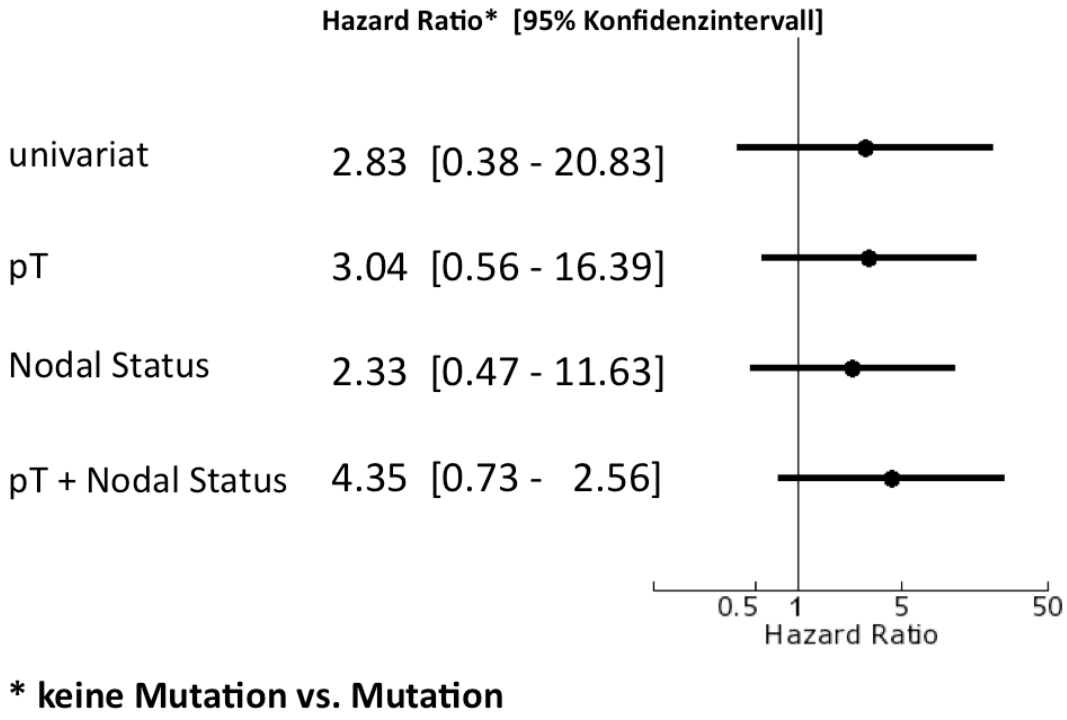


Abbildung 32: Potentielle Confounder-Variable

Es konnte keine substantielle Evidenz für einen Confounder-Effekt ermittelt werden, was für die Unabhängigkeit des beobachteten klinisch durchaus relevanten Effekts des BRCA1-Mutationsstatus auf das Überlebens spricht.

5. Diskussion

Der tripel-negative Brustkrebs, gekennzeichnet durch spezifische klinische und molekularbiologische Eigenschaften, bildet eine Subgruppe der malignen Erkrankungen der Brustdrüse, von der vor allem junge Frauen betroffen sind. Aufgrund der schlechteren Prognose, die mit diesem Subtyp assoziiert ist und der derzeit noch fehlenden zielgerichteten Therapieoptionen, gilt das besondere Interesse der Erforschung spezifischer Tumoreigenschaften, die zu einer Verbesserung der Therapieregime und somit zu einer Verbesserung des langfristigen Überlebens der betroffenen Patientinnen genutzt werden können. Im Fokus steht dabei unter anderem die Assoziation mit genetischen Veränderungen des BRCA1-Gens innerhalb der Gruppe der tripel-negativen Tumoren. Die Rolle dieses Tumorsuppressorgens für die Entstehung hereditärer Mammakarzinome ist seit langem bekannt und deren Bedeutung für die genetische Diagnostik betroffener Familien unumstritten. Tripel-negative Tumore, die bei BRCA1-Mutationsträgerinnen entstehen, zeigen zudem meist ein basales Expressionsmuster. Ob das BRCA1-Gen und dessen Expressionsprodukt im Umkehrschluss auch für die Entwicklung des (basalen) tripel-negativen Phänotyps von Bedeutung sind, wird derzeit intensiv diskutiert. Dieser Arbeit liegt daher die Fragestellung nach der tatsächlichen Häufigkeit von Mutationsträgern des BRCA1-Gens in einem unselektierten tripel-negativen Kollektiv innerhalb der deutschen Bevölkerung zugrunde. Dabei wurde zum einen die Inzidenz von Keimbahnmutationen bei unklarer familiärer Belastung im tripel-negativen Kollektiv, vor dem Hintergrund eines möglichen genetischen Screenings und der intensiveren Betreuung erruiert. Zum anderen sollte die Häufigkeit von somatischen Mutationen im tripel-negativen Kollektiv eingeschätzt werden. Darüber hinaus stellt sich die Frage nach der prognostischen Relevanz, die durch das Vorhandensein einer genetischen Alteration im Hinblick auf mögliche neue Therapiestrategien determiniert wird. Ableitungen aus den gewonnen Daten hinsichtlich genetischer Beratung und neuer Therapiestrategien sollen diskutiert werden.

5.1. Diskussion Methodik

Die genetische Beratung und Diagnostik stellt einen wichtigen Teil der Therapie und der Entwicklung von Präventionsstrategien des familiären Mammakarzinoms dar. Die prädiktive genetische Diagnostik wird deutschlandweit vor allem in spezialisierten Zentren durchgeführt, die über das Deutsche Konsortium für hereditäres Mamma- und Ovarialkarzinom verbunden sind und initial von der deutschen Krebshilfe unterstützt wurden. Eine durch das Konsortium

durchgeführte umfassende Multizenter-Studie bezüglich des Mutationsprofils der deutschen Bevölkerung zeigte die Bedeutung der genetischen Testung im Rahmen von hereditärem Brustkrebs auf. Die Leitung der Tumorgenetischen Beratung an der Frauenklinik des Klinikums rechts der Isar obliegt Herrn Professor Dr. Meindl, dessen Arbeitsgruppe genetische Diagnostik mit Hilfe neuester Analysemethoden durchführt. Neben anderen molekularbiologischen Methoden stellt die Schmelzkurvenanalyse eines der wichtigsten und modernsten Verfahren dar. Die Erfahrungen der Arbeitsgruppe mit der Mutationsanalyse mittels HRM-Analyse wurden für die Durchführung dieses Projekts genutzt.

Die Schmelzkurvenanalyse ist eine schnelle und kostengünstige Methode zur Durchführung von Mutationsanalysen. Diese validierte Methode ermöglicht es in der genetischen Routinediagnostik schnell und zuverlässig eine große Anzahl an Probenmaterial mit guter Sensitivität und Spezifität zu analysieren (van der Stoep, van Paridon et al. 2009). Dieses Verfahren eignete sich daher gut zur Durchführung des Mutationscreenings in dem von uns analysierten tripel-negativen Kollektiv. Die verwendeten Primer wurden in Anlehnung an die Versuchsreihe von van de Stoep et al. (van der Stoep, van Paridon et al. 2009) ausgewählt und entsprechen den von der Arbeitsgruppe Meindl für die Routinediagnostik verwendeten Primern. Mit Hilfe der gewählten Primersequenzen konnte so der gesamte kodierende Bereich des BRCA1-Gens untersucht werden. Heterozygote Mutationen konnten sicher ermittelt werden. Wie wichtig die geeignete Primerauswahl für die Qualität der Ergebnisse ist, stellten Van de Stoep et al. heraus. Mit bestimmten Primern konnten sie keine sichere Detektionswahrscheinlichkeit für homozygote Mutationen erreichen (van der Stoep, van Paridon et al. 2009). Vor allem bei der Detektion der sogenannten Clusterpolymorphismen konnte unser Labor gezielt zwischen homozygoten und heterozygoten Varianten unterscheiden.

In der Routinediagnostik werden die Mutationsanalysen mit DNA durchgeführt, die mittels DNA-Extraktion aus Leukozyten gewonnen wird. In unserem Fall wurde die DNA jedoch aus tripel-negativem Tumorgewebe gewonnen, weshalb die Reaktionsbedingungen für die Realtime-PCR angepasst werden mussten. Es zeigte sich, dass die Qualität der aus Brustkrebsgeweben gewonnen DNA nicht mit der aus Blutzellen extrahierten DNA zu vergleichen ist. Daraus resultierte unter anderem eine breitere Streuung der Schmelzkurven, wodurch die Auswertung erschwert wurde. Es zeigte sich jedoch ein starker Zusammenhang zwischen der Qualität der durchgeführten PCR und der Darstellung der Schmelzkurve. Wies die durchgeführte PCR eine geringe Amplifikationsrate auf, so resultierten häufig auch flasch-

positive Schmelzkurven. Daher wurde immer die Qualität der durchgeführten PCR bei der Analyse der Schmelzkurven berücksichtigt und für die Entscheidung, ob eine Sequenzierung angeschlossen werden soll, herangezogen. Bei sehr schlechten PCR-Ergebnissen, die eine valide Auswertung verhinderten, musste eine Wiederholung der Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden. Eine weitere Strategie bei der Auswertung der Schmelzkurven stellte die Bearbeitung der Kurven mit Hilfe des Normalisierungsprogramms des LC 480 von Roche dar. Auf diese Weise konnte häufig eine bessere Darstellung erzielt werden. Die Normalisierung wurde durch Verschiebung der Ableitungsbereiche geändert. Bei der Neufestlegung der Bereiche konnte eine von der Arbeitsgruppe Meindl durchgeführte Versuchsreihe zu Rate gezogen werden. Bei nicht eindeutigen Schmelzkurven, die von der Wildtypsequenz abwichen, wurde immer eine direkte Sequenzierung angeschlossen. Daraus resultierte eine umfangreichere Zweitanalyse der Tumor-DNA-Proben mittels Sequenzierung als es bei der aus Lymphozyten gewonnenen DNA üblich ist.

Es zeigte sich darüber hinaus, dass für zwei Abschnitte des Exon 11, die HRM-Analyse keine zufriedenstellenden Ergebnisse erbrachte. Die Streuung der Schmelzkurven war selbst nach Normalisierung so uneindeutig, dass das Ausmaß an nötiger direkter Sequenzierung zur eindeutigen Klärung zu groß geworden wäre, sodass Exon 11-A mittels DHPLC analysiert wurde. Damit konnten eindeutige Ergebnisse erzielt werden. In dieser mittels DHPLC-Analyse betrachteten Genabschnitten zeigten sich keine suspekten Abweichungen.

Die Kontrolle suspekter Proben wurde mittels direkter Sequenzierung durchgeführt. Dabei zeigte sich ähnlich wie bei der HRM- Analyse, dass die Qualität der Sequenzen maßgeblich von der Qualität der vorangestellten PCR abhängig war. Insgesamt lässt sich jedoch festhalten, dass die angewandten Methoden sich gut zur Analyse von unbekannten Mutationen aus Tumormaterial gewonnener DNA eigneten. Jedoch muss beachtet werden, dass die Sensitivität und Spezifität nicht mit denen in der Routinediagnostik zu vergleichen sind. Es kann also sein, dass Mutationen übersehen wurden.

5.2. Diskussion der klinischen Datenstruktur

Die Analyse der klinischen Variablen wurde im Hinblick auf prognostisch relevante Eigenschaften durchgeführt. Von besonderer Bedeutung ist die sich darstellende Altersstruktur des Kollektivs. In vorangegangenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass vor allem jüngere Frauen vom tripel-negativen Brustkrebs betroffen sind (Anders and Carey 2008, Chacón and Costanzo 2010). Das mittlere Alter des untersuchten Kollektivs lag

bei 57,8 Jahren und somit sechs Jahre unter dem durchschnittlichen Erkrankungsalter bei anderen Brustkrebsformen. Der Anteil der unter 50 jährigen belief sich auf 34%, der Anteil prämenopausaler Frauen auf 32%. Gonzalez-Angulo et al. konnten ebenfalls eine ähnliche, wenn auch im Durchschnitt etwas jüngere mittlere Altersstruktur von 51 Jahren in einem tripel-negativen Kollektiv von 77 Patientinnen ermitteln. Eine große Follow-up Studie mit 1601 tripel-negativen Patientinnen ermittelte ein mittleres Alter von 53 Jahren bei Diagnosestellung (Dent, Trudeau et al. 2007). Bei einer in Griechenland an insgesamt 403 Patientinnen mit tripel-negativem Mammakarzinom durchgeführten Untersuchung zeigte sich ein durchschnittliches Erkrankungsalter von 50 Jahren, bei einer Spannbreite von 20-83 Jahren (Fostira, Tsitlaidou et al. 2012). Wir konnten also bestätigen, dass Frauen, die an einem tripel-negativem Mammakarzinom erkranken im Durchschnitt jünger sind, wenngleich unser Kollektiv im Vergleich zu den anderen beschriebenen Gruppen das im Durchschnitt älteste darstellte. Dies kann zum einen auf die Auswahlkriterien für die eingeschlossenen Patientinnen zurückgeführt werden, zum anderen zeigte sich in unserem Kollektiv aber auch ein großes Intervall von 25-90 Jahreen.

Die drei klassischen prognostischen Parameter, die zur Risikostratifizierung im Allgemeinen herangezogen werden, sind Tumordifferenzierung, Größe und der Lymphknotenstatus. Tripel-negative Tumore zeigen häufig einen hohen Grad an Entdifferenzierung und neigen zu aggressivem Wachstum. In Übereinstimmung mit vorangegangenen Untersuchungen (Fulford, Easton et al. 2006, Dent, Trudeau et al. 2007, Rakha, El-Sayed et al. 2007) zeigte sich in unserem tripel-negativen Kollektiv ebenfalls eine signifikante Häufung von Tumoren des Differenzierungsgrades G3. Der Anteil von G3 Tumoren lag in unserem Kollektiv bei 83%. Dent et al. zeigten in einer Studie, die sich ebenfalls mit den klinischen Eigenschaften von Tumoren mit tripel-negativem Phänotyp im Vergleich zu anderen Brustkrebssubtypen befasste, dass 66% der Patientinnen einen G3 Tumor aufwiesen, im Vergleich zu nur 28,3% bei anderen Entitäten (Dent, Trudeau et al. 2007). In der Carolina Breast Cancer Study (Carey, Perou et al. 2006), konnte ebenfalls bei den basalen Tumoren als Teilgruppe der tripel-negativen Tumoren ein signifikant erhöhter Anteil an G3 Tumoren verzeichnet werden. Diese Ergebnisse spiegeln die biologischen Eigenschaften dieses Subtyps wieder.

Auch die Berücksichtung der Tumorgrößen lässt eine Einordnung der tripel-negativen Tumore in den prognostischen Kontext zu. Dent und Kollegen konnten feststellen, dass tripel-negative Tumore sich bei Diagnose im Vergleich zu anderen Tumorsubtypen bereits häufiger in großen Tumorstadien präsentieren. Ihre vergleichenden Analysen zeigten, dass 56% der

tripel-negativen Tumore sich bei Diagnose im pT2 Stadium befanden. Bei nicht tripel-negativen Tumoren lag der Anteil an pT2 Tumoren bei nur 33%, die Mehrheit der hormonrezeptorpositiven Tumore wurde in einer kleineren Größenordnung von unter 2cm diagnostiziert (pT1) (Dent, Trudeau et al. 2007) (Lakhani, Reis-Filho et al. 2005). Im Vergleich dazu zeigte sich in unserem Kollektiv ein Anteil von 46% an Tumoren des pT2 Stadiums (2-5cm). Mit 9% war jedoch auch ein nicht zu vernachlässigender Anteil an einem noch ausgedehnteren Tumorstadium erkrankt. Bei Dent et al. waren derart große Tumore bei tripel-negativen Patientinnen in 7,9% der Fälle und bei den nicht tripel-negativen Patientinnen bei 4,6% der Tumore beschrieben.

Bezüglich der Häufigkeit und Ausdehnung von Lymphknoteninfiltration bei Diagnosestellung durch tripel-negative Tumore bestehen unterschiedliche Ergebnisse. Einige Untersuchungen konnten zeigen, dass tripel-negative Tumore sich bei Diagnosestellung häufiger als hormonrezeptor- positive Kontrolltumore in einem lympknotenpositiven Stadium befinden (Dent, Trudeau et al. 2007) Bei den von Dent et al. untersuchten Patientinnen mit tripel-negativen Tumoren lag bei 54,4% der Patientinnen ein positiver Nodalstatus vor. Im Vergleich zu anderern Brustkrebsentitäten zeigte sich somit ein vermehrtes Auftreten von befallenen Lymphknoten bei Diagnosestellung. Wohingegen widersprechende Resultate ergaben, dass bezüglich des Lymphknotenbefalls kein Unterschied bei tripel-negativen und hormonrezeptor-positiven Tumoren besteht (Haffty, Yang et al. 2006, Rakha, El-Sayed et al. 2007). In der von uns untersuchten Gruppe war bei 52% kein Befall von Lymphknoten nachzuweisen. Ein positiver Lymphknotenstatus konnte bei 48% erhoben werden, wobei die Mehrzahl nur einen befallen Lymphknoten zeigte (35%). Es stellte sich zudem heraus, dass die Anzahl der befallenen Lymphknoten bei tripel-negativen Tumoren im Gegensatz zu anderen Subtypen irrelevant für die weitere Prognose ist. Ausschlaggebend ist, ob befallene Lymphknoten vorliegen oder nicht. Hernandez-Aya et al. zeigten, dass beim Vergleich von N1, N2 und N3- Stadien unabhängig von der Tumorgröße kein Unterschied bezüglich des Gesamtüberlebens und des progressionsfreien Überlebens bestand (Hernandez-Aya, Chavez-Macgregor et al. 2011).

Der häufigste histopathologische Typ der tripel-negativen Tumore ist das invasiv-duktale Mammakarzinom (88,5%) (Rhee, Han et al. 2008). Dies zeigte sich auch in unserem Kollektiv, 85% waren vom invasiv-duktalen Typ. Neben dem invasiv-duktalen kommen aber auch immer wieder zwei eher seltene histologische Subtypen vor. Das medulläre (Bertucci, Finetti et al. 2006, Fulford, Easton et al. 2006, Adélaïde, Finetti et al. 2007, Marginean, Rakha

et al. 2010) und das metaplastische Karzinom (Reis-Filho, Milanezi et al. 2006). In unserem Kollektiv konnte in 9% der Fälle die histologische Klassifikation dem medullären Typ zugeordnet werden. In anderen Untersuchungen an einer Gruppe basaler Tumore lag der Anteil des medullären histologischen Subtyps bei 3,2% (Rakha, El-Sayed et al. 2007). Es wurde berichtet, dass gerade dieser Subtyp sich jedoch durch eine bessere Prognose auszeichnet (Jenssen, Kuo et al. 2002).

Es zeichnen sich somit nach Zusammenschau aller klinisch erhobenen Parameter kontinuierliche Eigenschaften ab, die dem tripel-negativen Brustkrebs zugeordnet werden können. Diese klinischen Parameter sind im Zusammenhang mit der Prognoseableitung von großem Interesse. Jedoch scheint es neben den klassischen prognostischen Parametern weitere Eigenschaften zu geben, die für den Krankheitsverlauf von Bedeutung sein könnten.

5.3. BRCA1-Mutationen

Brustkrebs, der bei BRCA1-Keimbahnzellmutationsträgerinen entsteht, ist zumeist vom tripel-negativen oder sogar vom basalen Subtyp (80-90%) (Foulkes, Stefansson et al. 2003, Foulkes, Metcalfe et al. 2004, Hernandez-Aya, Chavez-Macgregor et al. 2011). Wie viele Patientinnen mit tripel-negativen Tumoren aber tatsächlich Träger einer BRCA-Mutation sind, ist Gegenstand aktueller Forschung. Als Beitrag zur Klärung dieser Fragestellung untersuchten wir in einer kleinen deutschen Population die tatsächliche Häufigkeit von Mutationen im BRCA1-Gen bei Patientinnen mit tripel-negativen Mammakarzinomen. Durch die Analyse der Tumor-DNA mittels Schmelzkurvenanalyse und direkter Sequenzierung konnte bei 10 der 97 Patientinnen eine pathogene Mutation gefunden werden. Die Mutationsfrequenz in unserem Kollektiv lag somit bei 10%.

Im Jahre 2011 wurde bereits eine Untersuchung zur Mutationsfrequenz innerhalb einer Gruppe von Patientinnen mit tripel-negativen Mammakarzinomen von einer in Texas ansässigen Gruppe um Gonzalez-Angoulo durchgeführt. In einem vergleichbaren, wenn auch etwas kleineren Kollektiv (n=77) lag die Inzidenz an BRCA1-Mutationen bei 19,5% und somit über der von uns ermittelten Häufigkeit. Jedoch wurden bei den Analysen beide Tumorsupressorgene BRCA1 und BRCA2 Gen berücksichtigt. Beachtet man nur die im BRCA1-Gen ermittelten Mutationen, so zeigte sich eine Häufigkeit von 15,6%. Bei insgesamt 12 der 77 Patientinen lag somit eine Mutation im BRCA1-Gen vor. Damit liegt die von der Arbeitsgruppe beschriebene Inzidenz leicht über der von uns ermittelten (Gonzalez-Angulo,

Timms et al. 2011). Eine weitere Studie, die sich mit einer fraglichen Anreicherung von Mutationsträgerinnen im tripel-negativen Kollektiv beschäftigte, wurde von Young et al. durchgeführt. Sie konnten in ihrem Kollektiv (n=54), das Frauen unter 40 ohne positive Familienanamnese einschloss, 5 Mutationen im BRCA1- Gen finden. Die Mutationsfrequenz im BRCA1 Gen lag somit bei 9, 2% und ist mit der von uns ermittelten Häufigkeit zu vergleichen. Es ist zu beachten, dass in dem von Young et al. untersuchten Kollektiv kein oder nur geringer Anhalt für das Vorliegen einer Familienanamnese bestand. In unserem Kollektiv konnte hingegen nachträglich bei zwei Mutationsträgerinnen definitiv eine positive Familienanamnese nachvollzogen werden. Bei den anderen Patientinnen konnte aus verschiedenen Gründen keine Auskunft über den Stammbaum erhoben werden. Eine aktuelle Studie, die sich mit der Prevalenz von BRCA1-Mutationsträgerinnen bei Patientinnen mit tripel-negativem Mammakarzinom beschäftigt, wurde als koopertive Studie in Griechenland durchgeführt (Fostira, Tsitlaidou et al. 2012). In einem Kollektiv, das 403 Patientinnen umfasste, die unabhängig von Alter oder positiver Familienanamnese rekrutiert wurden, zeigten sich 65 Mutationen innerhalb des BRCA1-Gens (16%). Jedoch wurden nur die Exons 5,11,12,16,20,21,22,23,24 und somit ca. 75% der codierenden Region des BRCA1 berücksichtigt. Eine aktuelle Untersuchung aus dem Jahre 2012 befasste sich ebenfalls mit der Prävalenz von BRCA1/2Mutationsträgerinnen im unselektierten tripel-negativen Kollektiv. Die Arbeitsgruppe um Hartman untersuchte 199 Patientinnen mit tripel-negativen Tumoren, von denen 153 Patientinnen keinen Hinweis auf eine positive Familienanamnese boten. Es zeigten sich insgesamt 13 Mutationen im BRCA1-Gen und 8 im BRCA2-Gen, was einer Prävalenz von 10,6% entsprach. Bei alleiniger Betrachtung der Untergruppe ohne positive Familienanamnese lag die Mutationsfrequenz bei 5,2% (Hartman, Kaldate et al. 2012). Nach Berücksichtigung der National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Guidelines, die eine genetische Testung für tripel-negative Patientinnen unter 45 Jahren vorschlagen, konnten 4 der 21 Patientinnen (19%) getestet werden, die unter alleiniger Berücksichtigung der Familienanamnese nicht eingeschlossen worden wären (Netweork 2011). Sie wurden somit zusätzlich als Mutationsträger identifiziert. Bei Berücksichtigung der überarbeiteten Kriterien der NCCN, die eine Testung bei Patientinnen unter 65 Jahren fordern, konnten zwei der 21 Mutationen (10%) dieser Gruppe zugeordnet werden. Zusammenfassend konnte diese Arbeitsgruppe herausarbeiten, dass die tasächliche Mutationsrate deutlich über der erwarteten lag. Wobei die BRCA1-Mutationsrate hinter den bisher beschriebenen Häufigkeiten zurückblieb, die BRCA2-Mutationsrate jedoch darüber lag. Zudem bestätigten sie den Nutzen der neuen von dem NCCN festgelegten Einschlusskriterien.

Eine Arbeitgruppe des Dana-Faber Cancer Instituts um Kandel et al. untersuchten bei 200 an tripel-negativen Tumoren erkrankten Frauen die Prevalenz von BRCA1-Mutationen. Dabei wurden zunächst mit Hilfe von Myriad-Prevalenztabellen die erwarteten Häufigkeiten unter den Gesichtspunkten Alter, Familienanamnese und Herkunft bestimmt. Die so ermittelte geschätzte Häufigkeit wurde auf 11,7% (2,7% BRCA2-Mutationen) festgelegt. Tatsächlich wurde aber bei 9 von 23 Patientinnen eine Mutation gefunden, was einer Pävalenz von 39,1% entspricht und somit die erwartete Häufigkeit bei weitem übersteigt. Da es sich bei diesen Ergebnissen jedoch nur um vorläufige Auswertungen im Rahmen einer Präsentation auf dem ASCO-Kongress 2006 handelt, müssen sie mit Vorsicht betrachtet werden. Die Ergebnisse der endgültigen Analysen dürften aber von großem Interesse sein. Auf jeden Fall gibt es Hinweise, dass die üblichen Risikokriterien, die für das Vorliegen einer BRCA1-Mutation sprechen könnten, wie Familienanamnese, Herkunft (Ashkenazi-Juden) oder Alter die tatsächliche Prävalenz der BRCA1-Mutationen bei tripel-negativen Tumoren unterschätzen(M. J. Kandel 2006).

Neben den tatsächlichen Häufigkeiten sind natürlich die klinischen Eigenschaften der tripel-negativen Mutationsträgerinnen von Interesse. So zeigte sich, dass das Alter der Mutationsträgerinnen bei Diagnosestellung innerhalb der verschiedenen Studienpopulationen leicht differierte. In unserem Kollektiv wurde die Diagnose bei den Mutationsträgerinnen im Mittel in einem Alter von 49 Jahren gestellt. Das mittlere Alter der Mutationsträgerinnen bei Fostria et al. lag hingegen bei 39 Jahren, bei Gonzales-Angoulo bei 51 Jahren. Es zeigt sich bei der griechischen Population also ein deutlich jüngeres Alter, wohingegen die Ergebnisse von Gonzales-Angoulo et al. und unsere zu vergleichen sind. Auch im Ausmaß der Altersstreuung zeigten sich bei Gonzales-Angulo und in unserem Kollektiv ähnliche Umfänge (27-83 Jahren vs. 25-78 Jahren) (Gonzalez-Angulo, Timms et al. 2011).

Zur weiteren Strukturierung der Daten anhand klinischer Gesichtspunkte nahmen Fostira et al. eine Einteilung des Kollektives in zwei Altersgruppen vor. Bei den unter 50-jährigen Frauen lag der Anteil der Mutationsträgerinnen nun bei 27%. In unserem Kollektiv zeigte sich ebenfalls, dass bei den unter 50 Jährigen im Verhältnis mehr Mutationen (18%) gefunden wurden als bei den älteren Patientinnen. Diese Angaben könnten für die Interpretation des Ursprungs dieser Mutationen, d.h. hereditär oder somatisch von Bedeutung sein und auch relevant für Therapie und Prognose.

Interessante Erkenntnisse im Zusammenhang zur Inzidenz von Mutationen bei tripel-negativen Tumoren bringen auch ältere Studien, die bereits um das Jahr 2000 durchgeführt wurden. Diese Untersuchungen berücksichtigten jedoch nur einen Aspekt der Definition der tripel-negativen Tumore, nämlich den östrogenhormonrezeptor-negativen Status. Dabei beschäftigte sich Liderau mit patientinnenindividualisierten Kriterien, die Hinweise auf das Vorliegen einer Mutation im Tumorsupressorgen BRCA-1 geben könnten. Da Tumore, die bei BRCA1-Mutationsträgerinnen entstehen, zumeist G3-Tumore sind und einen ER-negativen Status aufweisen, wurden diese beiden klinischen Parameter herangezogen und ihr Einfluss auf das tatsächliche Vorliegen von Mutationen untersucht. Es zeigte sich bei Patientinnen, die in einem Alter von 35 Jahren an einem ER-negativen G3 Tumor erkrankten, ein Anteil von Mutationsträgerinnen im BRCA1-Gen von 28,6%. Im Vergleich dazu zeigte sich bei 3,6% der Kontrollgruppe aus dem Tumorregister ein positiver Mutationsnachweis (p=0,007). Bemerkenswert ist dabei, dass nur eine Patientin mit Mutation tatsächlich eine positive Familienanamnese aufwies (Lidereau, Eisinger et al. 2000). Auch Chang und Kollegen befassten sich mit der Bedeutung der zwei morphologischen Kriterien Tumordifferenzierung und ER-Hormonrezeptorstatus bei prämenopausalen Frauen (<45 Jahre). Im Rahmen der prospektiven Studie konnte bei 8 von 76 Patientinnen, also bei ca 10,5% eine Mutation detektiert werden. Dabei zeigten 25% der G3-Tumore mit hormonrezeptor-negativem Status eine Mutation. Vergleicht man diese Ergebnisse mit den bereits vorgestellten Untersuchungen bei den tripel-negativen Tumoren, so kann man mutmaßen, welche Bedeutung den tripel-negativen Tumoren auch in diesen Untersuchungen zukommen (Chang, Hilsenbeck et al. 2001).

Mutationen somatischen oder hereditären Ursprungs

Genau 80% der von uns detektierten Mutationen wurden bereits in der BIC-Datenbank beschrieben. Insgesamt konnten zwei sogenannte Foundermutationen in Exon 5 bzw. 20 (c.300T-G und c.5382insC) beschrieben werden, die in unserer Bevölkerungsgruppe zu den häufigsten vererbten Mutationen zählen (Wang, Fang et al. 2012)(Meindl and Cancer 2002). Auch in anderen Bevölkerungsgruppen, wie bei den Ashkenazi Juden und auch in Westeuropa sind diese Mutationen sehr verbreitet, sodass 30% aller Alterationen im BRCA1-Gen auf diese beiden Loci zurückzuführen sind (Ferla, Calò et al. 2007). Fünf weitere Mutationen wurden bereits ebenfalls in der BIC-Datenbank und auch im Rahmen einer großen Studie des Deutschen Konsortiums für hereditäres Mamma- und Ovarialkarzinom innerhalb der deutschen Bevölkerung beschrieben (Meindl and Cancer 2002). Dabei handelte

es sich um einen Spleißdefekt in Exon 5 (IVS5+1G>T), zwei Deletionen in Exon 11 (c.3819del5bp, c.3875del4bp) die jeweils zu Leserasterverschiebungen führen und zwei Punktmutationen (c.5370C>T, c.5298A>T) in Exon 19 und 20. Da es sich bei diesen ermittelten pathogenen Varianten um bereits bekannte Veränderungen des BRCA1-Genlokus handelt, ist stark davon auszugehen, dass es sich dabei um Keimbahnmutationen handelt, sie also hereditären Ursprungs sind. Diese Annahme wird dadurch gestützt, dass bekannterweise nur wenige sporadische Mutationen im BRCA1/2 Gen auftreten (Reis-Filho and Tutt 2008). In unserem Kollektiv konnten jedoch auch zwei unbekannte Mutationen identifiziert werden, bei denen eine somatische Genese möglich scheint: Eine Mutation im Exon 16, die sich in der Tumor-DNA einer 46 jährigen Patientin zeigte sowie eine Frameshift-Mutation in Exon 19, die bei einer 78 jährigen Patientin ermittelt wurde. Das untypische Alter von 78 Jahren bei Erstdiagnose eines tripel-negativen Mammakarzinoms stützt den Verdacht auf das Vorliegen einer somatischen Mutation, also einer Mutation die nicht bereits in den Keimzellen angelegt war, sondern sich innerhalb des Tumors entwickelt hat. Zur definitiven Zuordnung, ob es sich bei den beiden Patientinnen tatsächlich um eine somatische Mutation handelt, hätten jedoch zusätzlich Mutationsanalysen aus der aus Blutzellen gewonnenen DNA durchgeführt werden müssen. Aufgrund des retrospektiven Ansatzes der Untersuchungen war dies jedoch nicht möglich. Es wäre von großem Interesse, ob die Tatsache, dass diese Mutationen in jahrelangen Untersuchungen des BRCA1 Gens noch nie aufgetreten sind, als Hinweis darauf gedeutet werden können, dass es sich bei diesen Mutationen um somatische Veränderungen handelt.

Die Arbeitsgruppe Meindl erhielt jedoch nach Abschluss unseres Projekts die aus Lymphozyten gewonnene DNA einer 49-jährigen Mutationsträgerin (c.5370C>T) und konnte in weiterführenden Untersuchungen ermitteln, dass die Lymphozyten-DNA dem Wildtyp entsprach. Dieses Ergebnis spricht sehr dafür, dass bei dieser Patientin tatsächlich eine somatische Mutation vorliegt, also eine Mutation, die nur in den Tumorzellen stattgefunden hat. Interessanterweise war gerade bei dieser Patientin auch keine positive Familienanamnese vorhanden. Zusammenfassend ist also zu sagen, dass wir bei einer Mutation sicher um eine somatische Genese wissen und bei zwei weiteren eine somatische Veränderung in Erwägung ziehen.Vergleicht man die Ergebnisse anderer Untersuchungen, so zeigen sich ähnliche Resultate. Gonzalez- Angulo konnten einer von 12 gefundenen Mutationen eine somatische Genese nach Analyse von Tumor und Lymphozyten DNA zuordnen (Gonzalez-Angulo, Timms et al. 2011). Diese Ergebnisse zeigen in Übereinkunft mit weiteren Untersuchungen

(Reis-Filho and Tutt 2008), dass somatische Mutationen im BRCA1-Gen doch eher selten, jedoch nicht ausgeschlossen sind.

5.4. Polymorphismen, unklassifizierte Varianten

Polymorphismen sind Sequenzvarianten, die definitionsgemäß bei mehr als 1% der Bevölkerung auftreten und keinen Krankheitswert haben (Meindl and Cancer 2002). In der Regel handelt es sich dabei um einfache Basenaustausche, die nicht zu einer Verkürzung des Proteins führen. Aufgrund der zahlreich durchgeführten Mutationsanalysen in großen Kollektiven und die Zusammenführung derer Ergebnisse in der BIC-Datenbank, sind beim BRCA1-Gen benigne Sequenzvarianten bekannt. Die in unserem Kollektiv gefundenen Polymorphismen sind mehrfach in der BIC Datenbank beschrieben, einige stellen nur stille Mutationen ohne Aminosäurenaustausch dar. Daher kann davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um neutrale Sequenzvarianten im Genpool handelt.

Die bekannten Clusterpolymorphismen kamen in unserem tripel-negativen Kollektiv mit einer Häufigkeit von 53% vor, was mit der Häufigkeitsverteilung innerhalb der Allgemeinbevölkerung vergleichbar ist. Es bestand zudem kein Zusammenhang zwischen der Verteilung der gekoppelten Polymorphismen bei Mutationsträgerinnen und bei Patientinnen, bei denen keine Mutation nachzuweisen war. Bemerkenswert ist jedoch, dass von den 9 beschriebenen gekoppelten Polymorphismen 4 einen Aminosäurenaustausch zur Folge haben. Zwei dieser den gekoppelten Polymorphismen assozierten Proteinlokalisationen stehen in Interaktion mit dem Expressionsprodukt des RAD 51-Gens, das ebenfalls Bestandteil des DNA-Reparaturwegs der homolgen Rekombination ist.

Wie oben beschrieben, konnte bei einer Patientin ein unvollständiges Muster der Clusterpolymorphismen aufgedeckt werden. Dies kann ein Hinweis auf das Vorliegen eines Verlusts des heterozygoten Zustands (LOH = loss of heterozygosity) sein. Sogenannte LOHs können neben den klassischen Mutationen zu einer Herunterregulierung des BRCA1- Gens führen, da nur noch ein funktionsfähiges Allel zurückbleibt. In der Regel findet man LOHs in somatischen Zellen. Im Rahmen der parallel durchgeführten Untersuchung (Doktorarbeit Christina Meul) am selben Patientenkollektiv konnte gezeigt werden, dass auch bei tripel-negativen Tumoren der Verlust der Heterozygotie vorkommt. Durch so genannte MLPA-Analysen konnten Verluste und vervielfachte Genabschnitte des BRCA1 ausgemacht werden. 66% innerhalb des tripel- negativen Kollektives (n=127) zeigten größere Deletionen, in 3,9% traten Amplifikationen eines BRCA1-Alles auf. Dabei zeigte sich, dass 77% der mutierten

oder methylierten TNBC Kopienzahlveränderungen aufwiesen. Jedoch bestand kein Unterschied zwischen den BRCA1-insuffizienten und den Wildtyp-BRCA1-Tumoren. Zudem gab es kein Hinweis auf eine Assoziation zu klinischen Parametern wie dem Grading, Alter, Tumorgröße oder Nodalstatus. Die Bedeutung des Verlustes des LOHs im BRCA1-Gen wird in den weiter Ausführungen nochmals beleuchtet.

In unserem Kollektiv konnte darüber hinaus bei einer Patientin eine so genannte unklassifizierte Variante (UV) identifiziert werden. Diese Varianten kommen in der Regel mit einer Häufigkeit von unter 1% in der Bevölkerung vor. Die Abgrenzung zwischen einer pathogenen Missense-Mutation und einer harmlosen Sequenzvariante ist dabei oft schwierig. Aufgrund der Seltenheit dieser Sequenzvarianten und des fehlenden BRCA1-Funktionstests ist eine direkte Assoziation zum Auftreten von Brust- oder Eierstockkrebs oft nicht möglich. Die Bedeutung der UVs ist somit unklar und stellt eine Lücke in der genetischen Diagnostik dar. Unter anderem präsentieren sich so nichtinformative Testresultate, die keine Konsequenz für die Patientinnen haben. Akbari et al. zeigten jedoch, dass das Risiko bei Trägerinnen von UVs nicht größer ist als das der Allgemeinbevölkerung (Akbari, Zhang et al. 2011).

Bei der Bewertung von Mutationen des BRCA1-Gens, stellt die Lokalisation der genetischen Veränderungen und somit in der Konsequenz die Abweichung der Proteinstruktur einen weiteren wichtigen Aspekt dar. Unterschiedliche Abschnitte des Proteins interagieren mit verschiedenen anderen Proteinen innerhalb des Zellzyklus und der Reparaturkaskaden. So scheinen Veränderungen, die N-terminal von der BRCT- Domäne lokalisiert sind, nicht zwangsläufig zum Funktionsverlust des Proteins zu führen (Hayes, Cayanan et al. 2000). Wohingegen die Funktion des BRCA1-Protein als Tumorsuppressor bei Veränderungen der carboxyterminalen Region eingeschränkt zu sein scheint (Szabo, Worley et al. 2004). Es stellt sich also die Frage, ob es bestimmte Bereiche des BRCA1-Proteins gibt, die für die tumorsuppressiven Eigenschaften wichtiger sind als andere und ob gerade Mutationen/UVs in diesen Regionen verheerendere Auswirkungen haben. So sind die Regionen des BRCA1, die die RING-Finger und BRCT-Domäne beherbergen, über alle Spezies hinweg stark konservierte Regionen. Missense-Mutationen in diesen Regionen sind daher wahrscheinlich von größerer Bedeutung für die Risikoeinschätzung als die in nicht konservierten Regionen, wie zum Beispiel dem Exon 11 (Szabo, Worley et al. 2004). Für das Exon 11, das für einen zentralen Teil des BRCA1-Proteins codiert, sind 60 verschiedene Sequenzvarianten verschiedener Spezies bekannt (Fleming, Potter et al. 2003). In unserem Kollektiv konnten trotz der Größe des Exon 11 und seiner Polymorphie nur zwei pathogene Mutationen in

diesem Genabschnitt gefunden werden. Berücksichtigt man die von Meindl et al. beschriebene Mutationsverteilung in der deutschen Bevölkerung, so hätte man vielleicht mehr Mutationen in diesem Genabschnitt erwartet. Dies kann möglicherweise auf statistische Probleme bei kleinen Fallzahlen zurückgeführt werden. Die genaue Bedeutung der Lokalisation einer Mutation in diesem großen Gen ist im Hinblick auf die resultierende Funktionseinschränkungen von großem Interesse. Fraglich ist auch, ob sich hieraus eine Konsequenz für Therapie und Prognose ableiten lässt.

5.5. Erweiterung der Testkriterien

Welche Konsequenzen ergeben sich nun aus den beschriebenen Beobachtungen? Während somatische Mutationen im BRCA1-Gen eher selten sind, scheint eine Anreicherung von hereditären Karzinomen innerhalb der Gruppe der tripel-negativen Tumoren möglich. Die Erhebung einer lückenlosen Familienanamnese gestaltet sich zuweilen schwierig und in der Tat scheint im tripel-negativen Kollektiv das Vorliegen einer BRCA1-Mutation nicht immer in Verbindung mit einem positiver Familienhintergrund zu stehen. Auch Gonzalez-Angoulo und Kollegen stellten fest, dass sie von den 15 Mutationsträgerinnen unter den geltenden Einschlusskriterien für die genetische Testung sieben BRCA-Mutationsträgerinnen eigentlich nicht der Mutationsdiagnostik zugeführt hätten. Es kristallisiert sich heraus, dass unter den geltenden Auswahlkriterien nicht alle potentiellen Mutationsträgerinnen erfasst werden. Neben dem zentralen Einschlusskriterium der Familienanamnese sollten also weitere Kriterien diskutiert werden. Betrachtet man sich die in Deutschland derzeit gültigen Einschlusskriterien zur Durchführung einer genetischen Diagnostik, so sind alle Kriterien eng mit einer positiven Familienanamnese verknüpft. Meindl et al. haben diese Kriterien für das Deutsche Konsortium für hereditäres Mamma- und Ovarialkarzinom formuliert und die zu erwartenden Mutationshäufigkeiten ermittelt. Dabei wurde eine Einteilung in 6 Gruppen vorgenommen. Die Gruppe mit dem höchsten Risiko für das Vorliegen einer Mutation beim Indexpatient war mit 43% die Gruppe B. In diesen Familien gab es einen oder mehrere Fälle von Brustkrebs und Ovarialkarzinomen im gleichen Stammbaum. Die Gruppen C,D,E zeigten nur bei 4-9% der getesteten Patientinnen das Vorliegen einer Mutation (Meindl and Cancer 2002). Trotzdem wird diesen Gruppen die genetische Testung angeboten. Auch in den meisten anderen Ländern wird eine erwartete Häufigkeit zwischen 10-20% als Schwelle zum Einschluss herangezogen (Evans, Lalloo et al. 2009) .

Vergleicht man nun diese Testwahrscheinlichkeiten für das Vorliegen einer Mutation mit der in unserem Kollektiv aufgetretenen Inzidenz von 10%, so muss ganz unabhängig von einer

positiven Familienanamnese in Erwägung gezogen werden, dass die Gruppe der TNBC eine potentiell wichtige, zu testende Gruppe darstellt. Stratifiziert man zudem nach jüngerem Alter der an einem tripel-negativen Tumor erkrankten Frauen, so wächst die Rate an Mutationsträgerinnen innerhalb dieser Gruppe weiter an. Die Qualifizierung zur genetischen Testung junger Frauen, die an einem tripel-negativen Mammakarzinom erkranken, muss daher diskutiert werden. Mit 18% Mutationsfrequenz sind die tripel-negativen Patientinnen unter 50 Jahren in ihrem Umfang mit der zusammengeschlossenen Häufigkeit (15%) der Gruppen A2,C und D des Deutschen Konsortiums zu vergleichen. Diese Gruppen schließen die Familien ein, bei denen ein männlicher Brustkrebs auftritt, 2 Familienmitglieder an Mammakarzinom erkrankt sind, davon eine unter 50 Jahren und Familien mit zwei oder mehr Brustkrebsfällen, die bei über 50-jährigen diagnostiziert wurden (Meindl and Cancer 2002).

Die von der Arbeitsgruppe um Kwon geschätzte Mutationfrequenz bei Patientinnen unter 50 Jahren mit einem tripel-negativen Mammakarzinom liegt bei 17,5%. Wie bereits erwähnt betrug die Mutationsfrequenz in unserem Kollektiv in der Gruppe der unter 50 jährigen 18%. In diesem Zusammenhang fordern auch Kwon et al. eine Ausweitung der Testkriterien. In der von Ihnen durchgeführten Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die Testung von tripel-negativen Patientinnen unter 50 Jahren eine kosteneffiziente und gute Strategie darstellt, um das Risiko für Brust- und Ovarialkrebs zu senken. Sie fordern daher eine Testung aller Frauen unter 50 Jahren, die an einem tripel-negativen Tumor erkrankt sind, ungeachtet ihrer Familienanamnese oder ihrer ethnischen Zugehörigkeit (Kwon, Gutierrez-Barrera et al. 2010). Durch die Ausweitung der Testkriterien würden so auch junge Frauen, denen bisher keine genetische Testung angeboten wurde untersucht. Wie bereits weiter oben angesprochen, beschäftigte sich schon Lidereau um die Jahrtausendwende mit möglicherweise ausgedehnteren und effektiveren Einschlusskriterien zur genetischen Testung. Da die Familienanamnese, respektive der Stammbaum, das Hauptkriterium zum Einschluss für genetische Testung darstellt, ihre Erhebung jedoch nicht immer möglich oder zuverlässig ist, waren sie daran interessiert ein patientenindividualisiertes Kriterium zu entwickeln. Es konnte in einer multivariaten Analyse gezeigt werden, dass drei Eigenschaften für die Vorhersage des Mutationsstatuses relevant sind. Neben dem Alter und einem schlechten Differenzierungsgrad ist das Vorliegen eines negativen Östrogenhormonrezeptorstatus von großer Bedeutung. Es zeigte sich, dass bei jungen Patientinnen im Alter von 35 Jahren mit G3-Tumoren und bei negativen ER-Rezeptorstatus eine Mutationsfrequenz von 28,6% vorlag. Legte man jedoch nur das junge Alter zugrunde und ließ den Hormonrezeporstatus außen vor, so zeigte sich eine

Mutationsfreuquenz von nur 8,6%. (Lidereau, Eisinger et al. 2000). Auch Chang et al. konnten diese drei klinische Eigenschaften [junges Alter, (<45, prämenopausal) G3 und Negative ER] als Kriterien für die genetische Testung herausarbeiten. Die Mutationsfrequenz innerhalb dieser Gruppe lag bei ca. 25%. Es wird also deutlich, dass bei der Qualifizierung zur genetischen Diagnostik neben dem Stammbaum auch klinische-morphologische und demographische Kriterien von Bedeutung ein könnten. Auch Foulkes et al. bestätigen, dass die Berücksichtigung dieser Selektionskriterien einen Gewinn für die genetische Diagnostik darstellen würde. Dabei sind Differenzierungsgrad, Alter und Östrogenrezeptornegativität als drei von einander unabhängige prädiktive Kriterien für den Mutationsstatus zu werten (Foulkes, Metcalfe et al. 2004). Auch Gadzicki et al. konnten den Tenor der vorangegangen Untersuchungen bestätigen. Sie führten eine retrospektive Studie zur Identifikation eines Selektionsalgorithmus für genetische Testung durch. Dabei stellten sie die mögliche Konsequenz für gezielte Therapie in den Vordergrund. Mehrere klinische und histopathologische Kriterien wurden als mögliche Einschlusskriterien in Erwägung gezogen und ihr Zusammenhang zu dem tatsächlichen Vorliegen von Mutationen untersucht. Mutationsträgerinnen zeigten häufiger G3- Tumore, einen tripel-negativen Rezeptorstatus und eine Ki67-Überexpression. Eine weitere Untersuchung beschäftigte sich ebenfalls mit dem Anteil an Mutationsträgern im tripel-negativen Kollektiv und als Konsequenz mit der Frage, ob genetische Testung für Frauen mit tripel-negativen Brustkrebs angeboten werden soll. 308 Individuen wurden hinsichtlich des Vorliegens von BRCA-Mutationen untersucht. Dabei setzte sich das Kollektiv aus 159 unselektierten und 149 nach jungem Alter oder Familienanamnese ausgewählten Probandinnen zusammen. Insgesamt gab es bei 45 Frauen Mutationen im BRCA1-Gen (Robertson, Hanson et al. 2012). Dabei zeigte sich sowohl bei der unselektierten als auch bei der selektierten Gruppe eine Mutationsfrequenz von über 10%. Jedoch offenbarte sich, dass sich mehr als ein Drittel der Mutationsträgerinnen unter den aktuellen Einschlusskriterien nicht für die genetische Testung qualifiziert hätten. In der Konsequenz fordern Robertson et al. daher die Erweiterung der Einschlusskriterien für Frauen mit tripel-negativen Tumoren unter 50 Jahren. Durch die Umsetzung dieser Planung würden, so schätzen sie, in England jährlich etwa 1200 Frauen/Männer zusätzlich getestet werden.

Unsere Ergebnisse, sowie alle erwähnten vorangegangen Untersuchungen, würden im Sinn der tripel-negativen Patientinnen dafür sprechen, dass eine Überarbeitung der Einschlusskriterien in Erwägung gezogen werden solltew. Denn bei einer Mutationsfrequenz von 18% der unter 50-jährigen erscheint das Angebot einer genetischen Diagnostik

gerechtfertigt. Diese Überlegungen gewinnen vor allem im Hinblick auf mögliche Verbesserung therapeutischer Strategien an Bedeutung. Denn die Funktion des BRCA1-Proteins für die zellulären Prozesse gerade im Zusammenhang mit der DNA-Reparatur stellt ein Ansatzpunkt für neue Therapiestrategien dar. Außerdem werden auch klassische Chemotherapieregime unter dem Gesichtspunkt der Funktionsfähigkeit des BRCA1-Proteins neu bewertet. Die klinische Bedeutung genetischer Diagnostik wird im Folgenden noch abgehandelt.

5.6. Statistische Auswertung bezüglich des Überlebens und der Prognose von BRCA1-Mutationsträgerinnen und Nicht-Mutationsträgerinnen im Vergleich

Wie bereits mehrfach erwähnt, stellt die schlechte Prognose für die Gruppe der tripel-negativen Mammakarzinome einen zentralen Ansatzpunkt zahlreicher Untersuchungen dar. Die Betrachtung der klinischen Eigenschaften im Zusammenhang mit den Überlebensdaten der Patientinnen war daher Gegenstand unserer Analysen. Dabei stellt sich die Frage, ob es signifikante Unterschiede im Überleben der Patientinnen im tripel-negativen Kollektiv selbst, aber auch im Vergleich zu anderen Subtypen gibt und ob neben den klassischen prognostische Parametern wie Nodalstatus und Tumorgröße andere Faktoren, wie zum Beispiel der BRCA1-Muatationsstatus eine Rolle spielen.

5.6.1. Metastasen

Wir konnten mit Hilfe statistischer Analysen zeigen, dass in unserem Kollektiv ein positiv korrelierender Zusammenhang sowohl zwischen der Tumorgröße als auch zwischen einem positiven Nodalstatus und dem Auftreten von Metastasen besteht. Dieser Zusammenhang gilt im Allgemeinen auch für hormonrezeptorpositive Mammakarzinome. Es zeigte sich also, dass Patientinnen die einen postiven Lymphknotenstatus oder einen besonders großen Tumor aufwiesen, (pT3+pT4) häufiger in der Folge an einem dissemenierten Krankheitsstadium litten. Dabei bestand jedoch kein Zusammenhang zu dem BRCA1-Mutationsstatus. Insgesamt zeigte sich bei 8% der Patientinnen bereits bei Erstdiagnose oder im Verlauf ein metastasiertes Krankheitsstadium. Bei den Metastasen, die im Zusammenhang mit tripel-negativen Tumore entstehen, handelt es sich häufiger als bei anderen Tumorsubtypen um viszerale Metastasen (Smid, Wang et al. 2008). Eine Arbeitsgruppe um Smid konnte in einer Gruppe von 403 Patientinnen mit negativem Lymphknotenstatus zeigen, dass Lungenmetastasen signifikant häufiger bei Tumoren des basalen Clusters auftraten (p=0,01). Im Vergleich zu den luminalen Subtypen konnten zudem häufiger zentralnervöse Metastasen

beschrieben werden (Heitz, Harter et al. 2009). Über die genaue Lokalisation der in unserem Kollektiv aufgetretenen Metastasen konnten leider keine genaueren Daten erhoben werden.

5.6.2. Lymphknotenstatus und Tumorgröße innerhalb des tripel-negativen Kollektivs

Im Allgemeinen korrelieren Tumorgröße und Lymphknotenstatus positiv miteinander. Für tripel-negative Tumore bestehen jedoch widersprüchliche Ergebnisse bezüglich dieser Korrelation. Es scheint Hinweise darauf zu geben, dass im tripel-negativen Kollektiv keine Assoziation zwischen der Tumorgröße und dem Befall von Lymphknoten besteht (Dent, Trudeau et al. 2007). In den Untersuchungen von Dent et al. zeigten sogar kleine Tumore unter einem cm in 55% der Fälle positive Lymphknoten. Eine ähnliche Korrelation konnten Foulkes und Kollegen für das Vorkommen von Lymphknoten-Metastasen bei BRCA1-Mutationsträgerinnen darstellen. Sie untersuchten 1555 Frauen aus 10 nordamerikanischen Zentren, die an invasiven Mammakarzinomen litten. Bei den ermittelten 276 BRCA1-Mutationsträgerinnen bestand im Gegensatz zu den Nichtmutationsträgerinnen und den BRCA2-Mutanten kein positiv korrelierender Zusammenhang zwischen Tumorgröße und positivem Lymphknotenstatus. (Foulkes, Metcalfe et al. 2003) Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass gerade bei BRCA1-Mutationsträgerinnen eine frühe Diagnosestellung von großer Bedeutung ist, da auch schon sehr kleine Tumore infiltratives Wachstum zeigen können. Gerade auch im Hinblick auf die innerhalb der Gruppe der tripel-negativen Tumore auftretenden BRCA1-Mutationen ist dieser Aspekt von großem Interesse und führt zu der Frage, ob es auch bei den tripel-negativen Tumoren verschiedene lymphovaskuläre Invasionsmuster gibt. So konnten zum Beispiel Rakha et al. zeigen, dass der basale Phänotyp, der mit einem großen Teil der tripel-negativen Tumore übereinstimmt, eher mit einem negativen Lymphknotenstatus korreliert. In unserem Kollektiv konnte bei 27% der kleinen Tumoren bis 2 cm (pT1) und bei 50% der Tumore zwischen 2-5cm (pT2) ein positiver Nodalstatus nachgewiesen werden. Es bestand somit ein positiv korrelierender Zusammenhang zwischen Tumorgröße und Lymphknotenbefall, jedoch kein Zusammenhang zwischen dem Mutationsstatus und einer Tumorinvasion der Lymphknoten.

Lee et al. konnten bei einer Gruppe an tripel-negativen Mammakarzinomen erkrankten Patientinnen zeigen, dass Frauen, die gleichzeitig Träger einer BRCA-Mutation waren, kleinere Tumore bei Diagnosestellung aufwiesen (Lee, Alexander et al. 2011). In unserem Kollektiv konnte kein Zusammenhang zwischen Tumorgröße und Mutationsstatus gefunden werden. Dies mag unter anderem mit der doch recht kleinen Fallzahl zusammenhängen, denn eine Tendenz zu kleineren Tumoren bei Mutationsträgerinnen kann vermutet werden. Bei den

10 Mutationsträgerinnen zeigten sich bei Diagnosestellung 5 kleine Tumore im pT1 Stadium, also mit einer Größe unter 2 cm und vier Tumore mit einer Größe von 2-5 cm. Ein Karzinom breitete sich bei Diagnosestellung bereits bis auf die Haut oder die Brustwand aus (pT4). Im Vergleich der Tumoren mit intaktem und mutierten BRCA1 zeigte sich also, dass 50% der tripel-negativen Tumore mit Mutationen im BRCA1-Gen sich bei Diagnosestellung im kleinsten Tumorstadium pT1 befanden. Wohingegen nur 37% der Wildtypen einen kleinen Tumor unter 2 cm zeigten. Diese unterschiedliche Tendenz war jedoch nicht statistisch signifikant, zeigte sich jedoch auch bei der Zusammenschau von Mutations- und Methylierungsstatus. In der von Gonzales-Angulo bereits mehrfach erwähnten Untersuchung konnte kein Unterschiede bei den Tumorgrößen der Mutationsträgerinnen und Wildtypen herausgearbeitet werden (Gonzalez-Angulo, Timms et al. 2011).

5.6.3. Familienanamnese und Mutationen innerhalb des Kollektivs

Das Vorliegen einer positiven Familienanamnese korrelierte in unserem Kollektiv mit dem tatsächlichen Vorliegen einer pathogenen Mutation. Die Informationen über das Auftreten maligner Erkrankungen, in einer Familie die in Assoziation mit einer BRCA1/2 Mutation stehen könnten, sind von großer Bedeutung, und deren Erhebung der erste Schritt bei der genetischen Beratung. Gerade da die meisten BRCA1 assoziierten Tumoren einen basalen oder tripel-negativen Phenotyp aufweisen, ist die Erhebung der Familienanamnese von großer Bedeutung, und sollte konsequnet dokumentiert werden. Denn retrospektiv gestaltete sich die Datenerhebung oft schwierig. In unserem Kollektiv konnte im Nachhinein nicht mehr bei allen Patietinen eine Auskunft über den Stammbaum erhoben werden und somit sind wichtige klinische Daten für die Forschung verloren gegangen. Ingesamt lagen uns bei 55 Patientinnen keine Daten zu der Familienanamnese vor. Bei 15 Frauen ergaben sich Hinweise für das Vorliegen einer positiven Familienanamnese, von denen zwei in unserer tumorgenetischen Sprechstunde vorstellig wurden. Bei insgesamt 24 Frauen konnte eine familiäre Häufung BRCA1-assoziierter Tumoren ausgeschlossen werden. Bei nur zwei Mutationsträgerinnen war eine positive Familienanamnese dokumentiert. Bei den anderen Mutationsträgerinnen lagen jedoch keine Daten bezüglich einer familiären Beteiligung vor. Im Gegensatz dazu konnte die Arbeitsgruppe um Gonzalez-Angulo des Cancer Centers in Houston bei 43% der Patientinnen eine positive Familienanamnese ermitteln. Diese klare Assoziation zur familiären Häufung bei den Probandinnen könnte unter anderem, eine Ursache für die im Vergleich zu uns ermittelte höhere Mutationsfrequenz sein.

5.6.4. BRCA1-Status und Alter

In einer Untersuchung, die sich mit dem klinischen Outcome tripel-negativer Patientinen unter Berücksichtigung des BRCA1-Mutationssatus beschäftigte, konnte gezeigt werden, dass Mutationträgerinnen im Vergleich zu Patientinnen ohne Mutation bei Erstdiagnose deutlich jünger waren ($p< 0,001$) (Lee, Alexander et al. 2011). Diese Beobachtung wurden von Gonzales-Angulo bestätigt ($p=0,005$)(Gonzalez-Angulo, Timms et al. 2011). Im Widerspruch dazu stellten sich unsere Ergebnisse dar. Mittels Chi-Quadrat-Testung konnte kein Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer Mutation des BRCA1-Genlokus und einem jüngeren Alter oder einer prämenopausalen Erkrankung gefunden werden. Diese Beobachtung wiederspricht vorangegangen Untersuchungen und ist am ehesten darauf zurückzuführen, dass bei den Mutationsträgerinnen eine Patientin mit somatischer Mutation und einem Erkrankungsalter von 70 Jahren die statistische Auswertung bei kleiner Fallzahl deutlich verändert. Denn das Risiko für Träger von Keimbahnmutationen ist, unabhängig vom Tumortyp, bereits in jungen Jahren an Krebs zu erkranken erhöht (Meindl and Cancer 2002).

5.6.5. Rezidivmuster

Tripel-negative Tumoren zeigen ein charakteristisches Rezidivmuster, das wohl in Zusammenhang mit den biologischen Eigenschaften dieser Tumoren steht. Als so genannter Intervall-Brustkrebs, treten die meisten Rezidive innerhalb der ersten drei Jahre nach Erstdiagnose auf. Es zeigte sich in unserem Kollektiv, das der Anteil an Rezidiven in den ersten 3 Jahren nach Diagnosestellung deutlich höher war, als der nach dem Ablauf der ersten 3 Jahre. In unserem Kollektiv traten 88% der Rezidivereignisse, innerhalb der ersten drei Jahr auf. Ähnliche Beobachtungen bezüglich des Rezidivverhaltens wurden auch von Dent und Kollegen beschrieben. Sie konnten zeigen, dass sich das Rezidivmuster in der Gruppe der tripel-negativen Tumoren von der Vergleichsgruppe unterschied. Patientinnen die an einem tripel-negativen Tumor erkrankten hatten innerhalb der ersten 5 Jahre nach Diagnosestellung ein erhöhtes Risiko für Fernmetastasen, danach jedoch ein geringeres Risiko als andere Subtypen (Dent, Trudeau et al. 2007). Für die Vergleichsgruppe blieb das Rezidivrisiko in der Follow-up-Periode konstant. In unserem Kollektiv trat insgesamt bei 25 Patientinnen (28,4%) innerhalb des beobachteten Intervalls ein Rezidiv auf. Bei der Auswertung wurde dabei nicht zwischen einem Lokal- oder einem Fernrezidiv im Sinne einer Metastasierung unterscheiden. Nur eine Mutationsträgerin erlitt innerhalb des beobachteten Zeitraums ein Rezidiv. Im Vergleich lag der Anteil an Rezidiven bei den Mutationträgerinnen mit 20% etwas unter dem der BRCA1-kompetenten Patientinnen (27,2%), jedoch nicht im Bereich der statistischen

Signifikanz. Aufgrund der so kleinen Fallzahl scheinen diese Ergebnisse nicht aussagekräftig genug. Betrachtet man sich die klinischen Daten der Mutationträgerinnen mit Rezidiv jedoch genauer so zeigt sich, dass die 37-jährige Patientin mit positiver Familienanamnese als einzige der Mutationsträgerinnen an einem duktolobulären Karzinom erkrankt ist. Eine Erklärung wäre ein möglicherweise unterschiedliches Verhalten dieses histologischen Typs im Hinblick auf eine chemotherapeutische Behandlung und Prognose.

Haffty et al. führten eine Studie bezüglich des Verhaltens von Lokal- und Fernrezidiven bei tripel-negativen Tumoren durch, die nach standardisiertem Therapieschema behandelt wurden. Dabei zeigte sich das im Vergleich zu der Kontrollgruppe kein erhöhtes Risiko für lokale Rezidive nach konservativer Therapie für die tripel-negative Gruppe bestand (Haffty, Yang et al. 2006). Da sich die Häufigkeit von Lokalrezidiven bei den tripel-negativen Tumoren also nicht von der anderer Tumorsubtypen unterscheidet, ist auch für sie eine brusterhaltende Therapie mit anschließender Bestrahlung zu befürworten. Jedoch sind Unterschiede in der Häufigkeit des Auftretens von Fernrezidiven beschrieben. Im Vergleich zu Kontrollgruppen erkranken Frauen mit tripel-negativen Tumoren häufiger an Fernrezidiven. Jedoch besteht laut Dent und Kollegen hier kein Zusammenhang zu lokalem Krankheitsprogress. Im Vergleich zu anderen Tumorsubtypen (20,4%) treten Fernrezidive bei tripel-negativen Patientinnen häufiger auf (33,9%) und sind für eine schlechte Prognose für das 5-Jahres-Überleben verantwortlich.

5.7. Prognostische Parameter

Die Bedeutung klassischer prognostischer Parameter ist auch für die Gruppe der tripel-negativen Mammakarzinome unbestritten. Unser Interesse galt der Untersuchung weitere Parametern, wie dem BRCA1-Status und dessen Bedeutung für prognostische Vorhersagen. Die zu diesem Zweck von uns durchgeführten univariaten und multivariaten Cox-Regressionsanalysen für das progressionsfreie Überleben zeigten wie erwartet, dass v.a. die Tumorgröße und der Nodalstatus relevante prognostische und unabhängige Parameter darstellen. Der BRCA1-Mutationsstatus allein konnte sich jedoch nicht als prognostischer Parameter erweisen. Um eine genauere Einschätzung des tatsächlich nur auf die Mutationen zurückzuführenden Effekts zu klären, wurde eine Darstellung der multivariaten Cox-Regressionsanalysen mittels Forrest-Plot gewählt. Dabei wurde, unter konsekutiver Berücksichtigung der potentiellen Confoundervariabeln Tumorgröße und Nodalstatus, ein Forrest-Plot erstellt. Dabei zeigte sich für das progressionsfreie Überleben keine substanzielle

Evidenz für das Vorliegen eines Confounder-Effekts. Dies spricht für die Unabhängigkeit des durchaus klinisch relevanten Effekts des Mutationstatus auf das Überleben. Es ist also davon auszugehen, dass der Mutationsstatus als unabhängiger prognostischer Parameter durchaus Bedeutung hat. Unsere fehlende statistische Signifikanz ist möglicherweise auf die zu kleine Fallzahl zurückzuführen.

5.8. Überlebenskurven

Innerhalb der Gruppe der tripel-negativen Tumoren gibt es trotz der im allgemein schlechten Prognose, die auf einen Anteil an sehr aggressiv verlaufenden Erkrankungen zurückzuführen ist, immer wieder moderate Verläufe und zum Teil auch gute Therapieansprechen. Es stellt sich nun die Frage welche tumorbiologischen Eigenschaften diesen unterschiedlichen Krankheitsverläufen zu Grunde liegen. Eine mögliche Hypothese führt Unterschiede in der Prognose auf den Funktionszustand des BRCA1-Gens bei tripel-negativen Patientinnen gerade im Hinblick auf ein Therapieansprechen zurück.

Die von Gonzales-Angulo und Kollegen durchgeführte Untersuchunge kann diese Hypothese mit den ermittelten Daten stützen. In ihrem tripel-negativen Kollektiv konnte nach antrazyklinhaltiger adjuvanter Chemotherapie ein verbessertes progressionsfreies Überleben für die Gruppe der Mutationsrägerinnen ermittelt werden (p=0,016) . Dieser Vorteil konnte jedoch nicht für das Gesamtüberleben gezeigt werden. Das rezidivfreie Überleben innerhalb der ersten fünf Jahre lag bei 51% für den WT und bei 86% für Mutationsträgerinnen (p=0,031). Beim 5-Jahres-Gesamtüberleben zeigte sich hingegen kein signifikanter Unterschied der beiden Gruppen (Gonzalez-Angulo, Timms et al. 2011).

Bereits im Jahr 2003 konnte die Arbeitsgruppe um Lambie zeigen, dass eine reduzierte Expression des BRCA1-Gen gemessen in sporadischen Tumoren zwar mit einem niedrigeren histologischen Differenzierungsgrad (G3) korrelierte, jedoch zu einem signifikant verlängerten rezidivfreien Intervall führte. Die Expression des BRCA1-Gens wurde dabei mittels immunhistochemischer Methoden untersucht und die Bestimmung der mRNA-Spiegel durchgeführt. Die BRCA1-Proteinexpression wurde mit bekannten prognostische Faktoren abgeglichen und ihr Wert für prognostische Vorhersagen evaluiert (Lambie, Miremadi et al. 2003).

Gegensätzliche Beobachtungen wurden durch Lee et al. beschrieben. Es wurden Frauen mit Stage I-III triple-negativem Brustkrebs untersucht, die mit alkylatienhaltiger Chemotherapie behandelt wurden. Zwischen den 46 Mutationträgerinen und den 71 Wildtypen bestand

bezüglich des rezidivfreien Intervalls und des Gesamtüberlebens kein Unterschied. Es zeigte sich lediglich eine vermehrte Neigung zur Entwicklung von Gehirnmetastasen bei Mutationsträgerinnen. Eine BRCA1-Muation stellte somit in ihren Untersuchungen keinen unabhängigen prognostischen Faktor für das Überleben dar (Lee, Alexander et al. 2011).

In einer weiteren Studie wurden das rezidivfreie und das Gesamtüberleben bei Hochrisikopatientinnen mit tripel-negativen Tumoren mit und ohne BRCA1-Mutationen verglichen. Alter, Rasse und Tumoreigenschaften unterschieden sich nicht zwischen den zwei Gruppen, zudem zeigte sich für das geschätzte 5-Jahres progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben kein Vorteil für die Mutationsträgerinnen. Die Gesamtprognose für Mutationsträger und Wildtyp-RCA1-Träger unterscheidet sich also nicht. In der multivariaten Analyse nach Korrektur von Alter und Krankheitsstadium zeigte sich jedoch ein verringertes Rezidivrisiko innerhalb der Gruppe der Mutationträgerinnen (Bayraktar, Gutierrez-Barrera et al. 2011).

Vergleicht man nun die von uns ermittelten Daten so liegen unsere Ergebnisse zwischen den beiden vorangegangenen Untersuchungen. Bei einer Beobachtungszeit bis hin zu 194 Monaten und einem medianen Followup von 63 Monaten zeigte sich in unserem Kollektiv bei 28,4% ein Krankheitsprogress im Sinne eines Rezidivs. 25,7% der Patientinnen verstarben, wobei ein Zusammenhang zur Grunderkrankung nicht immer eindeutig nachvollzogen werden konnte. Im Vergleich dazu zeigten sich Gonzalez-Angulo et al. 42% Rezidive und 45,5% Sterbefälle (Gonzalez-Angulo, Timms et al. 2011). Innerhalb der Gruppe der Mutationsträgrinnen trat bei einer von zehn Patientinnen eine Rezidiv auf. Zwei Mutationsträgerinnen verstarben, wobei jedoch bei beiden kein Rezidivereigniss dokumentiert war. Die Auswertung der grapischen Darstellung des progressionsfreien Übelebens und des Gesamtüberlebens mittels Kaplan Meier Kurven zeigte einen tendenziell leichten Vorteil für die Mutationsträgerinnen. Dieser Trend stellte sich zwar graphisch dar, konnte jedoch nicht durch statistische Argumente bestätigen werden.

Vergleicht man die Rezidivereignisse und Sterbefälle bei Gonzalez-Angulo und in unserm Kollektiv, so scheint es in unserer Gruppe weniger aggressive Verläufe zu geben. Dies könnte einen Erklärungsansatz dafür bieten, warum bei Gonzalez-Angulo et al. der Überlebensvorteil für BRCA1-Mutationsträgerinnen deutlicher ist. Einen weiteren Aspekt stellen die unterschiedlichen therapeutischen Vorgehensweisen in unserem Kolleketiv dar. Insgesamt 21% erhielten gar keine adjuvante Chemotherapie. Von den Mutationsträgerinen wurden 5

Patientinnen mit alkylierenden Antrazykline-Chemotherapeutika behandelt. Eine Patientin erhielt gar keine Therapie und zwei wurden nach anderen Schemata behandelt. Bemerkenswert ist, das beide verstorbenen Patientinnen nicht mit antrazyklinhaltigen Strategien therapiert wurden sondern das CMF-Schema erhielten. Die Rezidivträgerin wurde bei positiver Familienanamnese mit FEC behandelt.

5.9. Therapieoptionen

Bei der Betrachtung der klinisch und experimentell gewonnen Daten wird deren Interpretation vor allem unter dem Gesichtspunkt der möglichen Verbesserungen der Therapiestrategien durchgeführt. Obwohl viele Studien zeigen konnten, dass der tripel-negative Subtyp zum Teil ein sehr gutes Ansprechen auf bestimmte Chemotherapeutika aufzeigt, haben Patientinnen mit tripel-negativen Tumoren, eine immer noch schlechtere Prognose als andere Subtypen. In diesem Zusammenhang wird auch von dem tripel-negativen Paradoxon gesprochen (Carey, Dees et al. 2007). Es ist daher von Interesse und Gegenstand zahlreicher Untersuchungen die klassischen Chemotherapie-Regime im adjuvanten und neoadjuvanten Setting für den tripel-negativen Subtyp zu verbessern und anzupassen. Es wird sogar diskutiert, dass verbesserte Chemotherapieregime einen größeren Effekt bei hormonrezeptor-negativen Subtypen haben (Berry, Cirrincione et al. 2006). Zudem rückt die Substanzklasse der PARP-Inhibitoren in den Vordergrund therapeutischer Interessen. Die Wirksamkeit der Target-Therapie mit der Zielstruktur der defekten DNA-Reperatur wurde zunächst nur für BRCA-Mutationsträgerinnen postuliert. Jedoch wurde die Erforschung der Wirksamkeit dieser Stoffgruppe dann rasch aufgrund der bestehenden Gemeinsamkeiten zwischen BRCA-assoziierten und tripel-negativen Tumoren auf eben diese ausgeweitet.

Geht man davon aus, dass Unterschiede im Ansprechen der tripel-negativen Tumoren auf Chemotherapeutika bestehen so kann man mutmaßen, dass dies auf verschiedene Einflüsse bei der Tumorgenese und unterschiedliche genetischen Ausstattung der Tumorzellen zurückzuführen sind. In diesem Kontext gewinnt auch wieder die genauere Klassifizierung beziehungsweise Differenzierung von tripel-negativen und basalen Tumoren an Bedeutung und die Durchführung genetischer Tests zur Funktionsfähigkeit des BRCA1-Gens sowie die Darstellung von molekularen Expressionsprofilen.

5.9.1. „BRCAness“-Tumortyp innerhalb des sporadisch tripel-negativen/basalen Clusters

Tumore, die bei Trägerinnen von BRCA1-Keimbahnmutationen entstehen, zeigen zumeist einen tripel-negativen Phänotyp und weisen zu 80-90% ein basales Expressionsprofil auf (Turner, Tutt et al. 2004, Lakhani, Reis-Filho et al. 2005). Die Mehrheit der tripel-negativen respektive der basalen Karzinome entstehen jedoch nicht bei BRCA1-Mutationsträgerinnen, sondern sind sporadischen Ursprungs. Entsprechend der aktuellen Literatur und in Übereinkunft mit unseren Ergebnissen liegt der Anteil an Mutationträgerinnen im tripel-negativen Kollektiv zwischen 10-20%. Dabei handelte es sich in den meisten Fällen jedoch um Mutationen die hereditären Ursprungs sind. Sporadische Mutationen in BRCA1 sind hingegen eher selten (Futreal, Liu et al. 1994).

Obgleich gibt es Anhaltspunkte, dass eine Dysfunktion des BRCA1-Gens auch für die Pathogenese von sporadischen tripel-negativen/basalen Tumoren von Bedeutung ist. Denn sowohl die sporadischen tripel-negativen/basalen als auch die BRCA1-assoziierten Tumoren weisen Ähnlichkeiten in ihrer phänotypischen Präsentation auf. Aufgrund der möglichen BRCA1-Beteiligung an der Entstehung eben dieses Phänotyps prägten Turner et al. als erstes den Begriff des „BRCAness“ Mammakarzinoms (Turner, Tutt et al. 2004).

Die gemeinsamen klinisch-pathologischen Eigenschaften der BRCA1-assoziierten und tripel-negativen/ basalen Tumore sind vielfältig und bestehen zunächst vor allem in dem zumeist negativen Hormonrezeptorstatus und den entdifferenzierten Tumorstadien (G3). Es ist jedoch zu bemerken, dass es in der Gruppe der basalen und der BRCA1-assoziierten Tumoren einen geringen Anteil an hormonrezeptorpositiven Karzinomen gibt. Daneben kommen sowohl bei den tripel-negativen/basalen als auch bei den BRCA1-asoziierten Tumoren häufig Mutationen in einem weiteren Tumorsupressorgen, dem p53-Gen vor (Perou, Sørlie et al. 2000). Als Zeichen genomischer Instabilität treten zudem häufig aneuploide Chromosomensätze auf (Anders, Winer et al. 2010). Gemeinsam ist den Dreien ebenso die Präsentation eines basalen Expressionsmusters (Perou, Sørlie et al. 2000, Sørlie, Perou et al. 2001, Sorlie, Tibshirani et al. 2003, Livasy, Karaca et al. 2006, Cleator, Heller et al. 2007). Per Definition zeigt der basale Subtyp die Expression von basalen Cytokeratinen, aber auch der tripel-negative Subtyp und der BRCA1 assoziierte Subtyp zeigen in 42-88% und in 60-65% dieses Expressionsmuster (Foulkes, Stefansson et al. 2003, Carey 2011). Zudem zeigen beide Tumore häufig Deletionen am Chromosom 5q. Dieser Abschnitt enthält verschiedene Gene, die unter anderem für die DNA-Reparatur von Bedeutung sind (MSH3, RAD17, RAD50)

(Bergamaschi, Kim et al. 2006). Eine weitere Gemeinsamkeit stellen die hohen Prolifationsraten der Tumorsubtypen dar. Fridlyand und Kollegen konnten bei allen Dreien eine Anreicherung von Gensets ausmachen die im Zusammenhang mit der zellproliferativen Regulation stehen (Fridlyand, Snijders et al. 2006, Kwei, Kung et al. 2010). Es zeigen sich darüber hinaus häufig histologische Gemeinsamkeiten. Sporadische basale Tumoren weisen hohe Mitose-Indices auf, gelegentlich auch medulläre Eigenschaften, Lymphozyteninfiltrate und so genannte "pushing borders" die für BRCA1-assoziierte Tumoren typisch sind (Honrado, Benítez et al. 2006, Kwei, Kung et al. 2010).

Verschiedene Ursachen die für die Entstehung des BRCAness Phenotyps verantwortlich sind und die zuvor diskutierten Gemeinsamkeiten erklären könnten werden erläutert. Neben den klassischen Mutationen, die zu einem Funktionsverlust des BRCA1-Gens führen, können Einschränkungen in der Funktion des BRCA1-Gens und folglich des Proteins auch durch epigenetischen Veränderungen hervorgerufen werden. Es zeigte sich, das Methylierungen der Promotorregion des BRCA1 zu einer verminderten Proteinexpression führen können (Esteller, Silva et al. 2000, Turner, Reis-Filho et al. 2007). Catteau et al. beschrieben das eine reduzierte Expression des BRCA1-Gens aufgrund von Promotorhypermethylierung bei etwa 11-14% der sporadischen Mammakarzinome vorkommt. Diese Ergebnisse konnnten auch Birgisdottir bestätigen. Sie untersuchten ebenfalls die Häufigkeit von Methylierungen bei sporadischen Mammakarzinomen jedoch in einem unselektierten Kollektiv. Dabei zeigte sich bei 9,1% der Frauen epigenetische Veränderung der Promotorregion. Methylierte Tumoren waren dabei signifikant häufiger vom hormonrezeptornegativen Phänotyp und zeigten deutlich häufiger Deletionen des BRCA1-Gens (Birgisdottir, Stefansson et al. 2006). Im Rahmen des ASCO Kongress 2010 präsentierten Grushko et al. ihre Ergebnisse zur Untersuchung der Promotormethylierung als Marker für tripel-negative/ basale Tumore. Bei 43% der TNBC und bei 17% der non-TNBC konnte eine Promotormethylierung nachgewiesen werden. Dabei zeigte ein großer Anteil der Guppe der methylierten TNBC ein basales Expressionsmuster. Turner et al. ermittelten hingegen, dass Promoterhypermethylierung bei basalen Tumoren nicht signifikant häufiger waren als innerhalb der Kontrollguppe. Nichtsdestotrotz war die BRCA1-mRNA Expression bei den basalen Karzinomen auf die Hälfte reduziert. Die verminderte BRCA1- Expression korrelierte dabei deutlich mit der Expression von basalen Markern (Turner, Reis-Filho et al. 2007).

Als mögliche Ursache für die verminderter Expression des BRCA1-Gens, konnten Turner et al. jedoch ein weiteres Protein identifizieren. Das ID4 ist ein „helix-loop-helix" DNA-Binde-

Faktor der die Transkription von BRCA1 vermindert und somit einen negativen Regulator darstellt. In Ihren Untersuchungen konnten sie zeigen, das die Expression des ID-4 Proteins 9,1-fach erhöht war und zogen dies als möglichen Erklärungsansatz für die verminderte BRCA1-Expression in Erwägung. Wen et al. konnten diese Ergebnisse bestätigen. Auch in ihren Untersuchungen zeigte sich für TNBC eine erhöhte Expression von ID4 (Wen, Ho et al. 2012).

Eine weitere mögliche Ursache, auch in Verbindung mit der Hypermethylierung, stellen die so genannten LOHs dar. LOH bezeichnet dabei einen Verlust der Heterozygotie, innerhalb eines Genlokus. Es ist bekannt, dass LOHs häufiger bei hereditären BRCA-assoziierten Karzinomen vorkommen. So wird bei 86% der hereditären Karzinome ein LOH beobachtet, bei sporadischen Karzinomen treten LOH nur in 30% der Fälle auf. Rhiem et al. konnten zeigen, dass in hormonrezeptor-negativen Tumoren ebenfalls häufiger LOHs vorliegen als in hormorezeptor-positiven(Rhiem, Todt et al. 2010). Sie stellen die Hypothese auf, dass innerhalb der sporadischen Tumoren eine Subgruppe von Tumoren durch die LOHs ausgewiesen wird, die ihre Eigenschaften mit denen der familiären Karzinome teilen. In unserem Kollektiv konnte bei 77% der Tumoren mit BRCA1-Insuffizienz große Rearangements gefunden werden (unpublizierte Daten der Arbeitsgruppe), die das zweite Allel im Sinne der Two Hit Hypothese von Knudson betrafen (Esteller, Silva et al. 2000, Wei, Grushko et al. 2005, Birgisdottir, Stefansson et al. 2006).

Steffansson et al. konnten zeigen das es eine Gruppe von sporadischen Tumoren gibt, die sich ähnlich zu denen entwickeln, die bei BRCA1-Mutationsträgerinnen entstehen. Die Ähnlichkeiten reflektierten sich dabei in der Art der genomsichen Alterationen, bei der Verluste großer DNA Segmente typisch sind. Diese Gemeinsamkeiten führen sie, so die Hypothese auf eine defiziente homologe Rekombination zurück, die sowohl in sporadischen als auch hereditären Karzinomen vorkommen. Zudem scheinen auch Hinweise vorzuliegen, dass sowohl bei den basalen und auch der BRCA-assoziierten Tumoren Merkmale einer normalen X Inaktivierung fehlen (Richardson, Wang et al. 2006).

All diese Beobachtungen legen die Beteiligung einer mögliche BRCA1-Dysfunktion auch bei der Entstehung sporadischer tripel-negativer Tumoren nah, die in einer insuffizienten homologen Rekombination resultieren und so an der Entstehung des besagten Phänotyps beteiligt sind.

In diesem Zusammenhang führten Rodriguez et al. eine Untersuchung durch, die zeigen konnte, dass bei einem Teil der sporadisch auftretenden tripel-negativen Tumoren tatsächlich Defekte in DNA-Reperaturmechanismen vorliegen. Den Nachweis führten sie mit Hilfe von Gen-Expressionsanalysen. Als Konsequenz auf einen insuffzienten DNA-Reparaturweg (BRCA-pathway) kommt es zur Hochregulation von Genen die im Zusammenhang mit anderen an der DNA-Reparatur beteiligten Genen stehen. Diese spezifische Signatur deutet also auf eine defekte oder eingeschränkte DNA-Reperatur mittels homologer Rekombination hin und ist sowohl bei BRCA-assoziierten als auch bei einem Teil der tripel-negativen Tumoren zu finden (Rodriguez, Makris et al. 2010).

Santarosa et al. diskutieren im Gegensatz dazu einen weiteren Aspekt. Sie gehen davon aus, dass der Verlust der DNA-Integrität durch den Verlust der Funktion des BRCA-Gens als Reparaturgen nicht ursächlich mit der Enstehung des Phänotyps in Verbindung steht. Vielmehr bringen sie die Funktion des BRCA1-Gens als Regulator der Transkription in Zusammenhang mit der Enstehung des BRCAness- Phänotyps. So gibt es Hinweise, dass die Fähigkeit von BRCA1, sich negativ auf die Transkription von Genen auszuwirken, eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des tripel-negativen oder basalen Phänotyps spielt. Ein Beispiel: BRCA1 unterdrückt, als Tumorsuppressorgen, die pro-proliferativen Signalwege, die durch den Östrogenrezeptor ERα aktiviert werden. Mehr als 90% der östrogen-induzierbaren Gene werden vom BRCA1 unterdrückt (Xu, Fan et al. 2005) (Fan, Wang et al. 1999, Gorski, Kennedy et al. 2009, Santarosa and Maestro 2012). Auf der anderen Seite ist BRCA1 in seiner regulativen Funktion auch für die Aktivierung des Promotors von ERα und dessen Transkription verantwortlich. Eine fehlende BRCA1-Funktion erklärt daher die ER-Negatitivät BRCA1-assoziierter Tumoren. BRCA1 wirkt sich auch im geregelten Zellzyklus negativ auf die Expression des EGFR aus. Bei BRCA-Defizienz sehen wir daher häufige eine Überexpression des „Epidermal-Growth-Factor-Receptor“ (Santarosa and Maestro 2012).

Einen weiterern interessanten Aspekt stellt die Funktion des BRCA1 bei der Entwicklung und der Differenzierung epithelialen Brustdrüsengewebes dar. BRCA1 scheint eine Rolle bei der Transformierung der hormonrezeptor-negativen Stammzelle hin zu einer hormonrezeptor-positiven Progenitorzelle zu spielen (Liu, Ginestier et al. 2008). Kwei et al. schlussfolgern das für die Entwicklung eines tripel-negtaiven Phänotyps eine irgendwie geartete BRCA1-Dysfunktion vorliegt, die zur fehlenden Expression eines Östrogenrezeptors und einem spezifischen Muster genomischer Alterationen führt (Kwei, Kung et al. 2010).

Laut Kwei und Kollegen besteht jedoch bisher kein Beweis für eine tatsächliche Insuffizienz der Homologen Rekombination bei basalen Mammakarzinomen. Betrachtet man sich die Tumoren, die bei Keimbahnmutationsträgerinnen im BRCA2 entstehen, so zeigen diese keine histotypische Spezifität. Zudem zeigen BRCA2-assoziierte Tumoren häufig einen positiven Hormonrezeporstatus und weisen andere Muster genomischer Alteration als die BRCA1-asoziierten Tumore auf. Obwohl auch BRCA2 eine Schlüsselrolle bei der Homologen Rekombination im Zusammenhang mit RAD51 hat, führen die bei BRCA2-Mutationsträgerinnen entstandenen Tumoren nicht zu dem klassischen „ basal- like“ BRCA1-assoziierten Erscheinungsbild. Möglicherweise hängt also die Erklärung für die Entstehung des BRCAness Phänotyps nicht mit der homologen Rekombination sondern mit einer anderen Funktionen des BRCA1-Gens zusammen (Kwei, Kung et al. 2010). Obwohl BRCA1 und 2 für die Überwachung der genomischen Intergrität von Bedeutung sind, scheint ihre Insuffizienz auf verschiedenen Wegen zur Entwicklung von Brustkrebs zu führen (Stefansson, Jonasson et al. 2009), (Santarosa and Maestro 2012).

Die Komplexität die einer verminderten Funktion des BRCA1 Proteins innerhalb seines Wirkungsspektrums (Tumorsuppression, Transkriptionregulation, DNA Reparatur, Chromatinremodeling) zugrunde liegt muss Ziel weiterer Untersuchungen sein. Zwar führt eine insuffiziente Homologe Rekombination zu Fehlern in der DNA-Reparatur und trägt somit zu einer genetischen Instabilität bei, die karzinogen wirkt, jedoch kann gerade diese Insuffizienz von Interesse für therapeutische Belange sein. Gerade im Hinblick auf den Einsatz gezielter neuer Therapiestrategien rückt also die insuffiziente DNA-Reparatur bei bestehender BRCA1-Dysfunktion als Target in den Vordergrund. So läßt sowohl der Einsatz klassischer Chemotherapeutika als auch der Einsatz der neuen Substanzgruppe der PARP-Inhibitoren vermuten, dass eine Verbesserung der Therapie durch gezielte Indikation erreicht werden kann. Der Einsatz effektiver Therapieregime steht somit zunehmend in Zusammenhang zu der Durchführung genetischer Testung, der Funktionsfähigkeit des BRCA1- Gens und der Ermittlung von molekularen Expressionsprofilen.

5.9.2. Einsatz klassischer Chemotherapeutika

Präklinische Modelle konnten zeigen, dass neoplastische Zellen die Defekte im BRCA1-Gen haben, und denen somit ein möglicher DNA-Reparaturmechanismus fehlt , sensibler auf DNA schädigende Agenzien sind (Kennedy, Quinn et al. 2004, Santana-Davila and Perez 2010).

Es konnte gezeigt werde, dass vermutlich als Konsequenz auf eine insuffiziente DNA-Reparatur eine bessere Sensitivität der BRCA1-defizienten Zellen auf antracyklinhaltige Chemotherapieregime besteht. Diese liegt so wird angenommen, an den interkalierenden Eigenschafen dieser Substanzgruppe die direkten Schaden an der DNA hervorrufen. Auf der Grundlage von molekularbiologischenen Expressionsanalysen befassten sich Carey et al. mit dem Krankheitsverlauf von Patientinen unterschiedlicher Brustkrebssubtypen. Dabei nahmen sie eine Einteilung nach drei immunhistochemischen Profilen vor. Die Patientinnen wurden alle mit einer klassischen antrazyklin-basierten neoadjuvanten Chemosequenz (Doxirubicin, Cyclophosphamid) therapiert. Zur Auswertung wurden die klinische und pathologische Responsrate sowie das rezidivfreie Überleben und das Gesamtüberleben herangezogen. Es zeigte sich, dass der basale Subtyp sensitiver für die antracyclin-basierte neoadjuvante Chemotherapie war und ein signifikant besseres klinisches Ansprechen zeigte. Insgesamt bestand jedoch weiterhin eine schlechtere Prognose für Patientinnen des basalen Subtyps, Erklärbar durch höhere Rezidivraten bei Patientinnen, die nach neoadjuvanter Behandlung noch Tumorresiduen zeigten. Diese Eigenschaften spiegeln sich daher in dem von Carey et al. geprägten Begriff des tripel-negativen Paradoxons wieder. Dieses Paradoxon beschreibt eine signifikant erhöhtes komplettes pathologisches Ansprechen (pCR) auf antrazyklinhaltiger Chemotherapie, mit einem ausgezeichneten Überleben, jedoch einer verheerenden Prognose bei Therapieversagen (Carey, Dees et al. 2007).

Die Ergebnisse von Liedtke et al. stimmen mit diesen Beobachtungen überein. Sie konnten in einer prospektiven Studie zum Überleben von Patientinnen mit TNBC nach neoadjuvanter Behandlung zeigen, dass im tripel-negativen Kollektiv eine signifikant häufigere pCR erreicht werden konnte. Bei fehlendem Ansprechen bestand jedoch weiterhin ein deutlich schlechtere 3-Jahres-Prognose für ein rezidivfreies Überleben der tripel-negativen Patientinnen im Vergleich zu den nicht tripel-negativen Kontrollen. Auch für das Gesamtüberleben zeichnete sich dieser Trend ab (Liedtke, Mazouni et al. 2008). Rodriguez et al. gehen wie bereits erwähnt davon aus, dass ein bestimmtes Expressionsmusters Hinweise auf die Funktionsfähigkeit der DNA-Reparatur gibt und leiten daraus eine Prognose für die Sensitivität auf antrazyklinhaltige Chemoregime und eine mögliche Resistenz auf Taxane ab. (Rodriguez, Makris et al. 2010)

Nach Hinweisen zur Wirksamkeit der Platine innerhalb präklinischer in vivo Studien an BRCA-insuffizienten Zelllinien (Lippman, Allegra et al. 1978) zeigten sich auch gute Therapieresultate für die Substanzgruppe der Platine im neoadjuvanten Setting . Platinhaltige

Chemotherapeutika wie z.B. Cisplatin zeichnen sich ebenfalls dadurch aus, dass sie direkt mit der DNA der Tumorzellen interagieren. Dabei führen sie durch direkte Bindung zu einer Quervernetzung der DNA, zu einer Hemmung der Replikation und im Verlauf zu Doppelstrangbrüchen. Somit stehen sie in direkter Verbindung zu der Homologen Rekombination die durch das BRCA1-Gen gesteuert wird. In einer relativ kleinen Studie konnten Byrski et al. zeigen, dass BRCA1 Mutationsträgerinnen die neoadjuvant mit cisplatinhaltigen Therapieregimen behandelt wurden hervorragende Ansprechraten im Sinne einer pCR im Vergleich zu anderen Chemotherapeutika zeigten (pCR 83%) (Byrski, Gronwald et al. 2010). Die Ergebnisse müssen jedoch aufgrund der kleinen Probandenzahl (nur 12 Patientinnen) und dem retrospektiven Ansatzt differenziert betrachtet werden.

Ähnliche Ergebnisse konnten auch Silver et al. präsentieren. Sie befassten sich gezielt mit dem Einsatz von Cisplatin in einer Gruppe tripel-negativer Patientinnen in der es keine gezielte Anreicherung von Mutationtsträgerinnen gab. In dem Kollektiv von 28 Frauen erreichten 22% eine pCR, darunter zwei Patientinnen mit einer BRCA1-Keimbahnmutation. Insgesamt zeigten 64% ein gutes bis sehr gutes Ansprechen. Gutes Ansprechen war dabei korreliert mit jungem Alter, geringer BRCA-mRNA-Expression, BRCA1-Promotormethylierung, p53-Mutationen und der Genexpressionssignatur E2F3. Daraus zogen Silver und Kollegen die Schlussfolgerung das Cisplatin in einem bestimmten Teil des tripel-negativen Kollektivs eine sehr gute Wirksamkeit zeigt und stellten die Hypothese auf, dass dies im Zusammenhang mit einer verminderten BRCA1-Expression stehen könnte (Silver, Richardson et al. 2010).

Auch Siroho et al. bestätigten diese Ergebnisse. Sie konnten zeigen, dass beim tripel-negativen Subtyp eine erhöhte Chemosensitivität für Platinderivate besteht. Die komplette pathologische Responsrate nach neoadjuvanter Chemotherpaie lag bei 88% (Sirohi, Arnedos et al. 2008). In einer differierenden Untersuchung zeigte sich jedoch in Kombination mit Bevacicumab, einem Humanen monoklonalen Antikörper, unter der neoadjuvanten Therapie mit Cisplatin geringere Ansprechraten (15%) (Ryan, Neoadjuvant cisplatin and bevacizumab in triple negative breast cancer (TNBC). In weiteren Studien in denen der Einsatz von Cisplatin in Kombination mit anderen Chemotherapeutika untersucht wurde zeigten sich Ansprechraten zwischen 40-65% (Torrisi, Balduzzi et al. 2008, Frasci, Comella et al. 2009).

Trotz dieser zum Teil positiven Ergebnisse ist der Einsatz von platinhaltigen Regimen bisher nur auf den Einsatz innerhalb klinischer Studien beschränkt. Weitere Studien müssen die Rolle der platinhaltigen Zytotoxika klären. Bis heute gibt es keine randomisierte Studie die

den klaren Vorteil von platinhaltigen Derivaten gegenüber anderern Chemotherapeutika zeigen konnte (Santana-Davila and Perez 2010).

Unter anderem bleibt auch die Bedeutung der taxanhaltigen Chemotherapien umstritten. Mehrere Studien konnten ein gute Wirksamkeit zeigen, jedoch bestehen auch Hinweise auf eine eingeschränkte Sensitivität bei BRCA1-Mutationsträgerinnen. Auf dem ASCO-Kongress stellte Laurence et al. eine retrospektiven Analyse vor, die zeigte, dass Docetaxel weniger wirksam bei tripel-negativen Tumoren war als eine antrhazyklinbasierte Chemotherapie(Laurence Simon 2012).

Antitubulin-Agenzien, wie Ixabeplione führen ähnlich den Taxanen zu einer Stabilisierung der Mikrotubuli und sorgen für einen Zellzyklusarrest und die Einleitung der Apoptose. Es zeigte sich, dass Patientinnen mit Brustkrebs vom basalen Typ eine vermehrte Expression von betaIII-Tubulin aufwiesen. Klinische Phase II Studien zeigten einen leichten Vorteil im progressionsfreien Überleben für Patientinnen die bei basalem Brustkrebs mit einer Kombination von Ixabeplione und Gemcetabienen behandelt wurden. Dieser Vorteil war jedoch statistsich nicht signifikant (HR=0,063)(C. E. Horak 2009).

5.9.3. EGFR

Es konnte nachgewiesen werden, dass die Hälfte der TNBC eine Expression des EGFR zeigen (Nielsen, Hsu et al. 2004). Die Expression ist mit einem schlechteren Outcome verknüpft. Der Einsatz des EGFR-Inhibitors Cetuximab in der Monotherapie zeigte jedoch keine signifikanten Ansprechraten. Weitere monoklonale-Antikörper werden in Ihrer Wirkungsweise untersucht (z.B. Throsinkinase-Inhibitor), aufgrund ihres nur indirekten Zusammenhangs mit BRCA1 jedoch nicht weiterführend diskutiert.

5.9.4. Zielgerichtete Therapie mit PARP-Inhibitoren

Wie bereits mehrfach angedeutet stellt der Einsatz und die Erforschung der Wirksamkeit von PARP-Inhibitoren bei der Gruppe der BRCA1-assozierten und möglicherweise darüber hinaus bei den BRCA1-insuffizienten tripel-negativen Tumoren einen wichtigen Ansatz bei der Erweiterung therapeutischer Optionen dar.

PARPs sind eine kleine Gruppe von Enzymen die von Bedeutung für die Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen sind. PARP1 zum Beispiel ist dabei als nukleäres Zinkfinger Protein an der Basenexzisionsreparatur beteiligt. Bei Inhibition der Funktion kommt es zur Akkumulation von DNA-Einzelstrangbrüchen, die bei proliferierenden Zellen während der Replikation die Funktion der Replikationsgabeln beeinträchtigen und so zu DNA-

Doppelstrangbrüchen führen. Doppelstrangbrüche können unter anderem durch die fehlerfreie Homologe Rekombination repariert werden deren Voraussetzung ein intakter BRCA-Pathway ist. Neben der homolgen fehlerfreien Rekombination bestehen noch zwei weitere Mechanismen der DNA-Doppelstrangreparatur. Die NHEJ (non homologous end joining) und die SSA (single strand annealing) sind jedoch weniger genau und führen als einzige intakte Mechanismen zur genetischen Instabilität. Obwohl die PARPs nicht direkt an der Reparatur von Doppelstrangbrüchen beteiligt sind, scheinen sie regulative Funktion bei der DNA-Reparatur zu übernehmen, indem sie auch über ihre Zink-Finger Domäne an Doppelstrangbrüche binden. Zudem scheinen PARPs an der nichthomologen Rekombination beteiligt zu sein, und sogar die Zelle an der Einleitung anderen Reparaturwegen zu hindern (Saleh-Gohari, Bryant et al. 2005). So konnte bei PARP-knock-out Mäusen gezeigt werden, dass ihre Zellen ein erhöhtes Maß an Homologer Rekombination zeigten (Helleday, Bryant et al. 2005). Es erwies sich sogar, dass eine erhöhte PARP Expression mit agressiveren Tumoreigenschaften und einer schlechteren Langzeitprognose korreliert (von Minckwitz, Müller et al. 2011). Man geht nun davon aus, dass bei bestehendem Funktionsverlust der DNA Reparatur mittels des BRCApathway(HR) und zusätzlicher Inhibierung der PARPs es zur der so genannten Synthetischen Letalität kommt. Unter Synthetischer Letalität versteht man das Zusammenwirken von zwei Defekten an unterschiedlichen Stellen der DNA-Reparatur (oder anderen Stellen des Zellzykluses) von denen einer allein zu kompensieren wäre, jedoch ihrer Kombination zur Einleitung der Apoptose führt. Erstmal wurde diese Theorie 1922 von Bridges beschrieben und die Definition dieses Sachverhalts 1946 durch Dobzhansky (Dobzhansky 1946) formuliert (Dedes, Wilkerson et al. 2011). Dieses bereits vor langer Zeit erkannt Konzept scheint für die heutige Antitumortherapie von Relevanz.

Präklinische Studien mit PARP-Inhibitoren

Bereits durchgeführte Studien konnten sowohl in vitro als auch in vivo zeigen, dass BRCA1-defiziente Zellen in der Tat auf den Einsatz von PARP-Inhibitoren in beschriebener Weise reagieren.

Die Untersuchungen sowohl an BRCA1-defizienten Zelllinien, als auch an knock-out Mäusen konnten belegen, dass bei eingeschränkter DNA- Reparatur durch den BRCA-Pathway eine Prädisposition der Zellen für eine Inhibierung der PARP-Enzymaktivität besteht, was in der Folge zur chromosomaler Instabilität, Zellzyklusaresten und schließlich zur Apoptose führt (Bryant, Schultz et al. 2005, Farmer, McCabe et al. 2005). Zudem konnten weiterführende in

vitro-Untersuchungen zeigen, dass die Kombination von PARP Inhibitoren und platinhaltigen Substanzen/Gemcitabinen oder ionisierender Strahlung den Effekt der eingesetzten PARP-Inhibitoren verstärken können. In Übereinkunft konnten Rottenberg und Kollegen mit Hilfe eines Mausmodell zeigen, dass der PARP Inhibitor Olaparib (AZD2281) zu einer Verbesserung des Überlebens führt und dieses in Kombinationstherapie mit Cisplatin oder Carboplatin noch gesteigert werden konnte (Rottenberg, Jaspers et al. 2008). Auch MK4827, eine weiterer PARP-Inhibitor, konnte in Zellen mit defekter homologer Rekombination gezielt synthestiche Letalität hervorrufen. Dabei wurden neben BRCA-insuffizienten Zelllinien auch solche mit Defekten in anderen Genen der HR untersucht(Sandhu, Schelman et al. 2013).

Der PARP-Inhibitor Veliparib konnte sowohl als Monotherapie als auch in Kombination mit Platinen oder Radiotherpapie in präklinischen Tumormodellen ein Tumorregression herbeiführen (Donawho, Luo et al. 2007, Yang, Kummar et al. 2009, Efimova, Mauceri et al. 2010). Auf dem ASCO2012 wurde eine Studie vorgestellt die davon ausgeht, dass der PARP-Inhibitor Olaparib wirkungsvoller ist als Iniparib (**Maura B. Cotter** 2012)

Klinische Studien mit PARP-Inhibitoren

Diese vielversprechenden Ergebnisse präklinischer Forschung führten zu einer Anwendung von PARP Inhibitoren innerhalb erster klinischen Studien, zunächst bei BRCA-Mutationsträgerinnen und dann auch darüber hinaus bei fortgeschrittenem tripel-negativem Brustkrebs. Die Wirkungsweisen verschiedener PARP Inhibitoren wurden und werden innerhalb unterschiedlicher klinischer Settings erforscht.

So wurde der orale PARP-Inhibitor Olaparib erstmals in einer klinsichen Phase I Studie innerhalb einer Gruppe von Patientinnen (OvCA, MaCa, PCA) eingesetzt, bei denen eine Anreicherung von BRCA-Mutationsträgerinnen zu erwarten war (Fong, Boss et al. 2009). Bei annehmbarer Toxizität und überschaubaren Nebenwirkungen konnte ein Antitumoreffekt nur bei BRCA Mutationsträger/innen erzielt werden, wohingegen kein Ansprechen bei den Wildtypen beobachtet wurde. Ein Phase II Multicenter-Studie aus dem Jahr 2010 untersuchte Patientinnen mit fortgeschrittenen Mammakarzinomen gesicherten hereditären Ursprungs (BRCA1/2). Dabei wurde unter Berücksichtigung der Verträglichkeit die Effektivität einer Olaparib-Monotherapie untersucht. Es zeigte sich bei der Auswertung ein hervorragender therapeutischer Index mit objektiven Responsraten bis zu 41% innerhalb der Gruppe, die mit der höheren Dosierung (400mgx2d) behandelt wurden (Tutt, Robson et al. 2010). Auch bei

BRCA-assozierten Ovarialkarzinomen konnten durch den Einsatz von Olaparib ähnliche Wirkungen erzielt werden (Audeh, Carmichael et al. 2010). Trotz dieser positiven Ergebnisse hat die Firma AstraZeneca keine Durchführung einer Phase III Studie mit Olaparib für den Einsatz bei Brustkrebs geplant (Hiller and Chu 2012).

Antitumoraktivität bei BRCA-Mutationträgerinnen konnte auch bei der Monotherapie mit den beiden PARP Inhibitoren AGO14699 und MK4827 beobachtet werde. Schelman et al. konnten in einer Phase I Studie die Antitumorwirksamkeit des oralen PARP Inhibitor MK4827 bestätigen. Dabei bestand sowohl für BRCA-assoziierte, als auch für Mammakarzinome sporadischen Ursprungs ein positiver Effekt (W. R. Schelman).

5.9.5. PARP und TNBC

Im Jahr 2009 wurde auch erstmals gezielte Unteruchungen der Wirksamkeit von PARP Inhibitoren innerhalb der Gruppe der tripel-negativen Tumoren durchgeführt(O'Shaughnessy 2012).

So wurde die Wirksamkeit und Verträglichkeit von BSI-201 (Iniparib), einem intravenös wirksamen PARP-Inhibitor, bereits in Phase I Studien bestätigt. O Shaughnessy et al. untersuchten in Folge einer randomisierten Phase II Studie bei metastatsiertem tripel-negativem Mammakarzinom in einer Gruppe von 123Patienen die Effektivität und Sicherheit bei zusätzlicher Gabe von Iniparib (O'Shaughnessy, Osborne et al. 2011). In Kombination mit Gemcitabinen und Carboplatin zeigte sich ein signifikant verbesserten OS (p=0,01), PFS (p=0,01) im Vergleich zum Studienarm mit alleiniger Gemcitabin und Carboplatintherapie. Zusammenfassend bestand eine Verbesserung des klinischen benefits als Endpunkt der sich aus dem objektiven Ansprechen und einer stable disease für mindestens 6 Monate zusammensetzt (von 34% auf 56%, p=0,01) und eine Verbesserung der Overallresponse von 32% auf 52%. Zudem konnte gezeigt werden, dass es zu keiner Potenzierung der NW kommt, und somit eine gute Verträglichkeit besteht (O'Shaughnessy, Osborne et al. 2011). Diese positiven Ergebnisse die einen Überlebensvorteil bei metastasierten TNBC zeigen konnten sollten in einer folgenden Studie bestätigt werden.

Im Rahmen dieser Phase III- Studie wiesen die Untersuchungen differierende Ergebnisse auf. Zwar konnte ein verlängertes progressionsfreies Überleben für die mit Iniparib behandelte Gruppe beobachtet werden, jedoch erreichte dies mit einem p-Wert von 0,027 nicht den vorher festgelegten p-Wert von 0,001(J. O'Shaughnessy 2011). Ein Gesamtüberlebensvorteil konnte für die zusätzliche Gabe von Iniparib nicht mehr nachgewiesen werden. Als Erklärungsversuche für diese enttäuschenden Ergebnisse wurden unter anderem der strenge

Endpunkt, aber auch die Unterschied in den einzelnen Studienarmen bezüglich der Vorbehandlung diskutiert. Zudem wurde der BRCA-Status nicht berücksichtigt und es zeigten sich nur wenige Tumore vom basalen Subtyp. Darüberhinaus wechselten viele Probandinnen die Gruppe von GC (Gemcitabine und Carboplatin) zu GCI (Gemcitabine, Carboplatin und Iniparib). Patientinnen, die bereits mehrfach chemotherapeutisch vorbehandelt waren zeigten jedoch ein besseres Ansprechen. Tutt diskutierten zudem auf dem ASCO-Kongress eine zu kleine Kohorte als Ursache für die eher enttäuschenden Ergebnisse und grundsätzliche Probleme bei Zulassungsstudien der Phase III. Eine weiter Studie die erstmals beim ASCO Kongress vorgestellt wurde zeigte, dass die Kombination von Iniparib plus Paclitaxel im neoadjuvanten Setting bei tripel-negativen Tumoren keinen Potenzierung der Nebenwirkung aufwiesen, jedoch auch kein signifikanter unterschied der pCR innerhalb der Studienarme bestand(Antonio Llombart 2012)

Bei zwei weiteren Studien bestand ebenfalls kein eindeutiger Effekt der Therapie mit PARP-Inhibitoren. Zwar konnten Gelmon et al. in einer klinischen Phase II Studie zeigen, dass auch die alleinige Gabe von PARP-Inhibitoren als Monotherapie gute wirksam war und eine kombinierte Therapie im Gegensatz dazu kein Ansprechen hervorrief. Auch eine weitereführende Studie bestätigte, dass eine nur beschränkte Wirksamkeit bei Brustkrebspatientinen bestand, während bei Ovarialkarzinoma die Therapie ansprach(Gelmon, Tischkowitz et al. 2011).

5.9.6. BRCA-unabhängige Wirkungsfelder der PARP-Inhibitoren

Da nun Hinweise für die Wirksamkeit von PARP-Inhibitoren bei BRCA-Mutationsträgern aber auch bei tripel-negativen Tumoren bestehen, wurden weitere Untersuchungen bei diesen Tumorsubtypen durchgeführt. Neben der Wirksamkeit bei mutierten Zellen sollte auch die Effizienz der PARP-Inhibitoren bei durch epigenetischer-Regulation veränderter BRCA-Funktion getestet werden. Drew et al. konnten an BRCA1/2 defizienten Zelllinien zeigen, das der PARP-Inhibitor AGO14699 Antitumoraktivität aufweist(Drew, Mulligan et al. 2011). Eine Wirksamkeit konnte sowohl bei den Zelllinien, deren BRCA-Funktion durch Mutationen eingeschränkt wurde, als auch bei denen, die durch epigenetische Mechanismen verändert wurden, nachgewiesen werden. Auch Veeck et al. konnten zeigen, dass Hypermethylierung der Promotorregion des BRCA1 zu einer Sensitivität für PARP Inhibitoren führen (Veeck, Ropero et al. 2010).

Es stellte sich zudem heraus, das PARP Inhibitoren möglicherweise unabhängig vom BRCA-Gen eine Wirksamkeit besitzen könnten. Nicht allein eine isolierte BRCA1-Defizienz als viel mehr ein genereller Fehler in der homolgen Rekombination kann ursächlich für das Ansprechen auf PARP-Inhibitoren vermutet werden. So diskutieren Dedes et al. die Möglichkeit anderer an der Homologen Rekombination beteiligter Gene, die im Zusammenspiel mit einer PARP-Inhibition ebenfalls zu einer synthetischen Letalität und somit Wirksamkeit dieser Substanzklasse führen (Dedes, Wilkerson et al. 2011). Unter anderem könnten auch Veränderungen im ATM-Gen dem PALB2 Gen oder dem PTEN Gen zu einer Sensitivität gegenüber PARP-Inhibitoren beitragen. Dies könnte weitere interessante Ansatzpunkte für die genetischen Untersuchungen innerhalb der Gruppe der tripel-negativen Tumoren bieten. Gerade weil eine insuffiziente-HR auch als mögliche Voraussetzung für die Entwicklung des BRCAness Phänotyp diskutiert wird. Es besteht aber auch die Hypothese, dass gerade andere Mutationen als die des BRCA1-Gens beteiligt sein könnten. Es ist möglich das angesprochene Veränderungen in andere Gene die am HR-Reparaturwegs beteiligt sind auch nur im Tumor selbst auftreten könnten, also sporadischer Genese sind. Fong et al. bringen weiter mögliche Kanditaen-Gene ins Spiel (ATM, RAD51, ATR, CHK1.2. u.a.), FA-repaire pathway)(Fong, Boss et al. 2009). Zum Beispiel gibt es Hinweis darauf, dass PARP-Inhibitoren auch bei Tumoren mit einer Mutation im PTEN wirksam sind. Auch PTEN beteiligt sich an der Homologen Rekombination. Bei ungefähr 50% der tripel-negativen Tumoren ist eine Funktionsverlust des PTEN-Gens auszumachen (Pandolfi 2004, Saal, Johansson et al. 2007).

6. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Studie war es, die tatsächliche Häufigkeit von BRCA1-Mutationsträgerinnen in einem unselektierten tripel-negativen Kollektiv zu ermitteln. Diese Fragestellung ergibt sich zwangsläufig, wenn man die gemeinsamen molekularbiologischen Eigenschaften von BRCA1-assoziierten und einem Teil der tripel-negativen Tumoren bedenkt. Obwohl der Großteil der bei BRCA1-Mutationsträgerinnen entstehenden Tumore einen tripel-negativen basal-like Phänotyp aufweist (60-70%), konnten vorangegangene Untersuchungen im Umkehrschluss einen nur kleinen Anteil an Mutationsträgerinnen in tripel-negativen Kollektiven ermitteln (9-15%) (Gonzalez-Angulo et al. AM 2011, Young et al. SR 2009). Von Interesse war daher neben der Inzidenz von BRCA1-Mutationen in einem deutschen unselektierten Kollektiv, die Einteilung dieser in Mutationen hereditären und somatischen Ursprungs, da betroffene tripel-negative Brustkrebspatientinnen mit unklarer familiärer Belastung dem genetischen Screening und der intensiveren Betreuung zusätzlich zugeführt werden könnten. Zum anderen sollte ein potentiell größerer Nutzen chemotherapeutischer Behandlung bei BRCA1-Mutationsträgerinnen im Vergleich zum Wildtyp untersucht werden. Die Relevanz dieser Fragestellung ist vor allem auch vor dem Hintergrund der bisher schlechten Prognose und möglicher neuer Therapiestrategien zu bewerten, die auf eine insuffiziente BRCA1-Funktion abzielen.

Die ermittelte Mutationsfrequenz des tripel-negativen Kollektivs dieser Studie liegt bei 10% und bestätigt somit vorangegangene Untersuchungen. Es ist anzunehmen, dass drei der untersuchten Mutationen somatischer Natur sind, da es sich bei zweien um noch nicht vorbeschriebene Mutationen handelt, von denen eine bei einer Patientin entdeckt wurde, die erst im Alter von 78 Jahren erkrankte. Zudem konnte durch Testung von Blutzellen eine weitere somatische Mutation identifiziert werden. Eine positive Familienanamnese wurde hingegen bei nur zwei Patientinnen erhoben, von denen eine bereits der genetischen Testung unterzogen worden war. Bei allen anderen Patientinnen blieb die familiäre Belastung unklar, da hierzu keine Angaben bestanden. Es handelte sich jedoch um bekannte, häufig auftretende Mutationen und somit am ehesten auch um solche hereditären Ursprungs.

Die Tatsache, dass nur zwei Patientinnen aufgrund einer positiven Familienanamnese der genetischen Testung hätten zugeführt werden können, bei dreien eine somatische Mutation anzunehmen war, zu allen anderen Mutionsträgerinnen jedoch keine Informationen zur

familiären Belastung vorlagen, muss dazu führen, dass die Familienanamnese im klinischen Alltag in den Fokus der Diagnostik rückt. Zwar ist anzunehmen, dass nur ein kleiner Teil an somatischen Mutationen in tripel-negativen Kollektiven für die Entwicklung des BRCAness Typs verantwortlich ist und hier vor allem andere Mechanismen, wie epigenetische Veränderungen oder genetische Instabilität eine Rolle spielen, jedoch muss dies auch im Sinne der individualisierten Medizin dazu führen, über eine Reevaluation der Einschlusskriterien zur genetischen Testung nachzudenken. Hilfestellung könnte hierbei die Berücksichtigung weiterer klinischer Parameter geben. So lag die Mutationsfrequenz der unter 50-jährigen dieser Studie bei 18%. Allerdings traten zwei der vermutlich somatischen Mutationen in eben diesem Kollektiv auf. Wie viele Patientinnen tatsächlich zusätzlich genetisch getestet werden könnten, bleibt jedoch somit fraglich.

Aus der statistischen Auswertung der Ergebnisse dieser Studie geht hervor, dass kein statitisch signifikanter Überlebensvorteil sowohl im Gesamt-, als auch im progressionsfreien Überleben für die Mutationsträgerinnen in unserem Kollektiv besteht.

Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu vorangegangenen Studien, welche zeigen, dass bei eingeschränkter Fähigkeit zur DNA-Doppelstrangreparatur, das heißt bei vorliegender BRCA1-Insuffizienz, eine größere Sensibilität für DNA-schädigende Substanzen und Vorteile im Überleben für betroffene Patientinnen bestehen (Kennedy, Quinn et al. 2004, Santana-Davila and Perez 2010). Dies gilt sowohl für klassische Antrazyklin-basierte Chemotherapieregime als auch für platinhaltige Optionen (Carey, Dees et al. 2007) (Byrski, Gronwald et al. 2010). Darüber hinaus lieferten erste Studien ausgezeichnete Ergebnisse unter Einsatz der neuen Substanzgruppe der PARP-Inhibitoren auf Grundlage einer insuffizienten DNA-Doppelstrangreparatur. Folgestudien hingegen konnten diese Ergebnisse zunächst nicht bestätigen. Diese differierenden Resultate spiegeln nicht zuletzt die Heterogenität der Phänotypen des tripel-negativen Kollektivs wieder und können am ehesten auf eine unzureichende Klassifikation innerhalb des Kollektivs zurückgeführt werden. Die Schlüsselfrage, wer in der Gruppe der tripel-negativen Patientinnen tatsächlich vom Einsatz direkt DNA-schädigender Substanzen und neuer Therapioptionen (PARP-Inhibitoren bzw. Platinderivate) profitiert, bleibt zu klären. Forderungen nach der Erforschung spezifischer Biomarker werden laut. Denn neben dem Vorliegen von BRCA1-Keimbahnmutationen oder den selteneren somatischen Mutationen, können auch der Verlust der Heterozygotie und BRCA1-Hypermethylierungen zu einer defizienten homologen Rekombination führen. Aber auch Veränderungen anderer Gene, die an der BRCA1-abhängigen homologen

Rekombination beteiligt sind, könnten zur Ausbildung des BRCA-like/BRCAness Phänotyps führen (Kennedy et al. 2004) und für zielgerichtete Therapiestrategien prädestinieren.

Die Analysen von Expressionsmustern könnten dabei Hilfestellung zur Identifizierung des BRCA1-like TNBC Phänotyps geben. Audeh et al. sehen in einer Funktionstestung der homologen Rekombination selbst den Schlüssel für das gezielte Ansprechen auf PARP-Inhibitoren (Audeh et al. 2010). Zu beachten ist hier auch der von Lips et al. entwickelte MLPA-Assay, der als Indikator für die homologe Rekombination, beziehungsweise für die Identifizierung des „BRCA-like“-Typs dient (Lips, Mulder et al. 2011)(Vollebergh et al. 2010). Wie folgende Untersuchungen zeigen konnten eignet sich der molekulare Marker der BRCAness tatsächlich gut für die Vorhersage eines möglichen Ansprechens auf gezielt DNA-Doppelstrangreparatur betreffende Therapieoptionen. Zudem konnten im Umkehrschluss“ Non-BRCA-like“ tripel-negative Tumore von einer Therapie mit Carboplatin nicht profitieren (Oonk AM et al. 2012)(Vollebergh et al. MA 2012). Die Entwicklung von validen Modellen zur Testung des BRCA-like Phänotyps im klinischen Alltag scheint folglich eine wichtige Herausforderung zu sein.

7. Kritik an dieser Studie / Ausblick

Die angestellten Untersuchungen nehmen ihren Platz in einer Reihe von Forschungsarbeiten an tripel-negativen Tumoren ein. Die ermittelte Mutationsfrequenz innerhalb des Kollektivs entspricht den erwarteten Häufigkeiten. Der Umfang des Patientinnenkollektivs bildet mit etwa 100 Patientinnen allerdings eine relativ kleine Kohorte, von der wiederum insgesamt nur 79% chemotherapeutisch behandelt wurde. Weiterführende Untersuchungen sollten daher folgen um die Bedeutung des Zusammenhangs zwischen BRCA1-Funktion und dem tripel-negativen Phänotyp zu klären. Von Interesse ist dabei auch eine Untersuchung der Familienanamnese, gerade im Hinblick auf das Erkennen von sporadischen und hereditären Tumoren. Durch fehlende Informationen zum Stammbaum wurde die Zuordnung in dieser Studie erschwert. Zudem sollten Überlegungen bezüglich der Auswahlkriterien an die Probandinnen angestellt werden. So könnte eine Schichtung nach Alter bei der Interpretation der Mutationsgenese hilfreich sein.

Als abschließende Erkenntnis sei zu erwähnen, dass durch das zunehmende wissenschaftliche Interesse am tripel-negativen Mammakarzinom Fortschritte zum Verständnis dieser Tumorgruppe gemacht werden konnten. Neue Therapieoptionen geben Hoffnung für eine Verbesserung der Prognose der an tripel-negativen Tumoren erkrankten Frauen. Und auch von der Durchführung genetischer Diagnostik könnten bestimmte Patientinnen profitieren. Es bleibt jedoch der Anspruch, diesen besonderen Brustkrebssubtyp weiter zu erforschen und ein noch besseres Verständnis dessen charakteristischer Eigenschaften zu entwickeln.

8. Literaturverzeichnis

Adélaïde, J., P. Finetti, I. Bekhouche, L. Repellini, J. Geneix, F. Sircoulomb, E. Charafe-Jauffret, N. Cervera, J. Desplans, D. Parzy, E. Schoenmakers, P. Viens, J. Jacquemier, D. Birnbaum, F. Bertucci and M. Chaffanet (2007). "Integrated profiling of basal and luminal breast cancers." Cancer Res 67(24): 11565-11575.

Akbari, M. R., P. Tonin, W. D. Foulkes, P. Ghadirian, M. Tischkowitz and S. A. Narod (2010). "RAD51C germline mutations in breast and ovarian cancer patients." Breast Cancer Res 12(4): 404.

Akbari, M. R., S. Zhang, I. Fan, R. Royer, S. Li, H. Risch, J. McLaughlin, B. Rosen, P. Sun and S. A. Narod (2011). "Clinical impact of unclassified variants of the BRCA1 and BRCA2 genes." J Med Genet 48(11): 783-786.

Alistair C. Jones, J. A., Nancy Hansen1, Bastiaan Hoogendoorn,Peter J. Oefner1, Jeremy P. Cheadle and Michael C. O'Donovan[a] (1999). "Optimal Temperature Selection for Mutation Detection by Denaturing HPLC and Comparison to Single-Stranded Conformation Polymorphism and Heteroduplex Analysis." Clinical Chemistry 45 no. 8 1133-1140.

Anders, C. and L. A. Carey (2008). "Understanding and treating triple-negative breast cancer." Oncology (Williston Park) 22(11): 1233-1239; discussion 1239-1240, 1243.

Anders, C. K., E. P. Winer, J. M. Ford, R. Dent, D. P. Silver, G. W. Sledge and L. A. Carey (2010). "Poly(ADP-Ribose) polymerase inhibition: "targeted" therapy for triple-negative breast cancer." Clin Cancer Res 16(19): 4702-4710.

Antonini, N., H. Jones, J. C. Horiot, P. Poortmans, H. Struikmans, W. Van den Bogaert, I. Barillot, A. Fourquet, J. Jager, W. Hoogenraad, L. Collette, M. Pierart, G. Hart and H. Bartelink (2007). "Effect of age and radiation dose on local control after breast conserving treatment: EORTC trial 22881-10882." Radiother Oncol 82(3): 265-271.

Antonio Llombart, A. L., Cristian Villanueva, Suzette Delaloge, Serafin Morales, Judith Balmaña, Kepa Amillano, Herve R. Bonnefoi, Ana Maria Casas, Luis Manso, Henri Hubert Roche, Santiago Gonzalez-Santiago, Joaquin Gavila, Pedro Sánchez-Rovira, Serena Di Cosimo, Eric Charpentier, Ignacio Garcia-Ribas, Frederique Madeleine Penault-Llorca, Claudia Aura, José Baselga and SOLTI Group (2012). "SOLTI NeoPARP: A phase II, randomized study of two schedules of iniparib plus paclitaxel and paclitaxel alone as neoadjuvant therapy in patients with triple-negative breast cancer (TNBC)." J Clin Oncol (Meeting Abstracts)May 2012 vol. 30 no. 15_suppl1011.

Audeh, M. W., J. Carmichael, R. T. Penson, M. Friedlander, B. Powell, K. M. Bell-McGuinn, C. Scott, J. N. Weitzel, A. Oaknin, N. Loman, K. Lu, R. K. Schmutzler, U. Matulonis, M. Wickens and A. Tutt (2010). "Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer: a proof-of-concept trial." Lancet 376(9737): 245-251.

Bauer, K. R., M. Brown, R. D. Cress, C. A. Parise and V. Caggiano (2007). "Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry." Cancer 109(9): 1721-1728.

Bayraktar, S., A. M. Gutierrez-Barrera, D. Liu, T. Tasbas, U. Akar, J. K. Litton, E. Lin, C. T. Albarracin, F. Meric-Bernstam, A. M. Gonzalez-Angulo, G. N. Hortobagyi and B. K. Arun (2011). "Outcome of triple-negative breast cancer in patients with or without deleterious BRCA mutations." Breast Cancer Res Treat 130(1): 145-153.

Beckmann, M. W., D. Niederacher, T. O. Goecke, R. Bodden-Heidrich, H.-G. Schnürch and H.-G. Bender (1997). "Hochrisikofamilien mit Mamma- und Ovarialkarzinom: Möglichkeit der Beratung, genetischen Analyse und Früherkennung." Dtsch. Artzebl. A-161 / B-135 / C-131.

Bergamaschi, A., Y. H. Kim, P. Wang, T. Sørlie, T. Hernandez-Boussard, P. E. Lonning, R. Tibshirani, A. L. Børresen-Dale and J. R. Pollack (2006). "Distinct patterns of DNA copy number alteration are associated with

different clinicopathological features and gene-expression subtypes of breast cancer." Genes Chromosomes Cancer 45(11): 1033-1040.

Berry, D. A., C. Cirrincione, I. C. Henderson, M. L. Citron, D. R. Budman, L. J. Goldstein, S. Martino, E. A. Perez, H. B. Muss, L. Norton, C. Hudis and E. P. Winer (2006). "Estrogen-receptor status and outcomes of modern chemotherapy for patients with node-positive breast cancer." JAMA 295(14): 1658-1667.

Bertucci, F., P. Finetti, N. Cervera, E. Charafe-Jauffret, E. Mamessier, J. Adélaïde, S. Debono, G. Houvenaeghel, D. Maraninchi, P. Viens, C. Charpin, J. Jacquemier and D. Birnbaum (2006). "Gene expression profiling shows medullary breast cancer is a subgroup of basal breast cancers." Cancer Res 66(9): 4636-4644.

Bertucci, F., P. Finetti, N. Cervera, B. Esterni, F. Hermitte, P. Viens and D. Birnbaum (2008). "How basal are triple-negative breast cancers?" Int J Cancer 123(1): 236-240.

Birgisdottir, V., O. A. Stefansson, S. K. Bodvarsdottir, H. Hilmarsdottir, J. G. Jonasson and J. E. Eyfjord (2006). "Epigenetic silencing and deletion of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer." Breast Cancer Res 8(4): R38.

Bryant, H. E., N. Schultz, H. D. Thomas, K. M. Parker, D. Flower, E. Lopez, S. Kyle, M. Meuth, N. J. Curtin and T. Helleday (2005). "Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase." Nature 434(7035): 913-917.

Byrski, T., J. Gronwald, T. Huzarski, E. Grzybowska, M. Budryk, M. Stawicka, T. Mierzwa, M. Szwiec, R. Wisniowski, M. Siolek, R. Dent, J. Lubinski and S. Narod (2010). "Pathologic complete response rates in young women with BRCA1-positive breast cancers after neoadjuvant chemotherapy." J Clin Oncol 28(3): 375-379.

C. E. Horak, F. Y. L., L. Xu, S. Galbraith and J. Baselga (2009). "High β-III tubulin expression in triple-negative (TN) breast cancer (BC) subtype and correlation to ixabepilone response: A retrospective analysis."

Caestecker, K. W. and G. R. Van de Walle (2013). "The role of BRCA1 in DNA double-strand repair: past and present." Exp Cell Res 319(5): 575-587.
Carey, L. A. (2011). "Directed therapy of subtypes of triple-negative breast cancer." Oncologist 16 Suppl 1: 71-78.

Carey, L. A., E. C. Dees, L. Sawyer, L. Gatti, D. T. Moore, F. Collichio, D. W. Ollila, C. I. Sartor, M. L. Graham and C. M. Perou (2007). "The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes." Clin Cancer Res 13(8): 2329-2334.

Carey, L. A., C. M. Perou, C. A. Livasy, L. G. Dressler, D. Cowan, K. Conway, G. Karaca, M. A. Troester, C. K. Tse, S. Edmiston, S. L. Deming, J. Geradts, M. C. Cheang, T. O. Nielsen, P. G. Moorman, H. S. Earp and R. C. Millikan (2006). "Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study." JAMA 295(21): 2492-2502.

Carey, L. A., H. S. Rugo, P. K. Marcom, E. L. Mayer, F. J. Esteva, C. X. Ma, M. C. Liu, A. M. Storniolo, M. F. Rimawi, A. Forero-Torres, A. C. Wolff, T. J. Hobday, A. Ivanova, W. K. Chiu, M. Ferraro, E. Burrows, P. S. Bernard, K. A. Hoadley, C. M. Perou and E. P. Winer (2012). "TBCRC 001: Randomized Phase II Study of Cetuximab in Combination With Carboplatin in Stage IV Triple-Negative Breast Cancer." J Clin Oncol 30(21): 2615-2623.

Chacón, R. D. and M. V. Costanzo (2010). "Triple-negative breast cancer." Breast Cancer Res 12 Suppl 2: S3.

Chang, J., S. G. Hilsenbeck, J. H. Sng, J. Wong and G. C. Ragu (2001). "Pathological features and BRCA1 mutation screening in premenopausal breast cancer patients." Clin Cancer Res 7(6): 1739-1742.

Clarke, M., R. Collins, S. Darby, C. Davies, P. Elphinstone, E. Evans, J. Godwin, R. Gray, C. Hicks, S. James, E. MacKinnon, P. McGale, T. McHugh, R. Peto, C. Taylor, Y. Wang and E. B. C. T. C. G. (EBCTCG) (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(9503): 2087-2106.

Cleator, S., W. Heller and R. C. Coombes (2007). "Triple-negative breast cancer: therapeutic options." Lancet Oncol 8(3): 235-244.

Collett, K., I. M. Stefansson, J. Eide, A. Braaten, H. Wang, G. E. Eide, S. Thoresen, W. D. Foulkes and L. A. Akslen (2005). "A basal epithelial phenotype is more frequent in interval breast cancers compared with screen detected tumors." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 14(5): 1108-1112.

Dairkee, S. H., L. Puett and A. J. Hackett (1988). "Expression of basal and luminal epithelium-specific keratins in normal, benign, and malignant breast tissue." J Natl Cancer Inst 80(9): 691-695.
Dantzer, F., G. de La Rubia, J. Ménissier-De Murcia, Z. Hostomsky, G. de Murcia and V. Schreiber (2000). "Base excision repair is impaired in mammalian cells lacking Poly(ADP-ribose) polymerase-1." Biochemistry 39(25): 7559-7569.

de Ruijter, T. C., J. Veeck, J. P. de Hoon, M. van Engeland and V. C. Tjan-Heijnen (2011). "Characteristics of triple-negative breast cancer." J Cancer Res Clin Oncol 137(2): 183-192.
Dedes, K. J., P. M. Wilkerson, D. Wetterskog, B. Weigelt, A. Ashworth and J. S. Reis-Filho (2011). "Synthetic lethality of PARP inhibition in cancers lacking BRCA1 and BRCA2 mutations." Cell Cycle 10(8): 1192-1199.

Dent, R., M. Trudeau, K. I. Pritchard, W. M. Hanna, H. K. Kahn, C. A. Sawka, L. A. Lickley, E. Rawlinson, P. Sun and S. A. Narod (2007). "Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence." Clin Cancer Res 13(15 Pt 1): 4429-4434.

Diaz, L. K., V. L. Cryns, W. F. Symmans and N. Sneige (2007). "Triple negative breast carcinoma and the basal phenotype: from expression profiling to clinical practice." Adv Anat Pathol 14(6): 419-430.

Dobzhansky, T. (1946). "Genetics of Natural Populations. Xiii. Recombination and Variability in Populations of Drosophila Pseudoobscura." Genetics 31(3): 269-290.
Dolle, J. M., J. R. Daling, E. White, L. A. Brinton, D. R. Doody, P. L. Porter and K. E. Malone (2009). "Risk factors for triple-negative breast cancer in women under the age of 45 years." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 18(4): 1157-1166.

Donawho, C. K., Y. Luo, T. D. Penning, J. L. Bauch, J. J. Bouska, V. D. Bontcheva-Diaz, B. F. Cox, T. L. DeWeese, L. E. Dillehay, D. C. Ferguson, N. S. Ghoreishi-Haack, D. R. Grimm, R. Guan, E. K. Han, R. R. Holley-Shanks, B. Hristov, K. B. Idler, K. Jarvis, E. F. Johnson, L. R. Kleinberg, V. Klinghofer, L. M. Lasko, X. Liu, K. C. Marsh, T. P. McGonigal, J. A. Meulbroek, A. M. Olson, J. P. Palma, L. E. Rodriguez, Y. Shi, J. A. Stavropoulos, A. C. Tsurutani, G. D. Zhu, S. H. Rosenberg, V. L. Giranda and D. J. Frost (2007). "ABT-888, an orally active poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor that potentiates DNA-damaging agents in preclinical tumor models." Clin Cancer Res 13(9): 2728-2737.

Drew, Y., E. A. Mulligan, W. T. Vong, H. D. Thomas, S. Kahn, S. Kyle, A. Mukhopadhyay, G. Los, Z. Hostomsky, E. R. Plummer, R. J. Edmondson and N. J. Curtin (2011). "Therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor AG014699 in human cancers with mutated or methylated BRCA1 or BRCA2." J Natl Cancer Inst 103(4): 334-346.
e.V, D. K. e. V. u. D. K. (2012). "Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms."

Efimova, E. V., H. J. Mauceri, D. W. Golden, E. Labay, V. P. Bindokas, T. E. Darga, C. Chakraborty, J. C. Barreto-Andrade, C. Crawley, H. G. Sutton, S. J. Kron and R. R. Weichselbaum (2010). "Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor induces accelerated senescence in irradiated breast cancer cells and tumors." Cancer Res 70(15): 6277-6282.

Esteller, M., J. M. Silva, G. Dominguez, F. Bonilla, X. Matias-Guiu, E. Lerma, E. Bussaglia, J. Prat, I. C. Harkes, E. A. Repasky, E. Gabrielson, M. Schutte, S. B. Baylin and J. G. Herman (2000). "Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors." J Natl Cancer Inst 92(7): 564-569.

Evans, D. G., F. Lalloo, A. Cramer, E. A. Jones, F. Knox, E. Amir and A. Howell (2009). "Addition of pathology and biomarker information significantly improves the performance of the Manchester scoring system for BRCA1 and BRCA2 testing." J Med Genet 46(12): 811-817.

Fan, S., J. Wang, R. Yuan, Y. Ma, Q. Meng, M. R. Erdos, R. G. Pestell, F. Yuan, K. J. Auborn, I. D. Goldberg and E. M. Rosen (1999). "BRCA1 inhibition of estrogen receptor signaling in transfected cells." Science 284(5418): 1354-1356.

Farmer, H., N. McCabe, C. J. Lord, A. N. Tutt, D. A. Johnson, T. B. Richardson, M. Santarosa, K. J. Dillon, I. Hickson, C. Knights, N. M. Martin, S. P. Jackson, G. C. Smith and A. Ashworth (2005). "Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy." Nature 434(7035): 917-921.

Ferla, R., V. Calò, S. Cascio, G. Rinaldi, G. Badalamenti, I. Carreca, E. Surmacz, G. Colucci, V. Bazan and A. Russo (2007). "Founder mutations in BRCA1 and BRCA2 genes." Ann Oncol 18 Suppl 6: vi93-98.
Fleming, M. A., J. D. Potter, C. J. Ramirez, G. K. Ostrander and E. A. Ostrander (2003). "Understanding missense mutations in the BRCA1 gene: an evolutionary approach." Proc Natl Acad Sci U S A 100(3): 1151-1156.

Fong, P. C., D. S. Boss, T. A. Yap, A. Tutt, P. Wu, M. Mergui-Roelvink, P. Mortimer, H. Swaisland, A. Lau, M. J. O'Connor, A. Ashworth, J. Carmichael, S. B. Kaye, J. H. Schellens and J. S. de Bono (2009). "Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers." N Engl J Med 361(2): 123-134.

Ford, D., D. F. Easton, M. Stratton, S. Narod, D. Goldgar, P. Devilee, D. T. Bishop, B. Weber, G. Lenoir, J. Chang-Claude, H. Sobol, M. D. Teare, J. Struewing, A. Arason, S. Scherneck, J. Peto, T. R. Rebbeck, P. Tonin, S. Neuhausen, R. Barkardottir, J. Eyfjord, H. Lynch, B. A. Ponder, S. A. Gayther and M. Zelada-Hedman (1998). "Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium." Am J Hum Genet 62(3): 676-689.

Fostira, F., M. Tsitlaidou, C. Papadimitriou, M. Pertesi, E. Timotheadou, A. V. Stavropoulou, S. Glentis, E. Bournakis, M. Bobos, D. Pectasides, P. Papakostas, G. Pentheroudakis, H. Gogas, P. Skarlos, E. Samantas, D. Bafaloukos, P. A. Kosmidis, A. Koutras, D. Yannoukakos, I. Konstantopoulou and G. Fountzilas (2012). "Prevalence of BRCA1 mutations among 403 women with triple-negative breast cancer: implications for genetic screening selection criteria: a Hellenic Cooperative Oncology Group Study." Breast Cancer Res Treat.

Foulkes, W. D., J. S. Brunet, I. M. Stefansson, O. Straume, P. O. Chappuis, L. R. Bégin, N. Hamel, J. R. Goffin, N. Wong, M. Trudel, L. Kapusta, P. Porter and L. A. Akslen (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(3): 830-835.

Foulkes, W. D., K. Metcalfe, W. Hanna, H. T. Lynch, P. Ghadirian, N. Tung, O. Olopade, B. Weber, J. McLennan, I. A. Olivotto, P. Sun, P. O. Chappuis, L. R. Bégin, J. S. Brunet and S. A. Narod (2003). "Disruption of the expected positive correlation between breast tumor size and lymph node status in BRCA1-related breast carcinoma." Cancer 98(8): 1569-1577.

Foulkes, W. D., K. Metcalfe, P. Sun, W. M. Hanna, H. T. Lynch, P. Ghadirian, N. Tung, O. I. Olopade, B. L. Weber, J. McLennan, I. A. Olivotto, L. R. Bégin and S. A. Narod (2004). "Estrogen receptor status in BRCA1- and BRCA2-related breast cancer: the influence of age, grade, and histological type." Clin Cancer Res 10(6): 2029-2034.

Foulkes, W. D., I. M. Stefansson, P. O. Chappuis, L. R. Bégin, J. R. Goffin, N. Wong, M. Trudel and L. A. Akslen (2003). "Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer." J Natl Cancer Inst 95(19): 1482-1485.

Frasci, G., P. Comella, M. Rinaldo, G. Iodice, M. Di Bonito, M. D'Aiuto, A. Petrillo, S. Lastoria, C. Siani, G. Comella and G. D'Aiuto (2009). "Preoperative weekly cisplatin-epirubicin-paclitaxel with G-CSF support in triple-negative large operable breast cancer." Ann Oncol 20(7): 1185-1192.

Fridlyand, J., A. M. Snijders, B. Ylstra, H. Li, A. Olshen, R. Segraves, S. Dairkee, T. Tokuyasu, B. M. Ljung, A. N. Jain, J. McLennan, J. Ziegler, K. Chin, S. Devries, H. Feiler, J. W. Gray, F. Waldman, D. Pinkel and D. G. Albertson (2006). "Breast tumor copy number aberration phenotypes and genomic instability." BMC Cancer 6: 96.

Fulford, L. G., D. F. Easton, J. S. Reis-Filho, A. Sofronis, C. E. Gillett, S. R. Lakhani and A. Hanby (2006). "Specific morphological features predictive for the basal phenotype in grade 3 invasive ductal carcinoma of breast." Histopathology 49(1): 22-34.

Futreal, P. A., Q. Liu, D. Shattuck-Eidens, C. Cochran, K. Harshman, S. Tavtigian, L. M. Bennett, A. Haugen-Strano, J. Swensen and Y. Miki (1994). "BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas." Science 266(5182): 120-122.

Gebski, V., M. Lagleva, A. Keech, J. Simes and A. O. Langlands (2006). "Survival effects of postmastectomy adjuvant radiation therapy using biologically equivalent doses: a clinical perspective." J Natl Cancer Inst 98(1): 26-38.

Gelmon, K. A., M. Tischkowitz, H. Mackay, K. Swenerton, A. Robidoux, K. Tonkin, H. Hirte, D. Huntsman, M. Clemons, B. Gilks, R. Yerushalmi, E. Macpherson, J. Carmichael and A. Oza (2011). "Olaparib in patients with recurrent high-grade serous or poorly differentiated ovarian carcinoma or triple-negative breast cancer: a phase 2, multicentre, open-label, non-randomised study." Lancet Oncol 12(9): 852-861.

Gluz, O., C. Liedtke, N. Gottschalk, L. Pusztai, U. Nitz and N. Harbeck (2009). "Triple-negative breast cancer--current status and future directions." Ann Oncol 20(12): 1913-1927.

Gonzalez-Angulo, A. M., K. M. Timms, S. Liu, H. Chen, J. K. Litton, J. Potter, J. S. Lanchbury, K. Stemke-Hale, B. T. Hennessy, B. K. Arun, G. N. Hortobagyi, K. A. Do, G. B. Mills and F. Meric-Bernstam (2011). "Incidence and outcome of BRCA mutations in unselected patients with triple receptor-negative breast cancer." Clin Cancer Res 17(5): 1082-1089.

Gorski, J. J., R. D. Kennedy, A. M. Hosey and D. P. Harkin (2009). "The complex relationship between BRCA1 and ERalpha in hereditary breast cancer." Clin Cancer Res 15(5): 1514-1518.
Haffty, B. G., Q. Yang, M. Reiss, T. Kearney, S. A. Higgins, J. Weidhaas, L. Harris, W. Hait and D. Toppmeyer (2006). "Locoregional relapse and distant metastasis in conservatively managed triple negative early-stage breast cancer." J Clin Oncol 24(36): 5652-5657.

Hartman, A. R., R. R. Kaldate, L. M. Sailer, L. Painter, C. E. Grier, R. R. Endsley, M. Griffin, S. A. Hamilton, C. A. Frye, M. A. Silberman, R. J. Wenstrup and J. F. Sandbach (2012). "Prevalence of BRCA mutations in an unselected population of triple-negative breast cancer." Cancer 118(11): 2787-2795.

Hayes, F., C. Cayanan, D. Barillà and A. N. Monteiro (2000). "Functional assay for BRCA1: mutagenesis of the COOH-terminal region reveals critical residues for transcription activation." Cancer Res 60(9): 2411-2418.

Heitz, F., P. Harter, H. J. Lueck, A. Fissler-Eckhoff, F. Lorenz-Salehi, S. Scheil-Bertram, A. Traut and A. du Bois (2009). "Triple-negative and HER2-overexpressing breast cancers exhibit an elevated risk and an earlier occurrence of cerebral metastases." Eur J Cancer 45(16): 2792-2798.

Helleday, T., H. E. Bryant and N. Schultz (2005). "Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) in homologous recombination and as a target for cancer therapy." Cell Cycle 4(9): 1176-1178.

Hernandez-Aya, L. F., M. Chavez-Macgregor, X. Lei, F. Meric-Bernstam, T. A. Buchholz, L. Hsu, A. A. Sahin, K. A. Do, V. Valero, G. N. Hortobagyi and A. M. Gonzalez-Angulo (2011). "Nodal status and clinical outcomes in a large cohort of patients with triple-negative breast cancer." J Clin Oncol 29(19): 2628-2634.

Herschkowitz, J. I., K. Simin, V. J. Weigman, I. Mikaelian, J. Usary, Z. Hu, K. E. Rasmussen, L. P. Jones, S. Assefnia, S. Chandrasekharan, M. G. Backlund, Y. Yin, A. I. Khramtsov, R. Bastein, J. Quackenbush, R. I. Glazer, P. H. Brown, J. E. Green, L. Kopelovich, P. A. Furth, J. P. Palazzo, O. I. Olopade, P. S. Bernard, G. A. Churchill, T. Van Dyke and C. M. Perou (2007). "Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors." Genome Biol 8(5): R76.

Hiller, D. J. and Q. D. Chu (2012). "Current Status of Poly(ADP-ribose) Polymerase Inhibitors as Novel Therapeutic Agents for Triple-Negative Breast Cancer." Int J Breast Cancer 2012: 829315.

Hoeijmakers, J. H. (2001). "Genome maintenance mechanisms for preventing cancer." Nature 411(6835): 366-374.

Honrado, E., J. Benítez and J. Palacios (2006). "Histopathology of BRCA1- and BRCA2-associated breast cancer." Crit Rev Oncol Hematol 59(1): 27-39.

Horak, C. E., L. Pusztai, G. Xing, O. C. Trifan, C. Saura, L. M. Tseng, S. Chan, R. Welcher and D. Liu (2013). "Biomarker analysis of neoadjuvant doxorubicin/cyclophosphamide followed by ixabepilone or Paclitaxel in early-stage breast cancer." Clin Cancer Res 19(6): 1587-1595.

Hu, X., H. M. Stern, L. Ge, C. O'Brien, L. Haydu, C. D. Honchell, P. M. Haverty, B. A. Peters, T. D. Wu, L. C. Amler, J. Chant, D. Stokoe, M. R. Lackner and G. Cavet (2009). "Genetic alterations and oncogenic pathways associated with breast cancer subtypes." Mol Cancer Res 7(4): 511-522.

Institute, N. H. G. R. (2013). Breast Cancer Information Core. http://research.nhgri.nih.gov/bic/.

J. O'Shaughnessy, L. S. S., M. A. Danso, H. S. Rugo, K. Miller, D. A. Yardley, R. W. Carlson, R. S. Finn, E. Charpentier, M. Freese, S. Gupta, A. Blackwood-Chirchir and E. P. Winer (2011). "A randomized phase III study of iniparib (BSI-201) in combination with gemcitabine/carboplatin (G/C) in metastatic triple-negative breast cancer (TNBC)." J Clin Oncol (Meeting Abstracts)May 2011 vol. 29 no. 15_suppl1007.

Jenssen, T. K., W. P. Kuo, T. Stokke and E. Hovig (2002). "Associations between gene expressions in breast cancer and patient survival." Hum Genet 111(4-5): 411-420.

Jones, C., A. V. Nonni, L. Fulford, S. Merrett, R. Chaggar, V. Eusebi and S. R. Lakhani (2001). "CGH analysis of ductal carcinoma of the breast with basaloid/myoepithelial cell differentiation." Br J Cancer 85(3): 422-427.

Kelland, L. (2007). "The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy." Nat Rev Cancer 7(8): 573-584.

Kennedy, R. D., J. E. Quinn, P. B. Mullan, P. G. Johnston and D. P. Harkin (2004). "The role of BRCA1 in the cellular response to chemotherapy." J Natl Cancer Inst 96(22): 1659-1668.
Kiechle, P. D. m. M. (2007). Gynäkologie und Geburtshilfe. München, Elsevier GmbH, Urban und Fischer Verlag.

Knudson, A. G. (1971). "Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma." Proc Natl Acad Sci U S A 68(4): 820-823.

Kwei, K. A., Y. Kung, K. Salari, I. N. Holcomb and J. R. Pollack (2010). "Genomic instability in breast cancer: pathogenesis and clinical implications." Mol Oncol 4(3): 255-266.

Kwon, J. S., A. M. Gutierrez-Barrera, D. Young, C. C. Sun, M. S. Daniels, K. H. Lu and B. Arun (2010). "Expanding the criteria for BRCA mutation testing in breast cancer survivors." J Clin Oncol 28(27): 4214-4220.

Lafarge, S., V. Sylvain, M. Ferrara and Y. J. Bignon (2001). "Inhibition of BRCA1 leads to increased chemoresistance to microtubule-interfering agents, an effect that involves the JNK pathway." Oncogene 20(45): 6597-6606.

Lakhani, S. R., J. S. Reis-Filho, L. Fulford, F. Penault-Llorca, M. van der Vijver, S. Parry, T. Bishop, J. Benitez, C. Rivas, Y. J. Bignon, J. Chang-Claude, U. Hamann, C. J. Cornelisse, P. Devilee, M. W. Beckmann, C. Nestle-Krämling, P. A. Daly, N. Haites, J. Varley, F. Lalloo, G. Evans, C. Maugard, H. Meijers-Heijboer, J. G. Klijn, E. Olah, B. A. Gusterson, S. Pilotti, P. Radice, S. Scherneck, H. Sobol, J. Jacquemier, T. Wagner, J. Peto, M. R. Stratton, L. McGuffog, D. F. Easton and B. C. L. Consortium (2005). "Prediction of BRCA1 status in patients with breast cancer using estrogen receptor and basal phenotype." Clin Cancer Res 11(14): 5175-5180.

Lambie, H., A. Miremadi, S. E. Pinder, J. A. Bell, P. Wencyk, E. C. Paish, R. D. Macmillan and I. O. Ellis (2003). "Prognostic significance of BRCA1 expression in sporadic breast carcinomas." J Pathol 200(2): 207-213.
Laurence Simon, C. B., Jean-Francois Rodier, Delphine Weitbruch, Michel Velten, Marc Wilt, Jean-Pierre Ghnassia and Thierry Petit (2012). "Is docetaxel (D) less efficient than anthracycline-based chemotherapy (A) in triple-negative breast cancer (TNBC) treated in neoadjuvant setting?" J Clin Oncol (Meeting Abstracts)May 2012 vol. 30 no. 15_supple1154.

Lee, L. J., B. Alexander, S. J. Schnitt, A. Comander, B. Gallagher, J. E. Garber and N. Tung (2011). "Clinical outcome of triple negative breast cancer in BRCA1 mutation carriers and noncarriers." Cancer 117(14): 3093-3100.

Lidereau, R., F. Eisinger, M. H. Champème, C. Noguès, I. Bièche, D. Birnbaum, C. Pallud, J. Jacquemier and H. Sobol (2000). "Major improvement in the efficacy of BRCA1 mutation screening using morphoclinical features of breast cancer." Cancer Res 60(5): 1206-1210.

Liedtke, C., C. Mazouni, K. R. Hess, F. André, A. Tordai, J. A. Mejia, W. F. Symmans, A. M. Gonzalez-Angulo, B. Hennessy, M. Green, M. Cristofanilli, G. N. Hortobagyi and L. Pusztai (2008). "Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer." J Clin Oncol 26(8): 1275-1281.

Lippman, M. E., J. C. Allegra, E. B. Thompson, R. Simon, A. Barlock, L. Green, K. K. Huff, H. M. Do, S. C. Aitken and R. Warren (1978). "The relation between estrogen receptors and response rate to cytotoxic chemotherapy in metastatic breast cancer." N Engl J Med 298(22): 1223-1228.

Lips, E. H., L. Mulder, J. Hannemann, N. Laddach, M. T. Vrancken Peeters, M. J. van de Vijver, J. Wesseling, P. M. Nederlof and S. Rodenhuis (2011). "Indicators of homologous recombination deficiency in breast cancer and association with response to neoadjuvant chemotherapy." Ann Oncol 22(4): 870-876.

Liu, S., C. Ginestier, E. Charafe-Jauffret, H. Foco, C. G. Kleer, S. D. Merajver, G. Dontu and M. S. Wicha (2008). "BRCA1 regulates human mammary stem/progenitor cell fate." Proc Natl Acad Sci U S A 105(5): 1680-1685.

Livasy, C. A., G. Karaca, R. Nanda, M. S. Tretiakova, O. I. Olopade, D. T. Moore and C. M. Perou (2006). "Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma." Mod Pathol 19(2): 264-271.

M. J. Kandel, Z. S., S. Masciari, L. Collins, S. Schnitt, L. Harris, A. Miron, A. Richardson and J. E. Garber (2006). "Prevalence of BRCA1 mutations in triple negative breast cancer (BC)." Journal of Clinical Oncology, 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition).Vol 24, No 18S (June 20 Supplement), 2006: 508© 2006 American Society of Clinical Oncology.

Maiti, B., M. N. Kundranda, T. P. Spiro and H. A. Daw (2010). "The association of metabolic syndrome with triple-negative breast cancer." Breast Cancer Res Treat 121(2): 479-483.
Marginean, F., E. A. Rakha, B. C. Ho, I. O. Ellis and A. H. Lee (2010). "Histological features of medullary carcinoma and prognosis in triple-negative basal-like carcinomas of the breast." Mod Pathol 23(10): 1357-1363.

Maura B. Cotter, A. P., Patricia M. McGowan, Louise Flanagan, Cecily Quinn, Denis Evoy, John Crown, Enda McDermott and Michael J. Duffy (2012). Preclinical evaluation of PARP inhibition in breast cancer: Comparative effectiveness of olaparib and iniparib. J Clin Oncol (Meeting Abstracts)May 2012 vol. 30 no. 15_suppl1042.
Meindl, A. and G. C. f. H. B. a. O. 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(4): 472-480.

Meindl, A. and G. C. f. H. B. a. O. 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(4): 472-480.

Meindl, A., N. Ditsch, K. Kast, K. Rhiem and R. K. Schmutzler (4/2011). Familiäres Mamma- und Ovarialkarzinom: Neue Gene, neue Therapien, neue Konzepte. 26.
Mersin, H., E. Yildirim, U. Berberoglu and K. Gülben (2008). "The prognostic importance of triple negative breast carcinoma." Breast 17(4): 341-346.

Miki, Y., J. Swensen, D. Shattuck-Eidens, P. A. Futreal, K. Harshman, S. Tavtigian, Q. Liu, C. Cochran, L. M. Bennett and W. Ding (1994). "A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1." Science 266(5182): 66-71.

Miller, K., M. Wang, J. Gralow, M. Dickler, M. Cobleigh, E. A. Perez, T. Shenkier, D. Cella and N. E. Davidson (2007). "Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer." N Engl J Med 357(26): 2666-2676.

Millikan, R. C., B. Newman, C. K. Tse, P. G. Moorman, K. Conway, L. G. Dressler, L. V. Smith, M. H. Labbok, J. Geradts, J. T. Bensen, S. Jackson, S. Nyante, C. Livasy, L. Carey, H. S. Earp and C. M. Perou (2008). "Epidemiology of basal-like breast cancer." Breast Cancer Res Treat 109(1): 123-139.

Mullis, K. B. (1994). The polymerase chain reaction. Boston, Basel and B. Birkhäuser.
Mühlhardt, C. (2009). Der Experimentator Molekularbiologie/ Genomics. Basel, Spektrum Akademischer Verlag.

Netweork, N. C. C. (2011). NCCN Guidelines for Detection, Prevention, & Risk Reduction. http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp#detection.

Nielsen, T. O., F. D. Hsu, K. Jensen, M. Cheang, G. Karaca, Z. Hu, T. Hernandez-Boussard, C. Livasy, D. Cowan, L. Dressler, L. A. Akslen, J. Ragaz, A. M. Gown, C. B. Gilks, M. van de Rijn and C. M. Perou (2004). "Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma." Clin Cancer Res 10(16): 5367-5374.

Nofech-Mozes, S., M. Trudeau, H. K. Kahn, R. Dent, E. Rawlinson, P. Sun, S. A. Narod and W. M. Hanna (2009). "Patterns of recurrence in the basal and non-basal subtypes of triple-negative breast cancers." Breast Cancer Res Treat 118(1): 131-137.

O'Shaughnessy, J., C. Osborne, J. E. Pippen, M. Yoffe, D. Patt, C. Rocha, I. C. Koo, B. M. Sherman and C. Bradley (2011). "Iniparib plus chemotherapy in metastatic triple-negative breast cancer." N Engl J Med 364(3): 205-214.

O'Shaughnessy, J., C. Osborne, J. E. Pippen, M. Yoffe, D. Patt, C. Rocha, I. C. Koo, B. M. Sherman and C. Bradley (2011). "Iniparib plus chemotherapy in metastatic triple-negative breast cancer." N Engl J Med 364(3): 205-214.
O'Shaughnessy, J. A. (2012). "Breast cancer in focus: treatment options for triple-negative metastatic breast cancer." Clin Adv Hematol Oncol 10(1): 43-45.
Pandolfi, P. P. (2004). "Breast cancer--loss of PTEN predicts resistance to treatment." N Engl J Med 351(22): 2337-2338.

Oonk AM, van RC, Smits MM, Mulder L, Laddach N, Savola SP et al.: Clinical correlates of 'BRCAness' in triple-negative breast cancer of patients receiving adjuvant chemotherapy. Ann Oncol 2012.

Perou, C. M., T. Sørlie, M. B. Eisen, M. van de Rijn, S. S. Jeffrey, C. A. Rees, J. R. Pollack, D. T. Ross, H. Johnsen, L. A. Akslen, O. Fluge, A. Pergamenschikov, C. Williams, S. X. Zhu, P. E. Lønning, A. L. Børresen-Dale, P. O. Brown and D. Botstein (2000). "Molecular portraits of human breast tumours." Nature 406(6797): 747-752.

Potemski, P., R. Kusinska, C. Watala, E. Pluciennik, A. K. Bednarek and R. Kordek (2005). "Prognostic relevance of basal cytokeratin expression in operable breast cancer." Oncology 69(6): 478-485.

R. Kreienberg, I. K., U. Albert, H. H. Bartsch, M.W. Beckmann, D. Berg, U. Bick, A. du Bois, W. Budach, J. Dunst, J. Engel, B. Ernst, M. Geraedts, U. Henscher, D. Hölzel, C. Jackisch, K. König, H. Kreipe, T. Kühn, A. Lebeau, S. Leinung, H. Link, H.-J. Lück, H. Madjar, A. Maiwald, G. Maiwald, N. Marschner, M. Marx, G. von Minckwitz, I. Naß-Griegoleit, K. Possinger, A. Reiter, W. Sauerbrei, W. Schlake, R. Schmutzler, I. Schreer, H. Schulte, K.-D. Schulz †, R. Souchon, C. Thomssen, M. Untch, U. Wagner, J. Weis, T. Zemmler (2008). Interdisziplinäre S3-Leitlinien für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinom. D. u. DKG. Berlin, ISTO, Deutsche Krebsgesellschaft e.V.
Rajan, J. V., M. Wang, S. T. Marquis and L. A. Chodosh (1996). "Brca2 is coordinately regulated with Brca1 during proliferation and differentiation in mammary epithelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A 93(23): 13078-13083.

Rakha, E. A., M. E. El-Sayed, A. R. Green, A. H. Lee, J. F. Robertson and I. O. Ellis (2007). "Prognostic markers in triple-negative breast cancer." Cancer 109(1): 25-32.

Rakha, E. A., T. C. Putti, D. M. Abd El-Rehim, C. Paish, A. R. Green, D. G. Powe, A. H. Lee, J. F. Robertson and I. O. Ellis (2006). "Morphological and immunophenotypic analysis of breast carcinomas with basal and myoepithelial differentiation." J Pathol 208(4): 495-506.

Rakha, E. A., D. S. Tan, W. D. Foulkes, I. O. Ellis, A. Tutt, T. O. Nielsen and J. S. Reis-Filho (2007). "Are triple-negative tumours and basal-like breast cancer synonymous?" Breast Cancer Res 9(6): 404; author reply 405.

Reis-Filho, J. S., F. Milanezi, D. Steele, K. Savage, P. T. Simpson, J. M. Nesland, E. M. Pereira, S. R. Lakhani and F. C. Schmitt (2006). "Metaplastic breast carcinomas are basal-like tumours." Histopathology 49(1): 10-21.

Reis-Filho, J. S. and A. N. Tutt (2008). "Triple negative tumours: a critical review." Histopathology 52(1): 108-118.

Rhee, J., S. W. Han, D. Y. Oh, J. H. Kim, S. A. Im, W. Han, I. A. Park, D. Y. Noh, Y. J. Bang and T. Y. Kim (2008). "The clinicopathologic characteristics and prognostic significance of triple-negativity in node-negative breast cancer." BMC Cancer 8: 307.

Rhiem, K., U. Todt, B. Wappenschmidt, A. Klein, E. Wardelmann and R. K. Schmutzler (2010). "Sporadic breast carcinomas with somatic BRCA1 gene deletions share genotype/phenotype features with familial breast carcinomas." Anticancer Res 30(9): 3445-3449.

Richardson, A. L., Z. C. Wang, A. De Nicolo, X. Lu, M. Brown, A. Miron, X. Liao, J. D. Iglehart, D. M. Livingston and S. Ganesan (2006). "X chromosomal abnormalities in basal-like human breast cancer." Cancer Cell 9(2): 121-132.

Robert-Koch-Institut. (2011). "Krebs in Deutschland."13.3

Robertson, L., H. Hanson, S. Seal, M. Warren-Perry, D. Hughes, I. Howell, C. Turnbull, R. Houlston, S. Shanley, S. Butler, D. G. Evans, G. Ross, D. Eccles, A. Tutt and N. Rahman (2012). "BRCA1 testing should be offered to individuals with triple-negative breast cancer diagnosed below 50 years." Br J Cancer 106(6): 1234-1238.

Rodriguez, A. A., A. Makris, M. F. Wu, M. Rimawi, A. Froehlich, B. Dave, S. G. Hilsenbeck, G. C. Chamness, M. T. Lewis, L. E. Dobrolecki, D. Jain, S. Sahoo, C. K. Osborne and J. C. Chang (2010). "DNA repair signature is associated with anthracycline response in triple negative breast cancer patients." Breast Cancer Res Treat 123(1): 189-196.

Rottenberg, S., J. E. Jaspers, A. Kersbergen, E. van der Burg, A. O. Nygren, S. A. Zander, P. W. Derksen, M. de Bruin, J. Zevenhoven, A. Lau, R. Boulter, A. Cranston, M. J. O'Connor, N. M. Martin, P. Borst and J. Jonkers (2008). "High sensitivity of BRCA1-deficient mammary tumors to the PARP inhibitor AZD2281 alone and in combination with platinum drugs." Proc Natl Acad Sci U S A 105(44): 17079-17084.

Rouzier, R., C. M. Perou, W. F. Symmans, N. Ibrahim, M. Cristofanilli, K. Anderson, K. R. Hess, J. Stec, M. Ayers, P. Wagner, P. Morandi, C. Fan, I. Rabiul, J. S. Ross, G. N. Hortobagyi and L. Pusztai (2005). "Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy." Clin Cancer Res 11(16): 5678-5685.

Saal, L. H., P. Johansson, K. Holm, S. K. Gruvberger-Saal, Q. B. She, M. Maurer, S. Koujak, A. A. Ferrando, P. Malmström, L. Memeo, J. Isola, P. O. Bendahl, N. Rosen, H. Hibshoosh, M. Ringnér, A. Borg and R. Parsons (2007). "Poor prognosis in carcinoma is associated with a gene expression signature of aberrant PTEN tumor suppressor pathway activity." Proc Natl Acad Sci U S A 104(18): 7564-7569.

Saleh-Gohari, N., H. E. Bryant, N. Schultz, K. M. Parker, T. N. Cassel and T. Helleday (2005). "Spontaneous homologous recombination is induced by collapsed replication forks that are caused by endogenous DNA single-strand breaks." Mol Cell Biol 25(16): 7158-7169.

Sandhu, S. K., W. R. Schelman, G. Wilding, V. Moreno, R. D. Baird, S. Miranda, L. Hylands, R. Riisnaes, M. Forster, A. Omlin, N. Kreischer, K. Thway, H. Gevensleben, L. Sun, J. Loughney, M. Chatterjee, C. Toniatti, C.

L. Carpenter, R. Iannone, S. B. Kaye, J. S. de Bono and R. M. Wenham (2013). "The poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor niraparib (MK4827) in BRCA mutation carriers and patients with sporadic cancer: a phase 1 dose-escalation trial." Lancet Oncol 14(9): 882-892.

Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1992). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977." Biotechnology 24: 104-108.
Santana-Davila, R. and E. A. Perez (2010). "Treatment options for patients with triple-negative breast cancer." J Hematol Oncol 3: 42.

Santarosa, M. and R. Maestro (2012). "BRACking news on triple-negative/basal-like breast cancers: how BRCA1 deficiency may result in the development of a selective tumor subtype." Cancer Metastasis Rev 31(1-2): 131-142.

Sarrió, D., S. M. Rodriguez-Pinilla, D. Hardisson, A. Cano, G. Moreno-Bueno and J. Palacios (2008). "Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype." Cancer Res 68(4): 989-997.

Schwarzer, S. (2000). "*DHPLC spürt DNA-Mutationen auf*." Laborpraxis 10: 28-31.
Science, R. A. (2011). Light Cycler 480 Application notes. http://www.roche-applied-science.com/shop/products/lightcycler-480-system-performance-data.

Shafiq, J., G. Delaney and M. B. Barton (2007). "An evidence-based estimation of local control and survival benefit of radiotherapy for breast cancer." Radiother Oncol 84(1): 11-17.

Silver, D. P., A. L. Richardson, A. C. Eklund, Z. C. Wang, Z. Szallasi, Q. Li, N. Juul, C. O. Leong, D. Calogrias, A. Buraimoh, A. Fatima, R. S. Gelman, P. D. Ryan, N. M. Tung, A. De Nicolo, S. Ganesan, A. Miron, C. Colin, D. C. Sgroi, L. W. Ellisen, E. P. Winer and J. E. Garber (2010). "Efficacy of neoadjuvant Cisplatin in triple-negative breast cancer." J Clin Oncol 28(7): 1145-1153.

Sirohi, B., M. Arnedos, S. Popat, S. Ashley, A. Nerurkar, G. Walsh, S. Johnston and I. E. Smith (2008). "Platinum-based chemotherapy in triple-negative breast cancer." Ann Oncol 19(11): 1847-1852.

Smid, M., Y. Wang, Y. Zhang, A. M. Sieuwerts, J. Yu, J. G. Klijn, J. A. Foekens and J. W. Martens (2008). "Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse." Cancer Res 68(9): 3108-3114.

Smith, T. M., M. K. Lee, C. I. Szabo, N. Jerome, M. McEuen, M. Taylor, L. Hood and M. C. King (1996). "Complete genomic sequence and analysis of 117 kb of human DNA containing the gene BRCA1." Genome Res 6(11): 1029-1049.

Sorlie, T., R. Tibshirani, J. Parker, T. Hastie, J. S. Marron, A. Nobel, S. Deng, H. Johnsen, R. Pesich, S. Geisler, J. Demeter, C. M. Perou, P. E. Lønning, P. O. Brown, A. L. Børresen-Dale and D. Botstein (2003). "Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets." Proc Natl Acad Sci U S A 100(14): 8418-8423.

Stefansson, O. A., J. G. Jonasson, O. T. Johannsson, K. Olafsdottir, M. Steinarsdottir, S. Valgeirsdottir and J. E. Eyfjord (2009). "Genomic profiling of breast tumours in relation to BRCA abnormalities and phenotypes." Breast Cancer Res 11(4): R47.

Szabo, C. I., T. Worley and A. N. Monteiro (2004). "Understanding germ-line mutations in BRCA1." Cancer Biol Ther 3(6): 515-520.

Sørlie, T., C. M. Perou, R. Tibshirani, T. Aas, S. Geisler, H. Johnsen, T. Hastie, M. B. Eisen, M. van de Rijn, S. S. Jeffrey, T. Thorsen, H. Quist, J. C. Matese, P. O. Brown, D. Botstein, P. Eystein Lønning and A. L. Børresen-Dale (2001). "Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications." Proc Natl Acad Sci U S A 98(19): 10869-10874.

Torrisi, R., A. Balduzzi, R. Ghisini, A. Rocca, L. Bottiglieri, F. Giovanardi, P. Veronesi, A. Luini, L. Orlando, G. Viale, A. Goldhirsch and M. Colleoni (2008). "Tailored preoperative treatment of locally advanced triple negative (hormone receptor negative and HER2 negative) breast cancer with epirubicin, cisplatin, and infusional fluorouracil followed by weekly paclitaxel." Cancer Chemother Pharmacol 62(4): 667-672.

Turner, N., A. Tutt and A. Ashworth (2004). "Hallmarks of 'BRCAness' in sporadic cancers." Nat Rev Cancer 4(10): 814-819.

Turner, N. C., J. S. Reis-Filho, A. M. Russell, R. J. Springall, K. Ryder, D. Steele, K. Savage, C. E. Gillett, F. C. Schmitt, A. Ashworth and A. N. Tutt (2007). "BRCA1 dysfunction in sporadic basal-like breast cancer." Oncogene 26(14): 2126-2132.

Tutt, A., M. Robson, J. E. Garber, S. M. Domchek, M. W. Audeh, J. N. Weitzel, M. Friedlander, B. Arun, N. Loman, R. K. Schmutzler, A. Wardley, G. Mitchell, H. Earl, M. Wickens and J. Carmichael (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(9737): 235-244.

van der Groep, P., E. van der Wall and P. J. van Diest (2011). "Pathology of hereditary breast cancer." Cell Oncol (Dordr) 34(2): 71-88.

van der Stoep, N., C. D. van Paridon, T. Janssens, P. Krenkova, A. Stambergova, M. Macek, G. Matthijs and E. Bakker (2009). "Diagnostic guidelines for high-resolution melting curve (HRM) analysis: an interlaboratory validation of BRCA1 mutation scanning using the 96-well LightScanner." Hum Mutat 30(6): 899-909.

Veeck, J., S. Ropero, F. Setien, E. Gonzalez-Suarez, A. Osorio, J. Benitez, J. G. Herman and M. Esteller (2010). "BRCA1 CpG island hypermethylation predicts sensitivity to poly(adenosine diphosphate)-ribose polymerase inhibitors." J Clin Oncol 28(29): e563-564; author reply e565-566.

Vollebergh MA, Lips EH, Nederlof PM, Wessels LF, Schmidt MK, van Beers EH *et al*.: An aCGH classifier derived from BRCA1-mutated breast cancer and benefit of high-dose platinum-based chemotherapy in HER2-negative breast cancer patients. *Ann Oncol* 2010.

Vollebergh MA, Jonkers J, Linn SC: Genomic instability in breast and ovarian cancers: translation into clinical predictive biomarkers. Cell Mol Life Sci 2012, 69: 223-245

von Minckwitz, G., B. M. Müller, S. Loibl, J. Budczies, C. Hanusch, S. Darb-Esfahani, J. Hilfrich, E. Weiss, J. Huober, J. U. Blohmer, A. du Bois, D. M. Zahm, F. Khandan, G. Hoffmann, B. Gerber, H. Eidtmann, F. Fend, M. Dietel, K. Mehta and C. Denkert (2011). "Cytoplasmic poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase expression is predictive and prognostic in patients with breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy." J Clin Oncol 29(16): 2150-2157.

W. R. Schelman, S. K. S., V. Moreno Garcia, G. Wilding, L. Sun,C. Toniatti, M. Stroh, N. Kreischer, C. L. Carpenter, L. R. Molife, S. B. Kaye,J. S. De Bono, and R. M. Wenham "First-in-human trial of a poly(ADP)-ribose polymerase (PARP) inhibitor MK-4827 in advanced cancer patients with antitumor activity in BRCA-deficient tumors and sporadic ovarian cancers (soc)."

Wang, F., Q. Fang, Z. Ge, N. Yu, S. Xu and X. Fan (2012). "Common BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer families: a meta-analysis from systematic review." Mol Biol Rep 39(3): 2109-2118.

Wang, S., H. Yang, F. Tong, J. Zhang, D. Yang, H. Liu, Y. Cao, P. Liu, P. Zhou, L. Cheng, M. Liu and J. Guo (2009). "Response to neoadjuvant therapy and disease free survival in patients with triple-negative breast cancer." Gan To Kagaku Ryoho 36(2): 255-258.

Wei, M., T. A. Grushko, J. Dignam, F. Hagos, R. Nanda, L. Sveen, J. Xu, J. Fackenthal, M. Tretiakova, S. Das and O. I. Olopade (2005). "BRCA1 promoter methylation in sporadic breast cancer is associated with reduced BRCA1 copy number and chromosome 17 aneusomy." Cancer Res 65(23): 10692-10699.

Wen, Y. H., A. Ho, S. Patil, M. Akram, J. Catalano, A. Eaton, L. Norton, R. Benezra and E. Brogi (2012). "Id4 protein is highly expressed in triple-negative breast carcinomas: possible implications for BRCA1 downregulation." Breast Cancer Res Treat.

Wong, M. W., C. Nordfors, D. Mossman, G. Pecenpetelovska, K. A. Avery-Kiejda, B. Talseth-Palmer, N. A. Bowden and R. J. Scott (2011). "BRIP1, PALB2, and RAD51C mutation analysis reveals their relative importance as genetic susceptibility factors for breast cancer." Breast Cancer Res Treat 127(3): 853-859.

Wu, L. C., Z. W. Wang, J. T. Tsan, M. A. Spillman, A. Phung, X. L. Xu, M. C. Yang, L. Y. Hwang, A. M. Bowcock and R. Baer (1996). "Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product." Nat Genet 14(4): 430-440.

Xu, J., S. Fan and E. M. Rosen (2005). "Regulation of the estrogen-inducible gene expression profile by the breast cancer susceptibility gene BRCA1." Endocrinology 146(4): 2031-2047.

Yang, S. X., S. Kummar, S. M. Steinberg, A. J. Murgo, M. Gutierrez, L. Rubinstein, D. Nguyen, G. Kaur, A. P. Chen, V. L. Giranda, J. E. Tomaszewski, J. H. Doroshow and N. C. I. P. W. Group (2009). "Immunohistochemical detection of poly(ADP-ribose) polymerase inhibition by ABT-888 in patients with refractory solid tumors and lymphomas." Cancer Biol Ther 8(21): 2004-2009.

Yang, X. R., R. M. Pfeiffer, M. Garcia-Closas, D. L. Rimm, J. Lissowska, L. A. Brinton, B. Peplonska, S. M. Hewitt, R. W. Cartun, D. Mandich, H. Sasano, D. B. Evans, T. R. Sutter and M. E. Sherman (2007). "Hormonal markers in breast cancer: coexpression, relationship with pathologic characteristics, and risk factor associations in a population-based study." Cancer Res 67(21): 10608-10617.

Yang, X. R., M. E. Sherman, D. L. Rimm, J. Lissowska, L. A. Brinton, B. Peplonska, S. M. Hewitt, W. F. Anderson, N. Szeszenia-Dabrowska, A. Bardin-Mikolajczak, W. Zatonski, R. Cartun, D. Mandich, G. Rymkiewicz, M. Ligaj, S. Lukaszek, R. Kordek and M. García-Closas (2007). "Differences in risk factors for breast cancer molecular subtypes in a population-based study." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 16(3): 439-443.

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

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Modell der Mehrschritt-Karzinogenese nach Beckmann (Beckmann, Niederacher et al. 1997)....2

Abbildung 2: Intrinsische Subtypen des Mammakarzinoms nach Bertucci (Bertucci, Finetti et al. 2006)....6

Abbildung 3: Darstellung einer möglichen Verbindung der beiden Subtypen in Anlehnung an die von de Ruijter et al. ausgearbeitete Darstellung. Folgende Abkürzungen werden verwandt: BBC= basale Brustkrebs; TNBBC = tripel-negative Brustkrebs vom basalen Subtyp, NB-TNBC= nicht-basale aber tripel-negative Brustkrebs (de Ruijter, Veeck et al. 2011)....8

Abbildung 4: Rezidivverhalten der tripel-negativen Tumoren im Vergleich zu hormonrezeptor-positiven Tumoren. Deutlich zu sehen, ein erhöhtes Risiko innerhalb der ersten 5 Jahre für Patientinnen mit einem tripel-negativem Tumor im Vergleich zu anderen Subtypen. Dann, nach besagten Zeitraum Angleichung der Risiken zu erkennen. Die Abbildung entstammt der American Association for Cancer Research . (Carey 2011) 11

Abbildung 5: Überlebenskurven der fünf intrinischen Subtypen, im Rahmen der Carolina Breast Cancer Study. Gruppierung anhand der immunhistochemisch bestimmten intrinischen Subtypen. Hierbei erkennt man einen deutlichen Überlebensnachteil für Patientinnen mit einem negativen Hormonrezeptorstatus (Carey, Perou et al. 2006).....12

Abbildung 6: Rezidivrisiken nach adjuvanter Chemotherapie bei verschiedenen Subtypen im Vergleich, Abkürzungen; PG= Progesteron-Rezeptor positiv, EG= Östrogenrezeptor positiv, TNBC = tripel-negative Brustkrebs (Carey 2011) 13

Abbildung 7: Ansprechen der tripel-negativen/basalen Tumoren nach neoadjuvanter Chemotherapie im Vergleich zu den nicht tripel-negativen Tumoren. Die Abbildung wurde dem J Clin Oncol 2008;26:1275-1281 entnommen....15

Abbildung 8: Kriterien zur Durchführung einer Genanalyse bei familiärer Belastung ausgearbeitet im Rahmen der (e.V 2012) 18

Abbildung 9: Schematische Darstellung der Funktion des BRCA1 im Kontext der DNA-Reparatur. Erläuterung der Grafik im untenstehenden Fließtext (Caestecker and Van de Walle 2013) 22

Abbildung 10: PARP- Inhibitoren –Wirkungsweise (Meindl, Ditsch et al. 4/2011) 25

Abbildung 11: Light Cycler® 480 (Roche)(Science 2011)....36

Abbildung 12: Schmelzkurvenanalyse, Exon 5....57

Abbildung 13: Sequenz mit Basenaustausch; Mutation c.300T>G; in der mutierten Sequenz ist der Wildtyp nur noch minimal sichtbar, es könnte sich dabei auch um Reste von Normalgewebe handeln, es handelt sich daher wahrscheinlich um ein LOH. 57

Abbildung 14: Schmelzkurvenanalyse Exon 5....58

Abbildung 15: Sequenz mit Basenaustausch; Mutation IVS5+1G>T führt zum Spleißdefekt, Wildtypsequenz gut erkennbar, es handelt sich wahrscheinlich um eine heterozygote Mutation im Tumor, oder einen größeren Anteil an Normalgewebe. 58

Abbildung 16: Schmelzkurvenanalyse Exon 11 59

Abbildung 17: Sequenz mit Deletion von 4 bp und Leserasterverschiebung; Mutation c.3875del4bp 59

Abbildung 18: Schmelzkurvenanalyse Exon 16 60

Abbildung 19: Sequenz mit Basenaustausch; Mutation c.5007G>T, in der mutierten Sequenz ist der Wildtyp gut sichtbar, es handelt sich wahrscheinlich um eine heterozygote Mutation oder viel Normalgewebe. 60

Abbildung 20: Schmelzkurvenanalyse Exon 19 61

Abbildung 21: Sequenz: Punktmutation A>T, aufgrund verarbeitungstechnischer Gründe und Defekt des Speichermediums mangelhafte Qualität der Darstellung. 61

Abbildung 22: Schmelzkurvenanalyse Exon 19 62

Abbildung 23: Sequenz mit Deletion eines G, dadurch Verschiebung des Leseraster, es ist neben der Wildtypsequenz die mutierte Sequenz zu erkennen, daher handelt es sich wahrscheinlich um eine heterozygote Mutation. 62

Abbildung 24: Schmelzkurven Exon 20 63

Abbildung 25: c.5370C>T 63

Abbildung 26: c.5385-5386insC 64

Abbildung 27: Schmelzkurvenanalyse Exon 20 65

Abbildung 28: Sequenz mit Insertion c.5385-5386ins C und daraus resultierender Leserasterverschiebung, wobei es sich wahrscheinlich um eine heterozygote Mutation handelt. 65

Abbildung 29: Altersstruktur der Mutationsträger und Wildtypen im Box-Plot. Die folgende Abbildung stellt das Erkrankungsalter der Wildtypen und der Mutationsträgerinnen gegenüber. Obwohl sich graphisch der Eindruck eines früheren Erkrankungsalters bei den Mutationsträgerinnen ergibt, konnte dies nicht mit statistischer Signifikanz bestätigt werden. 72

Abbildung 30: Kaplan-Meier-Kurve zum progressionsfreien Überleben 76

Abbildung 31: Kaplan-Meier-Gesamtüberleben 79

Abbildung 32: Potentielle Confounder-Variable 83

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Histologische Einteilungen der invasiven Mammakarzinome, entnommen den S3 Leitlinien der DKG und der DGGG 2012 (e.V 2012) 5

Tabelle 2: Empirische Mutationswahrscheinlichkeiten- Deutsches Konsortium für familiären Brust- und Eierstockkrebs, (Meindl, Ditsch et al. 4/2011) 19

Tabelle 3: Risikomodifizierende Brustkrebsgene;(Meindl, Ditsch et al. 4/2011) 20

Tabelle 4: In Anlehnung an den von Turner et al. erstmals geprägten Begriff des „BRCAness" Subtyp; (Turner, Tutt et al. 2004, Carey 2011) 26

Tabelle 5: Verwendete Chemikalien mit Herstellerangaben 29

Tabelle 6: Verwendete molekularbiologische Kits 30

Tabelle 7: Verwendetes Enzym 30

Tabelle 8: Verbrauchsmaterial 32

Tabelle 9: Geräteliste 33

Tabelle 10: Pipettierschema LightCycler Master Mix 37

Tabelle 11: Pipetierschema PCR für DHPLC 40

Tabelle 12: Reaktionsprotokoll Thermocycler für DHPLC-Analalyse 40

Tabelle 13: PCR-Ansatz für Sequenzierung 42

Tabelle 14: PCR-Reaktionsschema für Thermocycler 43

Tabelle 15: Reaktionsansatz der Sequenzierung 44

Tabelle 16: Reaktionsprotokoll Cycle 44

Tabelle 17: Klinische Daten 48

Tabelle 18: Lymphknotenstatus in Beziehung zur Tumorgröße 50

Tabelle 19: Chemotherapieregime Wildtypen; insgesamt wurden 51 Patientinnen mit antrazyklin-haltigen Regimen behandelt. 52

Tabelle 20: Einsatz von Chemotherapeutika bei Mutationsträgerinnen 52

Tabelle 21: Tabellarische Darstellung der analysierten und bestätigten Mutationen. Dabei wurden die erstmals beschriebenen Mutationen mit einem Stern * markiert. MaCa = Mammakarzinom. ◆verstorben 55

Tabelle 22: Erläuterung einzelner Mutationskategorien 56

Tabelle 23: Gekoppelte Polymorphismen des BRCA1 Gen, wie aus der Tabelle hervorgeht findet sich bei 4 Clusterpolymorphismen ein Aminosäureaustausch 67

Tabelle 24: Kreuztabelle mit Darstellung der Häufigkeiten der Variabeln Nodalstatus und Metastasen. Der Nodalstatus bezieht sich auf ein zusammengefasste Variabelen Dabei wurden die Nodalstadien pN0 und pN1 zusammengefasst sowie pN2 und pN3. Die Variabeln für Metastasen wurde in die Kategorien Vorhandensein und Nichtvorhandensein eingeteilt. 69

Tabelle 25:Chi-Quadrattest nach Pearson 70

Tabelle 26: Kreuztabelle mit Darstellung der Variabelnhäufigkeiten. Das Tumorstadium stellt eine zusammengesetzte Variable dar. Dabei werden unter 1 die Stadien pT1 und pT2 zusammengefasst, unter 2 die Variablen pT3 und pT4. Die Variabeln für die Metastasen werden nach Vorhandensein und nicht Vorhandensein klassifiziert. 70

Tabelle 27: Chi -Quadrat Test nach Pearson 70

Tabelle 28: Kreuztabelle zur Darstellung von Tumorgröße und Nodalstatus. Dabei werden unter 1 die Stadien pT1 und pT2 zusammengefasst, unter 2 die Variablen pT3 und pT4. 71

Tabelle 29: Chi-Quadrat nach Pearson 71

Tabelle 30: Klinische und histopathologische Kriterien im Vergleich zwischen Mutationsträgerinnen und Wildtypen 73

Tabelle 31: Häufigkeitsverteilungen zum rezidivfreien Überleben mit Darstellung der aufgetretenen Rezidive und Anzahl an rezidivfreien Patientinnen 74

Tabelle 32 Rezidivhäufigkeit bei Mutationsträgerinnen und Wildtypen 74

Tabelle 33: Mediane rezidivfreie Intervalle 75

Tabelle 34: Zeitliche Verteilung der Rezidive 75

Tabelle 35: Häufigkeitsverteilung zum Gesamtüberleben mit Darstellung der lebenden und verstorbenen Patientinnen 77

Tabelle 36: Medianes Gesamtüberleben 77

Tabelle 37: Todesfälle bei Mutationsträgerinnen und Patientinnen mit Wildtype-BRCA1 78

Tabelle 38: Univariate Cox-Regressionsanalyse für das progressionsfreie Überleben (PFS) 80

Tabelle 39: Univariate Regressionsanalyse für das Gesamtüberleben (OS) 81

Tabelle 40: Multivariate Cox-Regressionsanalyse für DFS und BRCA1-Mutationsstatus 82

Tabelle 41: Multivariate Cox-Regressionsanalyse für OS und BRCA1-Mutationsstatus 82

11. Anhang

BEZEICHNUNG	PRIMERSEQUENZ FW	PRIMERSEQUNEZ REV
BRCA1_LC_2_M13	TGTAAAACGACGGCCAGTGAAG TTGTCATTTTATAAACCTT	CAGGAAACAGCTATGACCTGTGTCT TTTCTTCCCTAGTATGT
BRCA1_LC_3_M13	TGTAAAACGACGGCCAGTTTGA GGCCTTATGTTGACTCAG	CAGGAAACAGCTATGACCTGAAATG GAGTTGGATTTTTC
BRCA1_LC_5_M13	TGTAAAACGACGGCCAGTTTCA TGGCTATTTGCCTTTTG	CAGGAAACAGCTATGACCTGATGAA TGGTTTTATAGGAACG
BRCA1_LC_6_M13	TGTAAAACGACGGCCAGTGGTT TTCTACTGTTGCTGCATCT	CAGGAAACAGCTATGACCGAAAGT AATTGTGCAAACTTCCTG
BRCA1_LC_7_M13	TGTAAAACGACGGCCAGTGGGT TTCTCTTGGTTTCTTTGA	CAGGAAACAGCTATGACCAGAAGA AGAAAACAAATGGTTT
BRCA1_LC_8_M13	TGTAAAACGACGGCCAGTTTCA GGAGGAAAAGCACAGAA	CAGGAAACAGCTATGACCCACTTCC CAAAGCTGCCTAC
BRCA1_LC_9:M13	TGTAAAACGACGGCCAGTACCC TTTTAATTAAGAAAACTTTTAT	CAGGAAACAGCTATGACCAAAGAG AGAAACATCAATCCT
BRCA1_LC_10_M13	TGTAAAACGACGGCCAGTTGGT CAGCTTTCTGTAATCGAA	CAGGAAACAGCTATGACCAAGGTCC CAAATGGTCTTCA
BRCA1_LC_11AC_M13	TGTAAAACGACGGCCAGTGTTG ATTTCCACCTCCAAGG	CAGGAAACAGCTATGACCGTTTGCT TTTATTACAGAATTCAGCC
BRCA1_LC_11C_M13	TGTAAAACGACGGCCAGTTCAT GCCAGCTCATTACAGC	CAGGAAACAGCTATGACCTCAGACT CCCCATCATGTGA
BRCA1_LC_D11-4_M13	TGTAAAACGACGGCCAGTGTGT GAGAGAAAAGAATGG	CAGGAAACAGCTATGACCCATCTAC CTCATTTAGAACG
BRCA1_LC_D11-5_M13	TGTAAAACGACGGCCAGTGAAT CAAATGCCAAAGTAGC	CAGGAAACAGCTATGACCGGACGCT CTTGTATTATCTG
BRCA1_LC_D11-6_M13	TGTAAAACGACGGCCAGTATTA TAGGAGCATTTGTTAC	CAGGAAACAGCTATGACCTTTTCGA GTGATTCTATTGG
BRCA1_LC_D11-7_M13	TGTAAAACAGACGGCCAGTCAA AAGGTGATTCTATTCAG	CAGGAAACAGCTATGACCATTAGGT GGGCTTAGATTTC
BRCA1_LC_D11-8_M13	TGTAAAACGACGGCCAGTCAGG CATATTCATGCGCTTG	CAGGAAACAGCTATGACCTACTTGT CTGTTCATTTGGC
BRCA1_LC_D11-10_M13	TGTAAAACGACGGCCAGTAGGT AAAGAACCTGCAAC	CAGGAAACAGCTATGACCATACTGC TACTCTCTACAGAT
BRCA1_LC_D11-H_M13	TGTAAAACGACGGCCAGTGTGG AGAAAGGGTTTTGCAA	CAGGAAACAGCTATGACCCTTTCTT CCATTTCTATGCTTGT
BRCA1_LC_11IA_M13	TGTAAAACGGCCAGTGTATCCA TTGGGACATGAAG	CAGGAAACAGCTATGACCGACCAA CCACAGGAAGCCT
BRCA1_LC_11IB_M13	TGTAAAACGACGGCCAGTCAAG CCTGTACAGACAGTTA	CAGGAAACAGCTATGACCTGATGGG AAAAAGTGGTGGT
BRCA1_LC_11-13b_M13	TGTAAAACGACGGCCAGTGCCA AATGAGTATCAAAGG	CAGGAAACAGCTATGACCCAGGTG ACATTGAATGTTCC
BRCA1_LC_11-13c_M13	TGTAAAACGACGGCCAGTAAAA TCTGCTAGAGGAAAAC	CAGGAAACAGCTATGACCCATCACT GGAACCTATTTC
BRCA1_LC_11-13e_M13	TGTAAAACGACGGCCAGTTGAA GAAGTAGTTCAGACTG	CAGGAAACAGCTATGACCAAAGGG CTAGGACTCCTGCT
BRCA1_LC_11-13f_M13	TGTAAAACGACGGCCAGTAGTC ATGCATCTCAGGTTTG	CAGGAAACAGCTATGACCATAAGTT CTCTTCTGAGGAC
BRCA1_LC_D11-14_M13	TGTAAAACGACGGCCAGTCTTT CACCCATACACATTTG	CAGGAAACAGCTATGACCTGCAGTC ATTTAAGCTATTC
BRCA1_LC_D11-15_M13	TGTAAAACGACGGCCAGTGAGT GTCTGTCTAAGAACAC	CAGGAAACAGCTATGACCTATTTGC AGTCAAGTCTTCC
BRCA1_LC_11-N_M13	TGTAAAACGACGGCCAGTTAAT ATTGGCAAAGGCATCTCA	CAGGAAACAGCTATGACCGCTCCCC AAAAGCATAAACA
BRCA1_LC_12_M13	TGTAAAACGACGGCCAGTCAGC	CAGGAAACAGCTATGACCATACATA

	AAGTTGCAGCGTT	CTACTGAATGCAAAGGAC
BRCA1_LC_13_M13	TGTAAAACGACGGCCAGTAATG GAAAGCTTCTCAAAGTATT	CAGGAAACAGCTATGACCCCTTACT CTTCAGAAGGAGAT
BRCA1_LC_15_M13	TGTAAAACGACGGCCAGTCTTT CACAATTGGTGGCG	CAGGAAACAGCTATGACCCCAGAAT ATCTTTATGTAGGATTCAG
BRCA1_LC_16A_M13		
BRCA1_LC_16B_M13	TGTAAAAACGACGGCCAGTAAA GTTGCAGAATCTGCCC	CAGGAAACAGCTATGACCCATAAA ACTCTTTCCAGAATGTTG
BRCA1_LC_17_M13	TGTAAAACGACGGCCAGTTGTA GAACGTGCAGGATTGC	CAGGAAACAGCTATGACCTTTATGC AGCAGATGCAAGG
BRCA1_LC_18_M13	TGTAAAACGACGGCCAGTCTTT AGCTTCTTAGGACAGCA	CAGGAAACAGCTATGACCAAATGC AATTCTGAGGTGTTA
BRCA1_LC_19_M13	TGTAAAACGACGGCCAGTTTGT GAATCGCTGACCTCTCT	CAGGAAACAGCTATGACCGGTGCAT TGATGGAAGGAAG
BRCA1_LC_20_M13	TGTAAAACGACGGCCAGTCTGG CCTGAATGCCTTAAAT	CAGGAAACAGCTATGACCCAGAGT GGTGGGGTGAGATT
BRCA1_LC_21_M13	TGTAAAACGACGGCCAGTAGAT TTTCCTTCTCTCCATTCC	CAGGAAACAGCTATGACCCCATCGT GGGATCTTGCTTA
BRCA1_LC_22_M13	TGTAAAACGACGGCCAGTTCCC ATTGAGAGGTCTTGCT	CAGGAAACAGCTATGACCGAGAAG ACTTCTGAGGCTAC
BRCA1_LC_23_M13	TGTAAAACGACGGCCAGTGATG AAGTGACAGTTCCAGTG	CAGGAAACAGCATGACCGGATAAA CCAAACCCATGC
BRCA1_LC_24_M13	TGTAAAACGACGGCCAGTCCTA GTCCAGGAGAATGAATTGA	CAGGAAACAGCTATGACCCTGGAA AGGCCACTTTGTAA