

Aus der Frauenklinik  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Professor Dr. med. W. Janni

Klassifizierung von “unclassified variants“  
im Rahmen der molekulargenetischen Untersuchung  
beim familiären Mammakarzinom

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Dominik Falkenstein

2012

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der  
medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. J. Windolf

Referent: PD Dr. med. M. Fleisch

Korreferent: Prof. Dr. med. N. H. Stoecklein

## Zusammenfassung

Die Bedeutung des Mammakarzinoms als häufigstem Malignom der Frau ist in vielschichtiger Weise herausragend. Bei etwa jedem 10. Mammakarzinom wird eine hereditäre Ursache angenommen. Durch die Einführung molekulargenetischer Untersuchungen bei Personen aus betroffenen Familien im Hinblick auf Mutationen der Kandidatengene BRCA1 und BRCA2 wurde die präventive Beratung Ratsuchender nachhaltig verändert. Die aus dieser Untersuchungsmethode resultierende Problematik des unbekannten Stellenwertes bislang unklassifizierter Sequenzvarianten sollte zentraler Gegenstand dieser Arbeit sein. Zu diesem Zweck wurden, das Ziel der Klassifizierung sogenannter UVs verfolgend, auf einer strukturierten und umfassenden Literaturrecherche basierend eigene Untersuchungen durchgeführt. Zu diesen zählten im Wesentlichen “Co-Occurrence“- und “Co-Segregationsanalysen“ sowie die Erfassung und die systematische Auswertung histopathologischer und immunhistochemischer Daten. Die Auswahl der genannten Methoden erfolgte nach Abwägung von zu erwartendem Nutzen im Sinne einer möglichst hohen Aussagekraft sowie dem damit verknüpften materiellen bzw. finanziellen Aufwand. Durch diese Vorgehensweise war es möglich, zwei von insgesamt vier zuvor unklassifizierten Sequenzvarianten zu kategorisieren: so konnten sowohl der UV 5075 G>A als auch der UV 4931 A>G (beide in BRCA1 lokalisiert) als neutral bewertet werden. Somit konnte ein entscheidender Beitrag zu den Bemühungen des Deutschen Konsortiums für hereditären Brust- und Eierstockkrebs geleistet werden, UVs systematisch zu klassifizieren. Die Sammlung und Interpretation histopathologischer bzw. immunhistochemischer Daten gestaltete sich aufgrund oftmals fehlender bzw. unvollständiger Befunde diffizil. Außerdem muss berücksichtigt werden, dass unter Zuhilfenahme weiterer Klassifikationsmethoden eine Bewertung der beiden anderen Sequenzvarianten hätte möglich sein können.

Die große Anzahl von UVs lässt erwarten, dass die Klassifizierung von Sequenzvarianten in BRCA1 und BRCA2 auch in Zukunft eine zentrale Aufgabe zahlreicher Forschungsgruppen darstellen wird. Die Entwicklung weiterer aussagekräftiger Klassifikationsmethoden wäre im Zuge dieser Forschungsbemühungen als wünschenswert zu erachten.

## Abkürzungsverzeichnis

|       |                                                |
|-------|------------------------------------------------|
| °C    | Grad Celcius                                   |
| A     | Adenin                                         |
| aa    | “amino acid“                                   |
| Abb.  | Abbildung                                      |
| B1    | Breast Cancer 1 – Suszeptibilitätsgen          |
| B2    | Breast Cancer 2 – Suszeptibilitätsgen          |
| BC    | Mammakarzinom                                  |
| BIC   | Breast Cancer Information Core                 |
| bp    | Basenpaare                                     |
| BRCA1 | Breast Cancer 1 - Suszeptibilitätsgen          |
| BRCA2 | Breast Cancer 2 – Suszeptibilitätsgen          |
| BRCT  | BRCA1-C-terminus                               |
| bzw.  | beziehungsweise                                |
| C     | Cytosin                                        |
| CIS   | <i>in-situ</i> Karzinom                        |
| CLIS  | <i>Carcinoma lobulare in-situ</i>              |
| CS    | Classification Score                           |
| d.h.  | das heißt                                      |
| DCIS  | Duktales <i>in-situ</i> Karzinom               |
| del   | Deletion                                       |
| DHPLC | Denaturing High-Pressure Liquid Chromatography |
| DNA   | Desoxyribonukleinsäure                         |
| dATP  | Desoxyadenosintriphosphat                      |
| dCTP  | Desoxycytosintriphosphat                       |
| dGTP  | Desoxyguanintriphosphat                        |
| dNTP  | Desoxyribonukleosidtriphosphat                 |
| dTTP  | Desoxythymidintriphosphat                      |

|                   |                                                                   |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------|
| <b>dsDNA</b>      | doppelsträngige DNA                                               |
| <b>dt.</b>        | deutsch                                                           |
| <b>EDTA</b>       | „ethylenediaminetetraacetic acid“                                 |
| <b>ER</b>         | Östrogenrezeptor                                                  |
| <b>Erkr.</b>      | Erkrankte                                                         |
| <b>ESE</b>        | “exonic splicing enhancer“                                        |
| <b>ESS</b>        | “exonic splicing silencer“                                        |
| <b>et al.</b>     | und andere                                                        |
| <b>Fa.</b>        | Firma                                                             |
| <b>fmol</b>       | Femtomol                                                          |
| <b>GCHBOC</b>     | German Consortium for Hereditary Breast and Ovarian Cancer        |
| <b>GOT</b>        | “gain of transcript”                                              |
| <b>G</b>          | Guanin                                                            |
| <b>GVGD</b>       | Grantham Variation / Grantham Deviation                           |
| <b>gyn.</b>       | gynäkologisch                                                     |
| <b>Her2</b>       | Human epidermal growth factor receptor 2                          |
| <b>HUGO</b>       | Human Genome Organisation                                         |
| <b>HGVS</b>       | Human Genome Variation Society                                    |
| <b>ID</b>         | Identifikationsnummer                                             |
| <b>IMISE</b>      | Institut für medizinische Informatik, Statistik und Epidemiologie |
| <b>Immunhisto</b> | Immunhistochemische Analysen                                      |
| <b>IRS</b>        | Immunreaktiver “Score“                                            |
| <b>IVS</b>        | “Intervening sequence mutation“                                   |
| <b>k. A.</b>      | keine Angaben                                                     |
| <b>kb</b>         | Kilobasen                                                         |
| <b>LOT</b>        | “loss of transcript“                                              |
| <b>LOVD</b>       | Leiden Open Variation Database                                    |
| <b>Mamma-Ca</b>   | Mammakarzinom                                                     |
| <b>MC</b>         | Mammakarzinom                                                     |

|                   |                                                    |
|-------------------|----------------------------------------------------|
| <b>Min.</b>       | Minuten                                            |
| <b>mg</b>         | Milligramm                                         |
| <b>ms</b>         | “missense“                                         |
| <b>ml</b>         | Milliliter                                         |
| <b>µg</b>         | Mikrogramm                                         |
| <b>µl</b>         | Mikroliter                                         |
| <b>µM</b>         | Mikromol                                           |
| <b>Mitgl.</b>     | Mitglieder                                         |
| <b>MLPA</b>       | “Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification” |
| <b>mRNA</b>       | “messenger“-RNA                                    |
| <b>Mut.</b>       | Mutation                                           |
| <b>n</b>          | Anzahl                                             |
| <b>nachgew.</b>   | nachgewiesenem                                     |
| <b>ng</b>         | Nanogramm                                          |
| <b>NT</b>         | Nukleotid                                          |
| <b>n.u.</b>       | nicht untersucht                                   |
| <b>o.</b>         | ohne                                               |
| <b>OC</b>         | Ovarialkarzinom                                    |
| <b>o.g.</b>       | oben genannt                                       |
| <b>Ovarial-Ca</b> | Ovarialkarzinom                                    |
| <b>p53</b>        | Protein-53                                         |
| <b>PAS</b>        | “periodic acid-Schiff reaction”                    |
| <b>path.</b>      | pathogene                                          |
| <b>Patho</b>      | Pathologiebefunde                                  |
| <b>PBS</b>        | Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung                 |
| <b>PCR</b>        | Polymerase-Kettenreaktion                          |
| <b>Poly</b>       | Polymorphismus                                     |
| <b>PR</b>         | Progesteronrezeptor                                |
| <b>ref.</b>       | Referenzsequenz                                    |

|                |                                             |
|----------------|---------------------------------------------|
| <b>Ref.Nr.</b> | Referenznummer                              |
| <b>RNA</b>     | Ribonukleinsäure                            |
| <b>rpm</b>     | Umdrehungen pro Minute                      |
| <b>s.</b>      | siehe                                       |
| <b>sog.</b>    | sogenannte(r)                               |
| <b>SNP</b>     | “single nucleotid polymorphism“             |
| <b>snRNP</b>   | “small nuclear ribonucleoprotein particles” |
| <b>ssDNA</b>   | einzelsträngige DNA                         |
| <b>s.u.</b>    | siehe unten                                 |
| <b>T</b>       | Thymin                                      |
| <b>Taq</b>     | <i>Thermus aquaticus</i>                    |
| <b>TEAA</b>    | Triethylammoniumacetat                      |
| <b>TSG</b>     | Tumorsuppressorgen                          |
| <b>UCV</b>     | “unclassified variant”                      |
| <b>UV</b>      | “unclassified variant”                      |
| <b>UV_TF</b>   | “unclassified variant”-Task Force           |
| <b>u.a.</b>    | unter anderem; und andere                   |
| <b>vgl.</b>    | vergleiche                                  |
| <b>vs.</b>     | versus                                      |
| <b>wt</b>      | Wildtyp                                     |
| <b>XC</b>      | Karzinom (kein Mamma- oder Ovarialkarzinom) |
| <b>z.B.</b>    | zum Beispiel                                |
| <b>z.T.</b>    | zum Teil                                    |

#### Hinweis:

Bei geschlechtsspezifischen Nomina ist in der Regel aus ökonomischen Gründen auf die explizite Nennung des jeweils anderen Geschlechts verzichtet worden. Beispiel: „Träger“ meint auch „Trägerinnen“; „Patientinnen“ inkludiert auch „Patienten“.

# Inhaltsverzeichnis

|                            |    |
|----------------------------|----|
| Zusammenfassung.....       | I  |
| Abkürzungsverzeichnis..... | II |

## **1. EINLEITUNG..... 1**

|            |                                                                                                                                       |           |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1.1</b> | <b>Epidemiologie des Mammakarzinoms</b>                                                                                               | <b>1</b>  |
| <b>1.2</b> | <b>Die Tumorsuppressorgene BRCA1 und BRCA2</b>                                                                                        | <b>3</b>  |
| <b>1.3</b> | <b>Interdisziplinäre Beratung, molekulargenetische Analytik und individuelle Präventionsstrategien beim hereditären Mammakarzinom</b> | <b>6</b>  |
| <b>1.4</b> | <b>Methoden zur Klassifizierung von “unclassified variants”</b>                                                                       | <b>10</b> |
| 1.4.1      | Frequenzanalysen                                                                                                                      | 10        |
| 1.4.2      | Untersuchungen zum Grad der Konservierung und zum “alignment”-GVGD                                                                    | 11        |
| 1.4.3      | Funktionsanalysen                                                                                                                     | 12        |
| 1.4.4      | Untersuchungen zum LOH-Status                                                                                                         | 12        |
| 1.4.5      | Erläuterungen zur Analyse histopathologischer Befunde                                                                                 | 13        |
| <b>1.5</b> | <b>Beitrag zu den Bemühungen des Deutschen Konsortiums für hereditären Brust- und Eierstockkrebs zur Klassifizierung von UVs</b>      | <b>14</b> |
| <b>1.6</b> | <b>Ziele der Arbeit</b>                                                                                                               | <b>15</b> |

## **2. METHODEN UND MATERIALIEN..... 16**

|            |                                                                             |           |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>2.1</b> | <b>Allgemeine Erläuterungen</b>                                             | <b>16</b> |
| <b>2.2</b> | <b>Durchführung der weiterführenden Literaturrecherche zu einzelnen UVs</b> | <b>19</b> |
| <b>2.3</b> | <b>Bewertungsschema für UVs</b>                                             | <b>19</b> |
| <b>2.4</b> | <b>Weitere Methoden zur Klassifizierung von “unclassified variants”</b>     | <b>20</b> |
| 2.4.1      | “Co-Occurrence”-Analysen                                                    | 21        |
| 2.4.2      | “Co-Segregationsanalysen”                                                   | 21        |

|            |                                                                                                                                                                              |           |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.4.3      | Histopathologische und immunhistochemische Befunde                                                                                                                           | 22        |
| <b>2.5</b> | <b>Stammbaumerstellung</b>                                                                                                                                                   | <b>24</b> |
| <b>2.6</b> | <b>Das Kollektiv</b>                                                                                                                                                         | <b>24</b> |
| <b>2.7</b> | <b>Durchführung und Interpretation von Mutationsanalysen</b>                                                                                                                 | <b>24</b> |
| 2.7.1      | Isolierung von DNA aus Lymphozyten für Mutationsanalysen                                                                                                                     | 24        |
| 2.7.2      | PCR                                                                                                                                                                          | 25        |
| 2.7.3      | DHPLC                                                                                                                                                                        | 29        |
| 2.7.4      | Überprüfung der PCR-Produkte durch elektrophoretische Auftrennung                                                                                                            | 31        |
| 2.7.5      | MLPA-(“Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification”)-Analysen                                                                                                           | 31        |
| <b>3.</b>  | <b>ERGEBNISSE.....</b>                                                                                                                                                       | <b>32</b> |
| <b>3.1</b> | <b>Allgemeine Darstellung der Ergebnisse</b>                                                                                                                                 | <b>32</b> |
| <b>3.2</b> | <b>Datenrecherche und –aufarbeitung als Grundlage für die Klassifizierung von BRCA1- / BRCA2-UVs durch das Deutsche Konsortium für hereditären Brust- und Eierstockkrebs</b> | <b>33</b> |
| <b>3.3</b> | <b>Histopathologische und immunhistochemische Befunde</b>                                                                                                                    | <b>37</b> |
| 3.3.1      | Heutige Datenlage der Befunde                                                                                                                                                | 37        |
| <b>3.4</b> | <b>Realisierbarkeit von “Co-Occurrence”- und “Co-Segregationsanalysen”</b>                                                                                                   | <b>38</b> |
| 3.4.1      | Erläuterungen zur Datenlage (“Co-Occurrence”)                                                                                                                                | 38        |
| 3.4.2      | Erläuterungen zur Datenlage (“Co-Segregation”)                                                                                                                               | 38        |
| 3.4.3      | Realisierbarkeit von systematischen Untersuchungen zur “Co-Occurrence” und “Co-Segregation”                                                                                  | 39        |
| <b>3.5</b> | <b>Analyse der Häufigkeiten verschiedener Formen von UVs aus der Düsseldorfer Tumorrisikosprechstunde</b>                                                                    | <b>39</b> |
| <b>3.6</b> | <b>Auswertung der Daten und Versuch der Klassifizierung ausgewählter UVs</b>                                                                                                 | <b>40</b> |
| 3.6.1      | Der UV c.5075 G>A (M1652I)                                                                                                                                                   | 40        |
| 3.6.1.1    | “Co-Occurrence”-Analysen der c.5075 G>A-                                                                                                                                     | 44        |

|            |                                                                                    |           |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
|            | Mutation                                                                           |           |
| 3.6.1.2    | “Co-Segregationsanalysen” der c.5075 G>A-Mutation                                  | 45        |
| 3.6.1.3    | Histopathologische Befunde zum UV c.5075 G>A                                       | 46        |
| 3.6.1.4    | Bewertung des UV c.5075 G>A                                                        | 47        |
| 3.6.2      | Der UV c.4931 A>G (Q1604Q)                                                         | 49        |
| 3.6.2.1    | “Co-Occurrence”-Analysen der c.4931 A>G-Mutation                                   | 52        |
| 3.6.2.2    | “Co-Segregationsanalysen” der c.4931 A>G-Mutation                                  | 53        |
| 3.6.2.3    | Histopathologische Befunde zum UV c.4931 A>G                                       | 54        |
| 3.6.2.4    | Bewertung des UV c.4931 A>G                                                        | 54        |
| 3.6.3      | Der UV IVS 20 + 60 ins12bp                                                         | 55        |
| 3.6.3.1    | “Co-Segregationsanalysen” zum IVS 20 + 60 ins12bp                                  | 58        |
| 3.6.3.2    | Histopathologische Befunde                                                         | 60        |
| 3.6.3.3    | Bewertung des UV IVS 20 + 60 ins12bp                                               | 62        |
| 3.6.4      | Der UV BRCA1 (Exon 18) c.5253_5258del6 p.W1712_V1713del                            | 62        |
| 3.6.4.1    | “Co-Segregationsanalysen” zum UV BRCA1 (Exon 18) c.5253_5258del6 p.W1712_V1713del  | 65        |
| 3.6.4.2    | Histopathologische Befunde zum UV BRCA1 (Exon 18) c.5253_5258del6 p.W1712_V1713del | 66        |
| 3.6.4.3    | Bewertung des UV BRCA1 (Exon 18) c.5253_5258del6 p.W1712_V1713del                  | 67        |
| <b>4.</b>  | <b>DISKUSSION.....</b>                                                             | <b>68</b> |
| <b>4.1</b> | <b>Bedeutung und Ziele der Arbeit</b>                                              | <b>68</b> |
| <b>4.2</b> | <b>Kritische Beurteilung von Methodik und Ergebnissen</b>                          | <b>68</b> |
| <b>4.3</b> | <b>Diskussion der Ergebnisse</b>                                                   | <b>70</b> |

|                              |                                                                                      |           |
|------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.3.1                        | Diskussion der Ergebnisse zum UV c.5075 G>A                                          | 70        |
| 4.3.2                        | Diskussion der Ergebnisse zum UV c.4931 A>G                                          | 74        |
| 4.3.3                        | Diskussion der Ergebnisse zum UV IVS 20 + 60 ins12bp                                 | 77        |
| 4.3.4                        | Diskussion der Ergebnisse zum UV BRCA1 (Exon<br>18) c.5253_5258del6 p.W1712_V1713del | 81        |
| <b>4.4</b>                   | <b>Schlussfolgerung</b>                                                              | <b>82</b> |
| Literaturverzeichnis.....    |                                                                                      | 84        |
| Anhang.....                  |                                                                                      | 91        |
| Curriculum vitae             |                                                                                      |           |
| Danksagung                   |                                                                                      |           |
| Eidesstattliche Versicherung |                                                                                      |           |

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms

In Europa und den USA erkrankt etwa jede 8. - 10. Frau im Laufe ihres Lebens am Mammakarzinom [1]. Mit einer Inzidenz von 57.000 Neuerkrankungen in Deutschland pro Jahr und einem Anteil von 28 % an allen malignen Erkrankungen ist das Mammakarzinom die häufigste bösartige Tumorerkrankung des weiblichen Geschlechts [2; 3]. Außerdem stellt sie die häufigste Todesursache zwischen dem 35. und dem 55. Lebensjahr in der weiblichen Bevölkerung der westlichen Welt dar; der Erkrankungsgipfel hingegen liegt in der Bundesrepublik Deutschland zwischen dem 50. - 70. Lebensjahr [1]. Jährlich ist mit 19.000 Todesfällen zu rechnen [4]. Seit 1980 steigt die Inzidenz des Mammakarzinoms weiter an, die Mortalität dagegen sinkt seit Beginn der 1990er Jahre leicht [3].

Inzwischen sind zahlreiche Risikofaktoren für die Entwicklung eines Mammakarzinoms bekannt. Dazu zählen neben genetischen Faktoren, die den hohen Stellenwert der Familienanamnese in der Diagnostik verdeutlichen, beispielsweise hormonelle Faktoren (frühe Menarche, späte Primiparität und Nulliparität, späte Menopause sowie die Einnahme von Diethylstilbestrol oder Kontrazeptiva). Diese scheinen jedoch nicht selbst einen mutagenen Effekt zu bewirken, sondern frühe Formen des Brustkrebses zur Proliferation anzuregen. Als weitere anerkannte Risikofaktoren sind darüber hinaus u.a. der kontralaterale Brustkrebs, Alter, ionisierende Strahlung, Alkoholabusus, Rauchen sowie die Exposition gegenüber toxischen Substanzen und Herbiziden zu nennen [5; 6].

Die überwiegende Mehrheit der malignen Tumoren der weiblichen Brust tritt sporadisch auf. Im Gegensatz dazu wird in etwa 5 - 10 % aller Fälle die Vererbung einer genetischen Veränderung in der betroffenen Familie als Ursache angenommen [7]. Es ist eine Vielzahl von Mutationen diverser Kandidatengene bekannt, die mit dem Auftreten verschiedener Karzinomsyndrome assoziiert sind (Tabelle 1). In diesem Zusammenhang sind insbesondere auch pathogene Sequenzveränderungen der Gene BRCA1 und BRCA2 von Bedeutung. Es handelt sich dabei um ein autosomal-dominant vererbtes Erkrankungsrisiko, das mit inaktivierenden Mutationen dieser Tumorsuppressorgene assoziiert ist. Diese Gene kodieren an der DNA-Reparatur beteiligte Proteine und werden für wichtige Funktionen hinsichtlich

der genetischen Stabilität verantwortlich gemacht. Kommt es im Rahmen von Mutationen zu einer eingeschränkten oder gar fehlenden Funktion dieser Genprodukte, so ist eine maligne Entartung der entsprechenden Zelle möglich. Heute werden Mutationen in BRCA1 und BRCA2 für etwa 25 % der familiär bedingten Mammakarzinome verantwortlich gemacht. Darüber hinaus ist eine Mutation dieser Gene mit einem stark erhöhten Risiko für die Entwicklung eines Ovarialkarzinoms assoziiert [8].

| Tumor                              | Syndrom / Vererbung                                                | Chromosom / Gen | Andere Tumoren                                                                                                         |
|------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Mammakarzinom                      | Cowden-Syndrom<br><i>autosomal dominant</i>                        | 10q23 PTEN      | Fibroadenome<br>Intest. Hamartöse<br>Polypen<br>Hautläsionen<br>Endometriumkarzinom<br>Follikuläres<br>Schilddrüsen-Ca |
| Mammakarzinom<br>(heterozygot)     | Ataxia Telangiectasia<br><i>autosomal rezessiv</i>                 | 11q22 ATM       | Lymphome<br>Zerebelläre Ataxie<br>Immundefizienz<br>Medulloblastom<br>Gliome                                           |
| Mammakarzinom<br>(Ovarialkarzinom) | Familiäres Mamma-/<br>Ovarialsyndrom<br><i>autosomal dominant</i>  | 13q12 BRCA2     | Männliches<br>Mammakarzinom<br>Prostatakarzinom<br>Uteruskarzinom<br>Oropharynxkarzinom<br>Pankreaskarzinom            |
| Mammakarzinom                      | Li-Fraumeni-Syndrom<br><i>autosomal dominant</i>                   | 17q13 TP53      | Sarkome<br>Gehirntumoren<br>Leukämie<br>Nebennierenrinde                                                               |
| Mammakarzinom<br>Ovarialkarzinom   | Familiäres Mamma-/<br>Ovarial-Syndrom<br><i>autosomal dominant</i> | 17q21 BRCA1     | Kolonkarzinom<br>Prostatakarzinom                                                                                      |

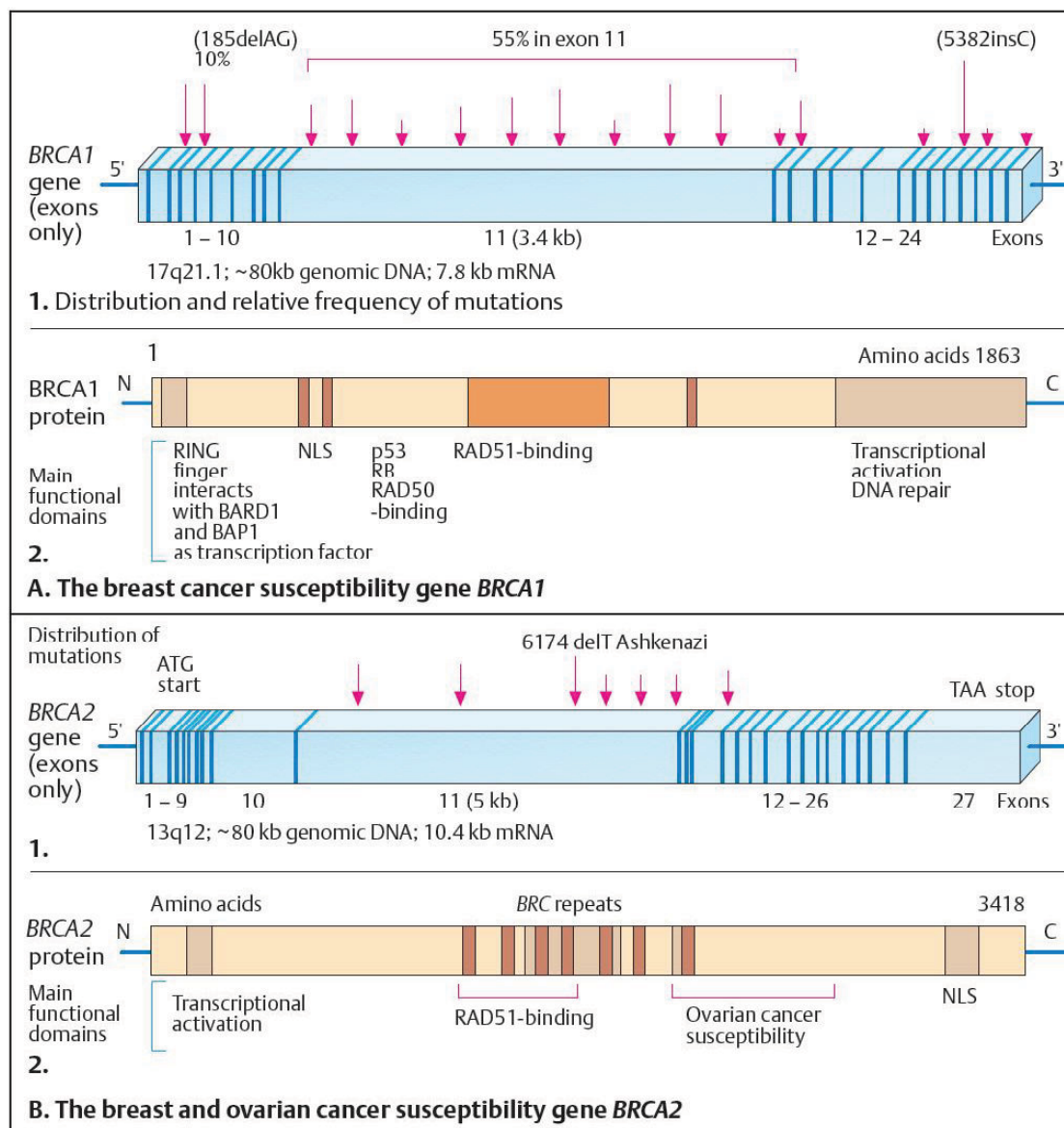
|                                  |                                 |           |                       |
|----------------------------------|---------------------------------|-----------|-----------------------|
| Endometrium-/<br>Ovarialkarzinom | HNPCC<br><br>autosomal dominant | 2p15 MSH2 | Kolorektalkarzinom    |
|                                  |                                 | 3p21 MLH1 | Hepatobiliäre         |
|                                  |                                 | 2q32 PMS1 | Karzinome             |
|                                  |                                 | 7p22 PMS2 | Urogenitalkarzinom    |
|                                  |                                 | 5q11 MSH3 | Glioblastoma (Turcot) |
|                                  |                                 | 2p22 MSH6 |                       |

BRCA1: breast cancer gene 1; BRCA2: breast cancer gene 2; TP53: tumor protein 53;  
ATM: Ataxia teleangiectatica mutated; PTEN: phosphatase and tensin homolog;  
hMSH2: human mutS homologue 2 gene; hMSH3: human mutS homologue 3 gene  
hMSH6: human mutS homologue 6 gene; hMLH1: human mutL homologue 1 gene  
hPMS1: human postmeiotic segregation 1; hPMS2: human postmeiotic segregation 2

**Tabelle 1: Mit Mammakarzinomen assoziierte chromosomale Alterationen und Kandidatengene [9]**

## 1.2 Die Tumorsuppressorgene BRCA1 und BRCA2

Mutationen der Gene BRCA1 auf Chromosom 17q21 und BRCA2 auf Chromosom 13q21 gehören zu den Hauptursachen für das familiäre Mamma- und Ovarialkarzinom [8; 10]. Diese beiden Tumorsuppressorgene (s. Abb. 1) wurden zu Beginn der 1990er Jahre durch Miki et al. (BRCA1) und Tavtigian et al. [11] (BRCA2) kloniert bzw. sequenziert. BRCA1 besteht aus insgesamt 24 Exons und kodiert ein aus 1863 Aminosäuren bestehendes Protein, dessen bislang bekannte Funktionen insbesondere in der DNA-Reparatur, der Transkriptionsregulation sowie in Kontrollaufgaben im Ablauf des Zellzyklus bestehen. BRCA2 besteht aus 27 Exons und kodiert ein aus 3418 Aminosäuren bestehendes Protein, das ebenfalls eine wichtige Rolle in der DNA-Reparatur übernimmt [12].



**Abb. 1: Übersicht der Tumorsuppressorgene BRCA1 und BRCA2, entnommen aus [13]**

Trägerinnen einer pathogenen Mutation in BRCA1 haben eine erhebliche Prädisposition für die Entwicklung der genannten Krebserkrankungen. Das Risiko für eine Trägerin, im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom zu erkranken wird auf etwa 80 % geschätzt und beträgt für die Entwicklung eines Ovarialkarzinoms ca. 60 % [14, s. Tabelle 2]. Außerdem erkranken Trägerinnen mit Keimbahnmutationen in BRCA1 bzw. BRCA2 sehr viel früher an diesen malignen Tumoren als Mammakarzinom-Patientinnen ohne genetische Prädisposition. Sporadische Mutationen konnten in BRCA1 nur selten, in BRCA2 bislang noch gar nicht nachgewiesen werden [12; 15]. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Risiko bei bekannter pathogener Mutation in BRCA1 / BRCA2 entweder an einem Mamma- oder an

einem Ovarialkarzinom zu erkranken zwischen 90 und 100 % liegt [14]. Bei männlichen Mutationsträgern ist das Risiko für die Entstehung eines Mammakarzinoms ebenfalls erhöht und entspricht etwa 5 % [8].

Es gilt als erwiesen, dass bei Trägerinnen einer solchen Mutation außerdem ein erhöhtes Risiko für die Ausbildung einer Leukämie, aber auch eines Kolon-, Pankreas- und Endometriumkarzinoms besteht [8; 16]. Bei männlichen Trägern dagegen ist das Erkrankungsrisiko noch nicht exakt zu beziffern, dennoch scheint die Rate an Mamma-, Pankreas-, Kolon- und Prostatakarzinomen sowie an Leukämien bei diesen Personen gegenüber der Normalbevölkerung erhöht zu sein [16].

| Alter in Jahren | BRCA1    |            | BRCA2    |            |
|-----------------|----------|------------|----------|------------|
|                 | Mamma-Ca | Ovarial-Ca | Mamma-Ca | Ovarial-Ca |
| 30 bis 39       | 16 %     | 10 %       | 15 %     | - (s.u.)   |
| 40 bis 49       | 59 %     | 29 %       | 34 %     | - (s.u.)   |
| 50 bis 59       | 77 %     | 38 %       | 51 %     | 7 %        |
| 60 bis 69       | 82 %     | 44 %       | 70 %     | 17 %       |

„-“ bedeutet: „gegenüber der Normalbevölkerung kein erhöhtes Risiko“

**Tabelle 2: Altersabhängigkeit des Erkrankungsrisikos für Mamma- und Ovarialkarzinome bei Trägern von Mutationen in BRCA1 / BRCA2 [nach 15]**

Weiterhin ist von Bedeutung, dass unter den BRCA1- / BRCA2-Mutationen z.T. große Unterschiede hinsichtlich der Prävalenz zwischen verschiedenen Ethnien existieren. Ein wichtiges Beispiel ist das gehäufte Vorkommen der BRCA1-Mutationen 185delAG und 5382insC sowie der BRCA2-Mutation 6174delT bei Ashkenazi-Juden. Die drei genannten Mutationen haben unter allen Männern und Frauen dieser Bevölkerungsgruppe insgesamt eine Prävalenz von ca. 2,5%, die damit etwa um den Faktor 5 größer ist als in der Normalbevölkerung [17]. Allein die Mutation 185delAG kann bei etwa 20% der Ashkenazi-Juden nachgewiesen werden, die an einer “early-onset” Form des Mammakarzinoms erkrankt sind [18]. In der BIC-Datenbank (Breast Cancer Information Core - Datenbank) [19] wird die Anzahl dokumentierter 185delAG-Mutationen derzeit mit 1.985 angegeben (Stand: 28.04.2012). Mit dieser großen Anzahl an Einträgen führen sie die Rangliste der am häufigsten erfassten Mutationen an.

### 1.3 Interdisziplinäre Beratung, molekulargenetische Analytik und individuelle Präventionsstrategien beim hereditären Mammakarzinom

In Deutschland sind im Konsortium für familiären Brust- und Eierstockkrebs (GCHBOC) zurzeit 12 universitäre Zentren zusammengeschlossen, die sich auf die individuelle Beratung und Betreuung von Familien mit einer Häufung von Mamma- und Ovarialkarzinomen spezialisiert haben. An diesen Zentren wird ein umfassendes interdisziplinäres Programm mit genetischer Beratung, molekulargenetischer Diagnostik, sowie auf die einzelne Person ausgerichteten Früherkennungsprogrammen angeboten. Diese Einrichtungen werden seit 1996 durch die Deutsche Krebshilfe unterstützt. Betroffene Patientinnen und ratsuchende Angehörige erkrankter Personen haben dort die Möglichkeit in ein entsprechendes Programm aufgenommen zu werden, sofern ihre Familie mindestens eines der folgenden Einschlusskriterien erfüllt [20]:

- Familie mit mindestens 3 an Mammakarzinomen Erkrankten, unabhängig vom Alter
- Familie mit mindestens 2 an Mammakarzinomen Erkrankten, davon  
1 Person unter 51 Jahren
- Familie mit einer an unilateralem Mammakarzinom im Alter von 35 Jahren oder früher Erkrankten
- Familie mit einer an bilateralem Mammakarzinom im Alter von 50 Jahren oder früher Erkrankten
- Familie mit mindestens 2 an Ovarialkarzinomen Erkrankten, unabhängig vom Alter
- Familie mit einer an einem Mammakarzinom und einer an einem Ovarialkarzinom Erkrankten, unabhängig vom Alter der Erkrankten
- Familie mit einem männlichen an einem Mammakarzinom Erkrankten und mindestens einer an einem Mamma- oder Ovarialkarzinom Erkrankten

Wird eine dieser Voraussetzungen erfüllt, so ist eine interdisziplinäre Versorgung durch Ärzte der Fachabteilungen Gynäkologie, Humangenetik, Radiologie, Pathologie und Psychoonkologie aufgrund der wahrscheinlichen Zugehörigkeit zu einer Hochrisikofamilie in einem der verschiedenen Zentren ratsam [16]. Dabei bilden das Arzt-Patienten-Gespräch, die genetische Analyse und die Früherkennung einer Tumorerkrankung die drei wesentlichen

Säulen in der Betreuung der Patientinnen bzw. der Ratsuchenden.

Voraussetzung für eine genetische Analyse ist ein ausführliches und individuell auf die vorstellige Betroffene ausgerichtetes ärztliches Beratungsgespräch. Inhaltlich relevant sind dabei humangenetische, gynäkologische und psychoonkologische Aspekte. Dabei wird neben der Aufklärung über Risiko- und Prognosefaktoren des Mamma- bzw. des Ovarialkarzinoms sowie einer Einschätzung der psychologischen Verfassung der jeweiligen Person bereits ein Familienstammbaum erhoben. Mit dessen Hilfe kann eine erste Risikobestimmung und daraus resultierend eine Beratung zwecks einer genetischen Testung vorgenommen werden. Das ermittelte Risiko ist relevant bei der Beantwortung der Frage, ob eine molekulargenetische Untersuchung sinnvoll ist und daher im Anschluss an die Beratung angeboten werden sollte. Für die Berechnung des Risikos können spezielle mathematische Modelle dienen (z.B. nach Claus et al. [21]). In diesem Zusammenhang ist es wichtig, dass der Ratsuchenden nach diesem Gespräch eine ausreichende Bedenkzeit eingeräumt wird, in der sie eigenständig zu einer Willensbildung gelangen kann, ob eine genetische Analyse erfolgen soll [16]. Um einen solchen “informed consent” zu ermöglichen, muss im Rahmen der ärztlichen Beratung auf verschiedene Schwierigkeiten bei der Durchführung der Testung und der Interpretation des Testergebnisses im Besonderen hingewiesen werden. Um eine prädiktive Genanalyse von bislang nicht Erkrankten durchführen zu können, ist zunächst der Nachweis einer pathogenen BRCA1- oder BRCA2-Mutation (bzw. einer Mutation in Genen RAD51C, CHEK2 oder PALB2) in dieser Familie zu erbringen. Hierzu wird in der Regel die Mutationssuche bei einem bereits an Brust- und/oder Eierstockkrebs erkrankten Familienmitglied, der sogenannten Indexperson, für die eine möglichst hohe Wahrscheinlichkeit Mutationsträger zu sein errechnet werden kann, durchgeführt. [16]. Daraus ergibt sich folgende Problematik: Zum Zeitpunkt der Konsultation von ratsuchenden Angehörigen sind als Indexperson geeignete Familienangehörige häufig bereits verstorben. Es ist auch denkbar, dass eine Testung aus persönlichen oder anderen Gründen abgelehnt wird.

Wird im Falle einer molekulargenetischen Untersuchung der Indexperson keine pathogene Mutation nachgewiesen, so muss das fortbestehende Erkrankungsrisiko für noch nicht erkrankte Ratsuchende berücksichtigt werden. Die Karzinogenese hereditärer Tumorerkrankungen ist als komplexe Interaktion verschiedener Genprodukte zu verstehen, deren Funktionen und Relevanz derzeit noch unzureichend erforscht sind. Eine Analyse aller

in diesen Entstehungsprozess involvierten Gene ist momentan nicht möglich. Daher sollten in dem beschriebenen Fall die aus der Familienanamnese ableitbaren individuellen Erkrankungsrisiken im Zuge einer Beratung ratsuchender Personen in besonderer Weise einbezogen werden. Ein negatives Analyseergebnis der Indexperson kann sich z.B. dann präsentieren, wenn die für eine Analyse bevorzugte Indexperson nicht molekulargenetisch untersucht werden kann und deshalb ein nicht erkranktes Familienmitglied als alternative Indexperson analysiert wird. Die daraus resultierende geringere Aussagekraft des negativen Befundes schmälert die Bedeutung eines solchen Ergebnisses.

Fällt das Testergebnis bei der Indexperson hingegen positiv aus, d.h. gelingt der Nachweis einer pathogenen BRCA1- / BRCA2-Mutation, dann gilt, dass nicht erkrankten Ratsuchenden eine prädiktive Testung angeboten werden kann. Wird die Mutation dann auch bei diesen Personen nachgewiesen, so sollten ihnen die Optionen zur Teilnahme an strukturierten Früherkennungsprogrammen sowie zur Ergreifung prophylaktischer Maßnahmen aufgezeigt und mit ihnen diskutiert werden.

Wird eine pathogene Mutation detektiert oder liegt ein entsprechend hohes genetisches Erkrankungsrisiko bei negativem Befund vor, so wird der Betroffenen die Einbindung in ein strukturiertes Früherkennungsprogramm angeboten (Tabelle 3). Als Beispiele für Untersuchungen im Rahmen dieser Sekundärprävention sind u.a. die Anleitung zur Selbstuntersuchung, die klinische Untersuchung, aber auch Ultraschall, Mammographie und MRT zu nennen. Darüber hinausgehend sollte unter Berücksichtigung des individuellen Risikos abgeklärt werden, ob eine Indikation für eine prophylaktische Adnexektomie oder Mastektomie vorliegt und/oder ob eine medikamentöse Prophylaxe z.B. mit Antiöstrogenen, GnRH-Analoga oder Aromatasehemmern eingeleitet werden sollte [22; 23].

|                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Einweisung in regelmäßige (monatliche) Selbstuntersuchung ab 25. Lebensjahr und klinische Untersuchung alle 6 Monate |                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 2. Alle 6 Monate:                                                                                                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ultraschall-Mamma ab 25. Lebensjahr (ab 50. Lebensjahr eventuell nur noch jährlich)</li> <li>- Tastuntersuchung der Ovarien und Vaginalsonographie ab 30. Lebensjahr</li> <li>- Bestimmung von CA-125 ab 30. Lebensjahr</li> </ul> |
| 3. Alle 6 - 12 Monate:                                                                                                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Gyn. Untersuchung und Exfoliativzytologie durch Frauenarzt/Frauenärztin ab dem 20. Lebensjahr</li> <li>- Kernspintomogramm ab 25. Lebensjahr und/oder Mammographie ab 30. Lebensjahr</li> </ul>                                    |

**Tabelle 3: Optionen zur Früherkennung bei erhöhtem Karzinomrisiko**

“Unclassified Variants“

Etwa der Hälfte aller Mutationen, die in BRCA1 bzw. BRCA2 gefunden werden, kann kein eindeutiger Krankheitswert zugeordnet werden [10]. In diesen Fällen kann eine prädiktive Genanalyse kein zuverlässiges Ergebnis liefern, so dass hier auf das o.a. individuelle *a priori* - Risiko zur Erstellung eines angemessenen Früherkennungsprogramms zurückgegriffen werden muss. Diffizil gestaltet sich folglich die Befundmitteilung an die ratsuchende Person im Falle eines solchen “unclassified variant” (UV / UCV). Da auf Seiten der Getesteten in den meisten Fällen davon ausgegangen wird, dass nach der Mitteilung des Befundes Gewissheit über den Mutationsstatus und das damit verbundene Erkrankungsrisiko besteht, wird dieses Testergebnis nicht nur aufgrund der fehlenden Determinierung sondern auch wegen der daraus resultierenden psychischen Belastung als unbefriedigend empfunden. Diese vielschichtige Problematik hat dazu beigetragen, dass Molekulargenetiker mit dem Ziel der Risikoeinschätzung in nationalen (GCHBOC) und internationalen Konsortien versuchen, zumindest die häufiger identifizierten UVs anhand von unterschiedlichen Methoden zu klassifizieren.

## 1.4 Methoden zur Klassifizierung von “unclassified variants”

In den vergangenen Jahren haben aufgrund der wachsenden Nachfrage nach einer interdisziplinären Betreuung karzinombelasteter Familien durch spezialisierte Zentren auch der Bedarf und die Notwendigkeit an begleitender Forschung zugenommen. Bedingt durch den verhältnismäßig großen Anteil von UVs, die im Rahmen einer molekulargenetischen Untersuchung diagnostiziert werden und der damit einhergehenden besonderen Problematik hinsichtlich der psycho-mentalenen Verarbeitung dieses Testergebnisses, sind die Erwartungen sowohl auf Seiten der Ratsuchenden und deren Angehörigen als auch der Ärzteschaft entsprechend groß, Kriterien zu finden, die eine möglichst zuverlässige Klassifikation der UVs erlauben. Die verschiedenen Kriterien, die derzeit verwendet werden um Mutationen unbekannten Krankheitswertes zu klassifizieren, unterscheiden sich jedoch z.T. erheblich in ihrer Sensitivität und Spezifität und werden daher unter anderem mit Hilfe verschiedener mathematischer Kalkulationen miteinander kombiniert, die es erlauben, das jeweilige Risiko für die Ratsuchende möglichst präzise zu ermitteln.

In der Literatur werden – neben den selbst angewendeten Klassifizierungsmethoden, die im Material- und Methodenteil beschrieben werden – zahlreiche weitere Kriterien angeführt. Diese sollen im Folgenden erläutert werden:

### 1.4.1 Frequenzanalysen

Bei den Frequenzanalysen werden Häufigkeiten des Auftretens einer Mutation in verschiedenen Populationen in Relation zueinander gesetzt. Dabei werden die Frequenzen in belasteten Familien mit solchen in einer Kontrollpopulation, also einer nicht-belasteten Referenzgruppe, verglichen. Das bedeutet, dass ein UV, der gehäuft bei Personen in einer nicht-erkrankten Referenzgruppe vorkommt, weniger wahrscheinlich den pathogenen Mutationen zuzuordnen ist [12]. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist die Bedingung einer ausreichend großen Referenzgruppe (>10.000 Personen) um allgemein gültige Aussagen zur Häufigkeit des Auftretens der Mutation in der Normalbevölkerung treffen zu können. Es gilt zu berücksichtigen, dass dieses Kriterium, ebenso wie die anderen aufgeführten Kriterien, weder die mögliche Pathogenität einer Mutation mit Sicherheit ausschließen noch deren Neutralität beweisen kann. Dies verdeutlicht, dass vor allem die kombinierte Anwendung mehrerer Kriterien die diagnostische Sicherheit erhöht.

#### 1.4.2 Untersuchungen zum Grad der Konservierung und zum “alignment”-GVGD

Durch eine Untersuchung des Grades der Konservierung des mutierten Genabschnitts kann man in einigen Fällen weitere Hinweise auf die Dignität des UV erhalten. Wie von Abkevich et al. [24] beschrieben, werden zwei verschiedene Arten von Aminosäuresubstitutionen unterschieden: Es werden sowohl langsam als auch schnell substituierte Aminosäuren differenziert. Bei ersterer handelt es sich um Aminosäuren in Genabschnitten, die einem hohen Selektionsdruck ausgesetzt sind, d.h. die eine für das kodierte Genprodukt essentielle Funktion inne haben und im Falle einer Mutation z.B. zum Funktionsverlust des Proteins führen. Dies ist aus dem hohen Grad an Konservierung über mehrere verschiedene Spezies hinweg abzuleiten, d.h. einer geringen bzw. nicht vorhandenen Differenz zwischen diesen Sequenzen bei den untersuchten Arten. Im Gegensatz dazu ist der Selektionsdruck bei den schnell substituierten Aminosäuren geringer und dort folglich die Anzahl an abweichenden Sequenzen in den untersuchten Spezies wesentlich umfangreicher. Zwar sind Rückschlüsse von der Art der Substitution (langsam vs. schnell) auf die funktionelle Bedeutung dieser Aminosäuren grundsätzlich möglich; dennoch kann keine eindeutige Aussage über die Pathogenität dieser Variante abgeleitet werden. Es gilt als wahrscheinlich, dass eine Mutation in einem stark konservierten Genabschnitt eher mit Pathogenität assoziiert ist als eine Mutation in einem wenig konservierten Bereich [25].

Das so genannte “alignment”-GVGD (a-GVGD) ist eine weitere Möglichkeit zur Klassifizierung von UVs, die auf dem Prinzip der Untersuchung des Konservierungsgrades basiert. Mit Hilfe eines Online-Programms (<http://agvgd.iarc.fr/>) [26] kann die Bedeutung einer Aminosäuresubstitution an einer beliebigen Position in einem Gen, somit auch in BRCA1 und BRCA2, durch die Bestimmung der Variationsbreite an Substitutionen an dieser Stelle ermittelt werden. Multiple Sequenzanordnungen ermöglichen eine Detektion von wenig oder hochgradig konservierten Positionen, die entweder einen geringen oder großen „funktionellen Druck“ an dieser Stelle des Gens widerspiegeln. Daraus lässt sich die Wertigkeit einer Substitution ermitteln. In deren Berechnung fließen zwei verschiedene Größen ein: zum einen Grantham Variation (GV) und zum anderen Grantham Deviation (GD). GV beschreibt das Ausmaß der biochemischen Variation an einer bestimmten Position in den multiplen Sequenzanordnungen, die als Referenzanordnungen dienen. GD beschreibt den Grad der Abweichung der Mutante von den Referenzsequenzen, die in Form einer so genannten GV-Box zusammengeführt werden, die sich anhand von Daten - bestehend aus

Polarität, Volumen und dem Grad der Abweichungen untereinander - berechnen lässt [27].

Um den Einsatz und die Interpretation von a-GVGD beispielhaft zu verdeutlichen, folgt eine kurze Erläuterung unter Verwendung von Grenzwerten nach Chevenix-Trench et al. [10]. So spricht ein hoher GV-Wert ( $> 0$ ) in Kombination mit einem niedrigen GD-Wert (z.B.  $GD = 0$ ) für eine Aminosäuresubstitution mit geringem Krankheitswert. Im Gegensatz dazu gehen niedrige Werte für GV ( $< 62$ ) und hohe Werte für GD ( $> 0$ ) eher mit einer pathogenen Aminosäuresubstitution einher. Als besonders schwierig ist in diesem Zusammenhang die Interpretation von Ergebnissen anzusehen, die mit hohen GV- ( $> 62$ ) und GD-Werten ( $> 0$ ) assoziiert sind. In einem solchen Fall ist z.B. die Integration des a-GVGD-Ergebnisses in die Rechenmodelle von Chevenix-Trench et al. nicht möglich. Eine Zuordnung zu einem neutralen oder pathogenen Charakter der jeweiligen Mutation kann bei der dargestellten Konstellation von Werten für GV und GD somit nicht erfolgen. Dies muss als Nachteil dieses Ansatzes gegenüber anderen Klassifikationsmethoden angesehen werden.

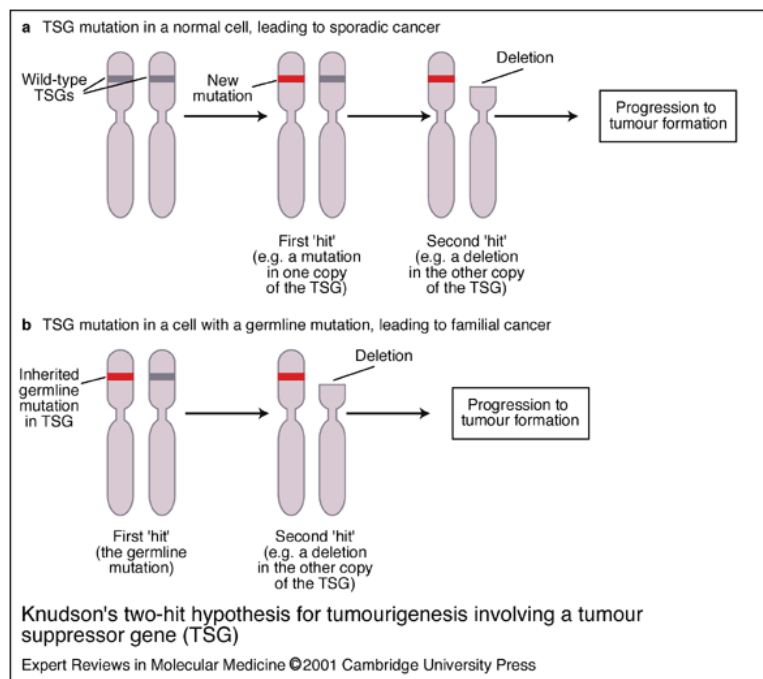
#### 1.4.3 Funktionsanalysen

In zahlreichen Studien stellt die Analyse der Proteinfunktion eine entscheidende Untersuchung dar, um zu erfassen, inwieweit Schlüsselfunktionen des Proteins in der Zelle betroffen werden. Es gilt jedoch zu bedenken, dass bei mehreren unterschiedlichen Funktionen aufgrund des Verlustes von Teilfunktionen wiederum deren Bedeutung für die Pathogenität dieser Variante nur schwer einzuschätzen ist. Bei Funktionsanalysen ist somit die Integration der Ergebnisse mit denen anderer Klassifikationsanalysen in ein gemeinsames Kalkulationsmodell problembehaftet [25].

#### 1.4.4 Untersuchungen zum LOH-Status

Die Untersuchung auf LOH ("loss of heterozygosity") basiert auf der Knudson-Hypothese (s. Abb. 2). Diese so genannte Zwei-Schritt-Hypothese besagt, dass eine Inaktivierung des Tumorsuppressorgens (TSG) durch zwei zeitlich voneinander unabhängig eingetretene Mutationen der beiden Allele eines TSGs erfolgen kann. Ist der erste der beiden Schritte ("first hit") die Mutation eines der Allele auf Keimbahnebene, so ist das damit verbundene Erkrankungsrisiko vererbbar. Zu diesem Zeitpunkt ist das jeweils andere Allel noch intakt und somit funktionstüchtig. Eine Tumorsuppression ist dadurch gewährleistet. Der zweite - und nach heutigem Kenntnisstand entscheidende - Schritt ist die Deletion und damit der Verlust

der nicht mutierten zweiten Genkopie, was demzufolge als “loss of heterozygosity” bezeichnet wird. Im Rahmen von diagnostischen Maßnahmen kommen Mikrosatelliten-Marker zum Einsatz, mit deren Hilfe ansonsten homologe Allele spezifisch unterschieden werden können [28]. Sind betroffene Patientinnen für einen dieser Marker heterozygot, so liegt ein LOH und damit der Verlust einer Genkopie in der Tumor-DNA dann vor, wenn nur noch eines der beiden Allele nachgewiesen werden kann (nach Hypothese das mutierte Allel) [28]. Dies setzt voraus, dass das für eine solche Analytik notwendige Tumormaterial vorhanden ist [25]. Da eine Kausalität der Gene BRCA1 und BRCA2 für die Entstehung von sporadischen Mamma- und Ovarialkarzinomen bis heute nicht geklärt werden konnte, ist auch die Anwendung der Knudson-Hypothese auf die Entstehung dieser malignen Tumoren nicht unproblematisch. Es wird davon ausgegangen, dass ein LOH in der Region der BRCA Gene in 30% der genannten sporadischen Karzinome zu beobachten ist. Im Vergleich dazu liegt die Rate an LOH beim hereditären Mamma- bzw. Ovarialkarzinom bei ca. 80% [10].



**Abb. 2: Zwei-Schritt-Modell von Knudson (1971), aus [29]**

#### 1.4.5 Erläuterungen zur Analyse histopathologischer Befunde

Als weiteres Klassifikationskriterium kann die Histopathologie von gewonnenem Tumormaterial angewendet werden. So spricht ein gehäuftes Vorkommen von *duktal-invasiv* wachsenden sog. “high-grade” Karzinomen ebenso wie eine verstärkte

Lymphozyteninfiltration für ein mit einer pathogenen BRCA1-Mutation assoziiertes Mammakarzinom [30]. Weitere mögliche Hinweise sind eine ausgeprägte Aneuploidie sowie Östrogen- und Progesteronrezeptor-negative Tumorzellen [30]. Fasching et al. haben darüber hinaus nachweisen können, dass eine hohe Mitoserate, eine erhöhte Pleomorphie, erhöhte Proliferationsraten und ein niedriger Differenzierungsgrad beim hereditären Brustkrebs gehäuft zu beobachten sind [31]. Im Vergleich zu den genannten Charakteristika im Falle einer Mutation in BRCA1 wurden ähnliche Merkmale für BRCA2-Mutationen entdeckt: So finden sich bei einer solchen Mutation wesentlich häufiger "higher-grade" Tumoren als bei nicht-hereditären Mammakarzinomen, jedoch ist die Stärke der Assoziation nicht so groß wie bei BRCA1-Mutationen [30]. Außerdem konnte bei BRCA2-Mutationen kein Unterschied zu sporadischen Mammakarzinomen im Hinblick auf verschiedene Hormonrezeptorstatus aufgezeigt werden. Insgesamt sprechen diese zahlreichen Unterschiede zur Histopathologie des sporadischen Mammakarzinoms laut Chappuis et al. [30] unter anderem dafür, dass sich die vererbten Formen des Brustkrebses auch in der Karzinogenese deutlich von sporadisch auftretenden Tumoren unterscheiden [30]. Bei der Verwertung histopathologischer Informationen für die Klassifizierung von UVs gilt es zu bedenken, dass nicht in jedem Fall Tumormaterial für eine Analyse vorhanden ist und dass die Aussagekraft im Hinblick auf Mutationen in BRCA2 aufgrund der oben genannten Differenzen zur dargestellten BRCA1-Histopathologie eingeschränkt ist [25].

Die methodische Umsetzung der Untersuchung histopathologischer Befunde wird im Kapitel „Methoden und Materialien“ erläutert.

## 1.5 Beitrag zu den Bemühungen des Deutschen Konsortiums für hereditären Brust- und Eierstockkrebs zur Klassifizierung von UVs

Das Konsortium wurde 1996 mit Hilfe der Deutschen Krebshilfe gegründet. Es versteht sich als Zusammenschluss von Experten verschiedener Fachdisziplinen (Humangenetiker, Analytiker u.a.) und hat insbesondere die Ermittlung von Familien, die mit erblichen Formen von Brust- bzw. Eierstockkrebs belastet sind, sowie molekulargenetische Analysen und humangenetische Beratungen bei ratsuchenden Frauen zur Aufgabe.

Die interne Arbeitsgruppe der sogenannten "Task-Force" zur Klassifizierung von in der Leipziger Datenbank [32] dokumentierten UVs setzt sich aus den folgenden 5 Mitgliedern

zusammen: Prof. Dr. A. Meindl, München; Prof. Dr. C. R. Müller-Reible, Würzburg; Prof. Dr. N. Arnold, Kiel; Dr. D. Niederacher, Düsseldorf und Dr. B. Wappenschmidt, Köln.

Das Ziel der UV-Klassifizierung verfolgend war es möglich, im Rahmen dieser Arbeit einen Beitrag zu den Bemühungen des Konsortiums zu leisten. Im Mittelpunkt stand dabei die Bewertung von UVs aus dem Düsseldorfer Familienkollektiv.

## 1.6 Ziele der Arbeit

Primäre Intention dieser Arbeit war es, ausgewählte UVs von Familien, die in der Tumorrisikosprechstunde des Düsseldorfer Zentrums vorstellig wurden (zentrumsinterne Familiennummerierung wurde anonymisiert), bezüglich einer fraglichen Pathogenität zu charakterisieren. Wesentliches Ziel war somit die Bewertung einzelner UVs, um die Betreuung von Ratsuchenden und erkrankten Patientinnen (z.B. in Form von Beratungen zu prophylaktischen Maßnahmen bzw. zu Therapieoptionen) zu optimieren. Auswahlkriterium der zu untersuchenden UVs war deren Nachweishäufigkeit im Düsseldorfer Familienkollektiv.

Als Grundlage für die eigenständige Klassifizierung sollten im Rahmen einer Metaanalyse systematisch die Ergebnisse verschiedener Studien zusammengeführt werden.

Diese Ergebnisse der Metaanalyse sollten für ausgewählte UVs durch Ergebnisse eigener Untersuchungen ergänzt werden, die sich an den in der Literatur beschriebenen Methoden orientieren. Dazu standen Proben von getesteten Familienmitgliedern zur Verfügung, die für “Co-Occurrence”- und “Co-Segregationsanalysen” genutzt werden konnten.

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer Bewertungsstrategie, die mögliche Bewertungskriterien auf der Grundlage der verfügbaren Daten und Analyseergebnisse beinhaltet.

Insbesondere sollte in diesem Zusammenhang die Interpretation histopathologischer Befunde als Bewertungsgrundlage zur Klassifizierung von UVs untersucht werden.

## 2. METHODEN UND MATERIALIEN

### 2.1. Allgemeine Erläuterungen

Als Grundlage für die systematische Erfassung von Informationen für den Versuch der Klassifizierung ausgewählter UVs diente ein Grundstock von verschiedenen Artikeln aus der Fachliteratur [10; 12; 25; 33; 34; 35]. Diese Artikel gaben Aufschluss über die Art der von der jeweiligen Forschungsgruppe angewendeten Klassifikationsansätze und die daraus resultierenden Bewertungen von etwa 500 UVs. Dabei wurde eine Differenzierung zwischen der Bewertung des UV durch die einzelne angewendete Untersuchungsmethode und einer Gesamtbewertung des UV, z.B. durch Rechenmodelle, in die die Ergebnisse mehrerer verschiedener Untersuchungen eingeflossen sind, vorgenommen. Dadurch wurde es möglich, das Ergebnis und die Wertigkeit einzelner Klassifikationsmethoden in den verschiedenen Modellen separat zu beurteilen. Diese Daten wurden tabellarisch für jeden in diesen Artikeln beschriebenen UV erfasst und durch die jeweils aktuelle Bewertung (mit Datum versehen) durch die BIC-Datenbank (s. Abb.3) ergänzt [19]. In einem weiteren Schritt wurde das Vorkommen der jeweiligen Sequenzvarianten in Familien der Tumorrisikosprechstunde des Brustzentrums der Frauenklinik in Düsseldorf untersucht und, sofern dies der Fall war, eine gezielte Recherche nach weiteren relevanten Artikeln, die den jeweiligen UV betreffen, angestellt. Im Wesentlichen dienten die Internetseiten <http://www.pubmed.org> (24.06.2012) und die "Scholar"-Funktion der Webseite <http://www.google.de> (24.06.2012) der standardisierten Suche nach solchen Artikeln. Darüber hinaus diente die Leipziger Datenbank „BRCA 2006“ (<https://ias3.imise.uni-leipzig.de/forms/frmservlet?config=brca2006>, 24.06.2012) [32], die durch das dortige Institut für medizinische Informatik, Statistik und Epidemiologie (IMISE) entwickelt wurde, als weitere Datenquelle im Hinblick auf Informationen zur Familienstruktur, Gendiagnostik, Eigen- und Familienanamnese, zu Tumorstadium und -histologie, durchgeführten präventiven Maßnahmen und Verlaufsuntersuchungen (s. Abb. 4). Diese Datenbank speist sich aus Patienten- bzw. Familiendaten der 12 Zentren des Deutschen Konsortiums und ermöglicht eine standardisierte Dokumentation und Auswertung der erhobenen Daten, die sich aktuell (28.04.2012) auf mehr als 5600 Familien beziehen. Schließlich wurden die aus diesen Quellen stammenden Informationen durch weitere Befunde aus den Archiven des Düsseldorfer Brustzentrums ergänzt.

**BRCA1 Exon mutations separated by Mutation Type**

Click on the type below to jump to a specific Mutation  
[\[Frame Shift\]](#)[\[Nonsense\]](#)[\[Missense\]](#)[\[Unclassified Variants\]](#)[\[Splice\]](#)[\[5'UTR\]](#)[\[3'UTR\]](#)[\[Intervening Sequence\]](#)[\[Synonymous\]](#)[\[In-Frame Deletion\]](#)[\[In-Frame Insertion\]](#)[\[Misclassified Data\]](#)

Click on the number of times recorded to see the Full Database Entries for this Exon

\* Mutation Effect is temporarily unavailable and is currently under review

| Frame Shift Mutations |      |     |       |                   |           |                     |           |              |       | Mutation Type | Mutation Effect | Clinically Important | Additional Information |
|-----------------------|------|-----|-------|-------------------|-----------|---------------------|-----------|--------------|-------|---------------|-----------------|----------------------|------------------------|
| # of times Recorded   | Exon | NT  | Codon | Base Change       | AA Change | BIC Designation     | HGVS cDNA | HGVS Protein | dbSNP |               |                 |                      |                        |
| <a href="#">108</a>   | 13   | -   | -     | ins 6kb           | -         | exon13ins6kb        |           |              |       | F             | *               | yes                  | no                     |
| <a href="#">1</a>     | 20   | -   | -     | del exon 20 ins G | -         | exon20delexon20insG |           |              |       | F             | *               | yes                  | no                     |
| <a href="#">2</a>     | -    | -   | -     | ins6kb            | Stop 1460 | exon13ins6kb        |           |              |       | F             | *               | Yes                  | no                     |
| <a href="#">20</a>    | 14   | -   | -     | del 26kb          | -         | exon14-20del26kb    |           |              |       | F             | *               | yes                  | no                     |
| <a href="#">1</a>     | 2    | 138 | 7     | del 29            | Stop 39   | 138del29            |           |              |       | F             | *               | yes                  | no                     |
| <a href="#">1</a>     | 2    | 151 | 11    | ins C             | Stop 16   | 151insC             |           |              |       | F             | *               | yes                  | no                     |
| <a href="#">1</a>     | 2    | 156 | 13    | del AATG          | Stop 21   | 156del4             |           |              |       | F             | *               | yes                  | no                     |
| <a href="#">1</a>     | -    | 180 | 21    | delA              | Stop 22   | 180 delA            |           |              |       | F             | *               | unknown              | no                     |
| <a href="#">1</a>     | 2    | 183 | 22    | del T             | Stop 39   | 183delT             |           |              |       | F             | *               | yes                  | no                     |
| <a href="#">1</a>     | 2    | 184 | 22    | ins TT            | Stop 23   | 184insTT            |           |              |       | F             | *               | yes                  | no                     |
| <a href="#">1983</a>  | 2    | 185 | 23    | del AG            | Stop 39   | 185delAG            |           |              |       | F             | *               | yes                  | no                     |
| <a href="#">3</a>     | -    | 185 | 23    | delAG             | Stop 39   | 187 delAG           |           |              |       | F             | *               | Yes                  | no                     |
| <a href="#">29</a>    | 2    | 185 | 22    | ins A             | Stop 40   | 185insA             |           |              |       | F             | *               | yes                  | no                     |
| <a href="#">1</a>     | -    | 185 | 23    | insA              | Stop 40   | 185 insA            |           |              |       | F             | *               | Yes                  | no                     |
|                       |      |     |       | delAG             | Stop 39   | 185delAG            |           |              |       | F             | *               | Yes                  | no                     |

ragen der Daten von research.nhgri.nih.gov...

Abb. 3: BIC Breast Cancer Information Core, repräsentativer Screenshot [19]

Einschluss Familie (FAM)

Einschluss Familie (FAM)

Neues Mitglied

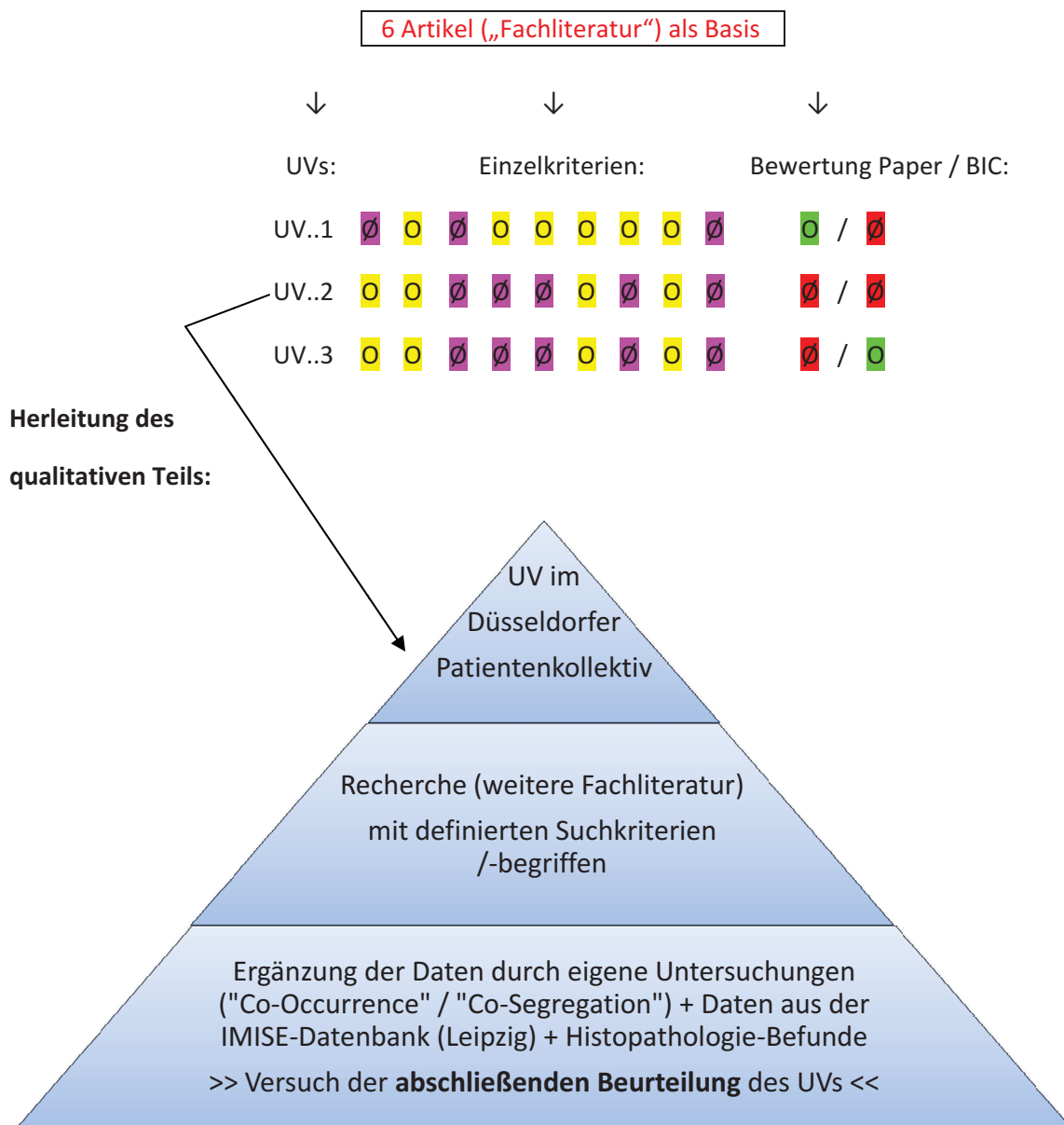
Stammbaum

| Mitglied (Mitglieds-Nr.)            |                          |     |     |     | Geschlecht | leibliche Eltern (Mitglieds-Nr.)                                                                                                              |                                                                        |                                                                        |                                                          |
|-------------------------------------|--------------------------|-----|-----|-----|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/>            | <input type="checkbox"/> | MIT | PAT | TUM |            | FRN                                                                                                                                           | Mutter                                                                 |                                                                        | Vater                                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | Ja  | Ja  | 2   | 1          | <input type="radio"/> männlich<br><input type="radio"/> weiblich<br><input type="radio"/> unbekannt<br><input type="radio"/> k. A.            | <input type="text" value="003"/><br><input type="checkbox"/> unbekannt | <input type="text" value="002"/><br><input type="checkbox"/> unbekannt | <input type="checkbox"/> keine Information zum MIT-Bogen |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | Ja  |     | 0   | 0          | <input checked="" type="radio"/> männlich<br><input type="radio"/> weiblich<br><input type="radio"/> unbekannt<br><input type="radio"/> k. A. | <input type="text" value="005"/><br><input type="checkbox"/> unbekannt | <input type="text" value="004"/><br><input type="checkbox"/> unbekannt | <input type="checkbox"/> keine Information zum MIT-Bogen |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | Ja  |     | 2   | 0          | <input type="radio"/> männlich<br><input checked="" type="radio"/> weiblich<br><input type="radio"/> unbekannt<br><input type="radio"/> k. A. | <input type="text" value="007"/><br><input type="checkbox"/> unbekannt | <input type="text" value="006"/><br><input type="checkbox"/> unbekannt | <input type="checkbox"/> keine Information zum MIT-Bogen |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | Ja  |     | 0   | 0          | <input checked="" type="radio"/> männlich<br><input type="radio"/> weiblich<br><input type="radio"/> unbekannt<br><input type="radio"/> k. A. | <input type="text"/><br><input checked="" type="checkbox"/> unbekannt  | <input type="text"/><br><input checked="" type="checkbox"/> unbekannt  | <input type="checkbox"/> keine Information zum MIT-Bogen |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | Ja  |     | 0   | 0          | <input type="radio"/> männlich<br><input checked="" type="radio"/> weiblich<br><input type="radio"/> unbekannt<br><input type="radio"/> k. A. | <input type="text"/><br><input checked="" type="checkbox"/> unbekannt  | <input type="text"/><br><input checked="" type="checkbox"/> unbekannt  | <input type="checkbox"/> keine Information zum MIT-Bogen |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | Ja  |     | 1   | 0          | <input type="radio"/> männlich<br><input checked="" type="radio"/> weiblich<br><input type="radio"/> unbekannt<br><input type="radio"/> k. A. | <input type="text"/><br><input checked="" type="checkbox"/> unbekannt  | <input type="text"/><br><input checked="" type="checkbox"/> unbekannt  | <input type="checkbox"/> keine Information zum MIT-Bogen |

Abb. 4: Dokumentation in BRCA 2006, IMISE Leipzig, repräsentativer Screenshot [32]

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich aus dieser systematischen, zielgerichteten Suche nach Materialien eine umfassende und detaillierte Datenlage erschloss, die, sofern möglich, durch selbst durchgeführte Untersuchungen im Forschungslabor der Frauenklinik ergänzt bzw. vervollständigt werden konnte (zur Darstellung der Vorgehensweise s. Abb. 5).

## Quantitativer Teil:



**Abb. 5: Schematische Darstellung der Vorgehensweise bei der Bearbeitung des quantitativen und des qualitativen Teils der Arbeit**

Die Auswahl der im Rahmen dieser Arbeit zu untersuchenden UVs beruhte zum einen auf möglichst zahlreicher Nachweise innerhalb des Düsseldorfer Patientinnenkollektivs, zum anderen stellte eine hinreichend große Zahl an DNA-Proben von verschiedenen Familienmitgliedern eine wesentliche Voraussetzung zur eigenständigen Durchführung von "Co-Occurrence-" und "Co-Segregationsanalysen" dar.

## 2.2 Durchführung der weiterführenden Literaturrecherche zu einzelnen UVs

Die Internet-basierte Suche nach Fachliteratur zu den einzelnen UVs erfolgte systematisch. Dazu wurden in jedem Fall die Internetseiten <http://www.pubmed.org> (24.06.2012), <http://www.google.com> (24.06.2012) sowie die “Scholarfunktion” des Internetauftritts von Google, <http://scholar.google.com/schhp?hl=de> (24.06.2012), angewendet (vgl. Seite 17).

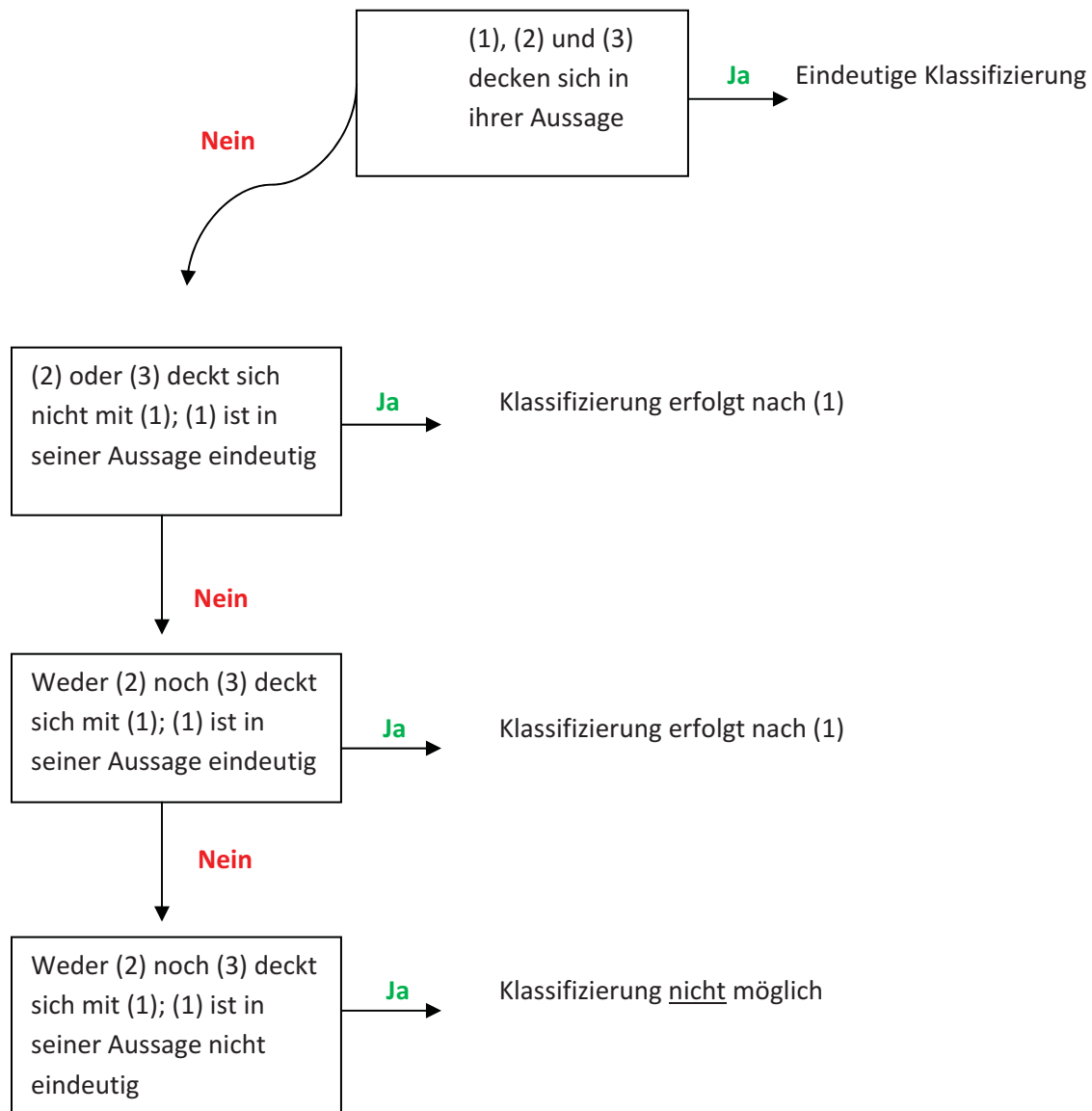
Die jeweiligen Suchbegriffe wurden nach folgendem Schema eingesetzt: nach jedem betreffenden UV wurde sowohl mit den Abkürzungen “UV” sowie “UCV” als auch mit dem Begriff “unclassified variant” gesucht. Diese drei Suchbegriffe wurden jeweils mit einem zusätzlichen Suchbegriff kombiniert, aus dem die genaue Bezeichnung der Sequenzvariante hervorgeht. Dies war zum einen die Bezeichnung der Nukleotidmutation (Beispiel: Die Eingabe erfolgte nach der Schreibweise „G5075A“), zum anderen die jeweilige Aminosäureveränderung (Beispiel: Eingabe gemäß der Schreibweise „M1652I“). Daraus ergaben sich im Regelfall für jede gesuchte Sequenzvariante 6 unterschiedliche Kombinationsmöglichkeiten von Suchbegriffen, die für jede einzelne der insgesamt 3 Datenbanken bzw. Suchmaschinen in Frage kamen.

Eine Besonderheit, die es bei der Verwendung der o.g. Form der Bezeichnung von Nukleotidmutationen zu beachten galt, war der Umstand einer parallel zu dieser Arbeit durch die Human Genome Organisation (HUGO) entwickelten neuen Nomenklatur für Gensequenzen (HGVS). Da in denjenigen Artikeln, die der Erfassung von mehr als 500 UVs dienten („Basisliteratur“), überwiegend noch diejenige Bezeichnung verwendet wurde, die vor der Einführung der neuen Nomenklatur allgemein anerkannt wurde, wurde die Nutzung dieser Nomenklatur auch bei der weiterführenden Internetrecherche fortgesetzt.

## 2.3 Bewertungsschema für UVs

Aufgrund der Vielzahl verschiedener Klassifizierungsmethoden sowie daraus resultierender einzelner Untersuchungsergebnisse galt es eine einheitliche Bewertungsstrategie zu entwickeln, welche die jeweiligen Einzelergebnisse in Relation zueinander setzen würde. Die vorgenommenen Klassifizierungen der Sequenzvarianten erfolgten systematisch nach folgendem dafür konzipierten Schema (s. Abb. 6):

- (1) “Co-Occurrence“ / “Co-Segregationsanalysen“ (höchste Wertigkeit) – sowohl eigene als auch fremde Untersuchungen (Vergleichbarkeit gegeben)
- (2) Bewertung durch andere Klassifikationskriterien (unter Berücksichtigung der Qualität der jeweiligen Studie → individuelle Gewichtung der Studien wie im Diskussionsteil beschrieben)
- (3) Histopathologie-Befunde



**Abb. 6: Entwicklung einer eigenen Bewertungsstrategie für UVs**

## 2.4 Weitere Methoden zur Klassifizierung von “unclassified variants”

Im Folgenden werden Klassifikationskriterien erläutert, welche sowohl in der verwendeten Fachliteratur als auch im Rahmen eigener Untersuchungen eingesetzt wurden:

#### 2.4.1 “Co-Occurrence”-Analysen

Ein weiterer Ansatz zur Klassifikation von UVs ist die Analyse der “Co-Occurrence”. Darunter wird das gemeinsame Auftreten einer pathogenen Mutation und einer Variante unbekannten Krankheitswertes in *trans*-Position auf den beiden Allelen verstanden. Wie Brodie und Deng [36] im Jahr 2001 für BRCA zeigen konnten, spricht die parallele Existenz einer eindeutig pathogenen Mutation und eines UV gegen die Pathogenität des UV. Die Begründung ist, dass sowohl eine homozygote Schädigung von BRCA1 / BRCA2 als auch das Auftreten einer “compound”-Heterozygotie von zwei pathogenen Mutationen, d.h. verschiedenartiger Allelmutationen am gleichen Genlocus letal ist [25]. Um davon ausgehen zu können, dass es sich dabei tatsächlich um Mutationen auf verschiedenen Allelen handelt, muss initial nachgewiesen werden, dass beide Varianten auch unabhängig voneinander vererbt werden, also nicht gekoppelt an die Nachfahren weitergegeben werden. Das ist der Grund, weshalb die Mutation mit fraglicher Pathogenität und die pathogene Mutation auch voneinander getrennt in der jeweiligen Familie nachgewiesen werden müssen. Ist das möglich, und wird somit das Vorkommen beider Varianten auf verschiedenen Allelen bei derselben Person nachgewiesen, so ist in einem solchen Fall nicht von einem pathogenen Charakter der “unclassified variant”-Mutation auszugehen. Kann jedoch im Gegensatz dazu keine voneinander unabhängige Vererbung der Mutationen gezeigt werden, so ist eine Lokalisation auf dem gleichen Allel vorstellbar und die Aussage zu einer möglichen “Co-Occurrence” der Variante und der pathogenen Mutation in *trans*-Stellung nicht möglich.

Die “Co-Occurrence” Analyse wird als sogenanntes „hartes Kriterium“ allgemein anerkannt und führt bei der Analyse ausreichend großer Fallzahlen zu signifikanten Ergebnissen [25; 33]. Somit bot es sich an, die “Co-Occurrence”-Untersuchungen als ein für diese Arbeit geeignetes und selbst anzuwendendes Klassifikationsverfahren auszuwählen.

#### 2.4.2 “Co-Segregationsanalysen”

Unter “Co-Segregationsanalysen” wird das Verfahren verstanden, anhand von molekulargenetischen Untersuchungen und Stammbaumanalysen zu ermitteln, inwieweit eine Mutation und eine Erkrankung des jeweiligen Mutationsträgers miteinander einhergehen. Um dies beurteilen zu können, ist es notwendig, dass weitere Familienmitglieder, insbesondere auch Erkrankte, auf die Mutation hin getestet werden, um Mutations- und Erkrankungsstatus korrelieren zu können.

#### 2.4.3 Histopathologische und immunhistochemische Befunde

Um klinische Daten zu den UVs beizusteuern, wurden nicht nur die in der Literatur aufgeführten histopathologischen und immunhistochemischen Befunde zusammengeführt, sondern, wenn möglich, auch vergleichbare Daten aus den Patientenakten des hiesigen Brustzentrums zu den UVs ausgewertet (s. Tabelle 4). Damit sollten zwei verschiedene Aspekte abgeklärt werden: zum einen sollte diese Form der Recherche klären, inwieweit zum heutigen Zeitpunkt eine verwertbare Datenlage existiert bzw. verfügbar ist. Zum anderen sollten eben diese Informationen im Falle einer umfangreichen Datensammlung für die eigenständige Bewertung von UVs herangezogen und dadurch ein Vergleich mit Daten aus histopathologischen Befunden aus den angeführten Studien ermöglicht werden.

Diese beiden Ziele verfolgend musste vor dem Beginn der eigentlichen Recherche definiert werden, welche der histopathologischen und immunhistochemischen Daten in die Bewertung einfließen sollten. Im Wesentlichen dienten hier die Angaben von Chappuis et al. [30] und Fasching et al. [31] als Basis für die in Tabelle 4 vorgenommene Einteilung der für pathogene BRCA1-Mutationen typischen Merkmale. Diese umfassen neben Angaben zu medullärem oder atypischem, medullärem Wachstum auch Daten bezüglich des Vorhandenseins eines *in-situ* Karzinoms (CIS), bei dem definitionsgemäß die Basalmembran noch nicht durchbrochen ist. Außerdem wurden Grading, Pleomorphie, Daten zur Tubulusformation, Anzahl der Mitosen, Beurteilung der Randbegrenzung, Lymphozyteninfiltrationen, Anteile soliden Wachstums des Tumors, Vorkommen von Nekrosen sowie Ergebnisse immunhistochemischer Untersuchungen wie z.B. Hormonrezeptor-, Her2- und p53-Status erfasst.

| 1  | Familie | Familienmitglied | Histopathologie (BRCA1-like) | CIS (-)                  | Grading (+)                      | Nekrosen (+) | Immunhistochemie | Her2-        | p53+ |
|----|---------|------------------|------------------------------|--------------------------|----------------------------------|--------------|------------------|--------------|------|
| 2  | BRCA1   |                  | medullär /atyp. medullär (+) |                          |                                  |              | ER-              |              |      |
| 3  |         |                  |                              |                          |                                  |              |                  |              |      |
| 4  | 745     | 1                |                              |                          | G2                               |              | pos              | neg          |      |
| 5  | 726     | 3                |                              |                          | G2                               |              | pos              |              |      |
| 6  |         | 7                |                              |                          |                                  |              | neg              |              |      |
| 7  |         | 11               | neg                          | neg                      | G2                               |              | pos              |              |      |
| 8  | 723     | 1                |                              |                          | G3                               |              | neg              | neg          |      |
| 9  |         | 3                | lobulär                      |                          | G2                               |              | pos              | pos          |      |
| 10 | 706     |                  |                              |                          |                                  |              |                  |              |      |
| 11 | 761     | 34               | neg                          |                          | G2                               |              | neg              | neg          |      |
| 12 | 778     | 1                | neg                          |                          | G3                               |              |                  |              |      |
| 13 | 753     | 8                | neg                          | neg                      | G2                               |              | neg              | neg          |      |
| 14 | 444     | 1                | medullär                     | neg                      | G3                               |              | neg              | neg          |      |
| 15 | 456     | 12               |                              |                          | G3                               |              |                  |              |      |
| 16 | 345     | 1                | lobulär                      | invasiv + CLIS           | G2                               |              | pos              | pos          | neg  |
| 17 | 140     |                  | neg                          |                          | G2                               | ausgeprägt   | pos              | neg          |      |
| 18 |         |                  | medullär                     |                          | G1                               |              | pos              | pos          |      |
| 19 | 681     | 3                | neg                          | invasiv + CIS            | G3                               | Komedo       | neg              |              |      |
| 20 | 677     | 1                | li: invasiv lobulär          | inv.+CLIS (li), neg (re) | G2 (li/re)                       |              | pos              | neg          |      |
| 21 |         | 4                | lobulär                      | neg                      | G2                               |              | pos              |              |      |
| 22 | 645     | 3                | neg                          | neg                      | G2                               |              | pos              |              |      |
| 23 |         | 15               | neg                          | DCIS                     |                                  | ohne         | pos              |              |      |
| 24 |         | 45               |                              | invasiv + DCIS           | G3                               |              | pos              |              |      |
| 25 | 591     | 1                |                              | invasiv + DCIS           | G2                               |              | neg              | neg          | neg  |
| 26 | 577     |                  |                              |                          |                                  |              |                  |              |      |
| 27 | 574     | 1                |                              | DCIS                     |                                  |              | pos              |              |      |
| 28 | 570     | 1                | neg                          | li: invasiv + DCIS       | G1 (re) G2 (li) zentral / Komedo |              | neg              | pos, li. neg | pos  |
| 29 |         | 3                | neg                          | neg                      | G2                               |              | neg              | neg          |      |
| 30 | 569     | 9                | neg                          | neg                      | G3                               |              | pos              | pos          |      |
| 31 |         | 10               | neg                          | neg                      | G3                               |              | neg              | pos          |      |
| 32 | 559     | 1                | invasiv lobulär              | invasiv +DCIS +CLIS      | G2, G1(Cis)                      |              |                  |              |      |
| 33 | 546     | 1                | lobulär                      |                          | G2                               |              | pos              | pos          |      |
| 34 | 534     |                  |                              |                          |                                  |              |                  |              |      |
| 35 | 518     | 15               | neg                          | invasiv +CIS             | G2                               |              | pos              | pos          |      |
| 36 | 487     | 2                | neg                          | neg                      | G2                               |              | pos              | neg          |      |

Tabelle 4: Exemplarische Darstellung histopathologischer und immunhistochemischer Befunde, repräsentativer Screenshot

## 2.5 Stammbaumerstellung

Zentrale Bestandteile des genetischen Beratungsgesprächs sind die Erhebung der Familienanamnese und die Erstellung eines Stammbaumes. Dieser dient der Erfassung aller relevanten Familienmitglieder sowie der graphischen Darstellung ihrer Verwandtschaftsgrade zueinander. Das Geschlecht und der Erkrankungsstatus werden mit unterschiedlichen Symbolen kodiert. Außer den Geburts- bzw. Sterbedaten der einbezogenen Personen wird im Falle einer Tumorerkrankung das Alter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung erfasst, ebenso wie nähere Angaben zum Tumor selbst (z.B. Tumorentität, uni-/bilaterales Auftreten, Lokalisation).

In dieser Arbeit wurde das in der Düsseldorfer Frauenklinik dafür verwendete Softwareprogramm Cyrillic 2.1 (Firma: Cyrillic Software), welches ein spezielles "Breast Cancer module" aufweist, eingesetzt. Dieses Modul umfasst einen Datensatz, der auf dem Claus'schen Modell basierend und von populationsbasierten Datenmengen gestützt Risikoberechnungen speziell für hereditäre Mammakarzinome erlaubt.

## 2.6 Das Kollektiv

Das Kollektiv an Familien mit UVs aus der Düsseldorfer Tumorrisikosprechstunde umfasst 222 Familien mit BRCA1-UVs und 153 Familien mit BRCA2-UVs. Diese Anzahl rekrutiert sich aus Konsultationen seit Beginn der Sprechstunde im Jahr 2002 bis zum Frühjahr 2011.

## 2.7 Durchführung und Interpretation von Mutationsanalysen

### 2.7.1 Isolierung von DNA aus Lymphozyten für Mutationsanalysen

In einem ersten Schritt wurden 2ml EDTA-Blut mit 200 µl QIAGEN-Protease (Fa. Qiagen) sowie 2,4ml AL-Lysepuffer versetzt, um danach bei 70°C für 10 min. inkubiert zu werden. Nach Hinzufügen von 2ml Ethanol wurden 3,3ml von dem Lysat auf die QiAamp Midi Säule (Fa. Qiagen) aufgetragen und zentrifugiert (3 min, 3100 rpm). Nach Verwerfung des Durchbruchs wurde das verbleibende Lysat auf die Säule gegeben und ein weiteres Mal zentrifugiert (3 min, 3100 rpm). Danach wurde die DNA mit je 2ml zweier Waschpuffer sowie mithilfe von Zentrifugation (1 min, 4000 rpm sowie 15 min, 4000 rpm, Centrifuge

5417, Fa. Eppendorf) gewaschen. Nach Einsetzen der Säule in ein neues Röhrchen wurden 300 µl AE-Elutionspuffer auf die Membran pipettiert und nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur zentrifugiert (40000 rpm, 5 min). Dieses Eluat wurde danach ein weiteres Mal auf die Membran aufgetragen und erneut 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert, abzentrifugiert und schließlich die Konzentration photometrisch ermittelt.

Es wurden 3ml EDTA-Vollblut in ein Falcon-Röhrchen gefüllt, die mit 9ml Erythrozyten-lysierendem Puffer versetzt und gemischt wurden. Es folgte eine 10-minütige Inkubation auf Eis. Danach wurde bei 4°C, 1000 rpm für 10 min. abzentrifugiert. Der Überstand mit lysierten Erythrozyten wurde entfernt und das Lymphozytenpellet mit 1ml PBS gewaschen. Danach wurde dieses in ein Eppendorf-Cup (Fa. Eppendorf) gefüllt und zentrifugiert (4°C, 10 min, 10000 rpm). Nach Entfernung des Überstandes wurden die Lymphozyten mit PBS auf 3ml aufgefüllt und es folgte eine wie oben beschriebene DNA-Isolierung mit dem Lymphozyten-PBS-Material anstelle der 2ml EDTA-Blut.

### 2.7.2 PCR

Die PCR dient der spezifischen Amplifikation definierter DNA-Abschnitte um ausreichende Mengen dieser DNA-Fragmente für die weitere Analytik mittels DHPLC ("Denaturing High-Pressure Liquid Chromatography") bzw. direkter Sequenzierung zur Verfügung zu haben. Das der Vervielfältigung von DNA zugrunde liegende Prinzip ist das der zyklischen Temperaturveränderung, um zunächst die DNA-Doppelstränge in Einzelstränge aufzuschmelzen, "Primer" zu hybridisieren und mittels thermostabiler DNA-Polymerase DNA zu synthetisieren. Diese sich wiederholende, kontinuierliche Temperaturabfolge besteht im einzelnen aus der Denaturierungsphase (92°C), der "Annealing"-Phase (40-65°C), während der sich die "Primer" den DNA-Strängen anlagern können, sowie der Phase der "Primer"-Extension. Letztere wird bei 72°C durchgeführt, da dies das Temperaturoptimum der verwendeten Taq-Polymerase darstellt. Die Durchführung der PCR erfolgte wie beschrieben: die verschiedenen Ansätze umfassten ein Volumen von jeweils 50 µl. Sie setzten sich zusammen aus 50 ng zu amplifizierender DNA, 1 x PCR Reaktionspuffer (Fa. Pharmacia), jeweils 125 µM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP und dTTP, Fa. Boehringer Mannheim), "forward- und reverse-Primer" (Fa. Metabion) sowie Taq Polymerase (aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*). Dabei handelt es sich um eine "High Fidelity" Taq-Polymerase (Fa. Roche), sofern das DNA-Material im Anschluss einer DHPLC zugeführt werden soll. Als Geräte dienten Thermocycler (Fa. Biometra) mit beheizbarem Deckel.

Die DNA-Abschnitte von BRCA1 und BRCA2 wurden exonspezifisch amplifiziert, wobei BRCA1 Exon 11 aufgrund der Größe in 13 sich überlappenden Fragmente amplifiziert wurde. Dies war aufgrund der enormen Größe dieses Exons erforderlich. Für BRCA2 wurden insgesamt 42 verschiedene Fragmente amplifiziert, wobei die beiden Exons 14 und 27 in jeweils zwei, das Exon 10 in drei und das Exon 11 in insgesamt 14 sich überlappende Fragmente untergliedert waren. [11].

Nach erfolgreicher Amplifizierung wurden die entstandenen Fragmente weitere 3 Minuten lang bei einer Temperatur von 95°C denaturiert; nachfolgend wurde die Temperatur über einen Zeitraum von 30 Minuten um 1°C pro Minute auf schließlich 65°C verringert, um eine Renaturierung zu erzielen.

In den Tabellen 5 und 6 werden verwendete Primersequenzen dargestellt.

| Exon | 5'Primer                | 3'Primer               | Länge (bp) |
|------|-------------------------|------------------------|------------|
| 2    | AGGACGTTGTCATTAGTTCTTTG | AAGGTCAATTCTGTTCAATTGC | 319        |
| 3    | CAGTTCCTGACACAGCAGACA   | TTCCTGGGTTATGAAGGACAAA | 286        |
| 5    | GCTTGTAATTCACCTGCCAT    | TTCCTACTGTGGTTGCTTCC   | 269        |
| 6    | AGGTTTTCTACTGTTGCTGCAT  | AAAAGGTCTTATCACCACGTCA | 306        |
| 7    | GGGTTTCTCTTGGTTTCTTTG   | GGAGGACTGCTTCTAGCCTG   | 329        |
| 8    | AGCTGACTGATGATGGTCAA    | AAATTCAC TTCCCAAAGCTG  | 338        |
| 9    | TGCCACAGTAGATGCTCAGT    | CACATACATCCCTGAACCTAAA | 300        |
| 10   | TTGGTCAGCTTTCTGTAATCG   | CCATACCACGACATTTGACA   | 346        |
| 11A  | TAGCCAGTTGGTTGATTTCC    | CCCATCTGTTATGTTGGCTC   | 394        |
| 11B  | CCATGTGGCACAATACTCA     | TGATTCAGACTCCCCATCAT   | 399        |
| 11C  | GAAACTGCCATGCTCAGAGA    | ATTTATTTGTGAGGGGACGC   | 437        |
| 11D  | TCCCCAACTTAAGCCATGTA    | AGAAGACTTCCTCCTCAGCC   | 437        |
| 11E  | TTCAAAACGAAAGCTGAACC    | TTGGAAGGCTAGGATTGACA   | 445        |
| 11F  | GGTAAAGAACCTGCAACTGG    | TCAAATGCTGCACACTGACT   | 416        |
| 11G  | GAAAGGGTTTTGCAAACTGA    | TTCCTCTTCTGCATTTCTG    | 381        |
| 11H  | TGAACTTGATGCTCAGTATTTGC | AGTCCAGTTTCGTTGCCTCT   | 345        |

| Exon | 5'Primer                  | 3'Primer                  | Länge (bp) |
|------|---------------------------|---------------------------|------------|
| 11I  | TAAGCCAGTTGATAATGCCA      | TTTTGGCCCTCTGTTTCTAC      | 430        |
| 11J  | ACTAATGAAGTGGGCTCCAG      | CAGGTCATCAGGTGTCTCAG      | 309        |
| 11K  | TTCCTGGAAGTAATTGTAAGCA    | TAACCCTGAGCCAAATGTGTAT    | 313        |
| 11L  | GACATTAAGGAAAGTTCTGCTG    | TTTGCCAATATTACCTGGTTAC    | 329        |
| 11M  | ACCGTTGCTACCGAGTGTCT      | GTGCTCCCCAAAAGCATAAA      | 438        |
| 12   | GTCCCAAAGCAAGGAATTTA      | TCAAAGAGATGATGTCAGCAA     | 327        |
| 13   | GGTGATTTCAATTCCTGTGC      | AAATGTTGGAGCTAGGTCCTTAC   | 373        |
| 14   | TGTGTATCATAGATTGATGCTTTTG | GCAATAAAAGTGTATAAATGCCTGT | 361        |
| 15   | CAAGTATGATTTGTCCTTTAC     | AAACCTTGATTAACACTTGAGC    | 422        |
| 16   | CACTGTATTCATGTACCCATTT    | CACAGAACTGTGATTGTTTTCT    | 564        |
| 17   | TAGTATTCTGAGCTGTGTGCTAG   | CAAAGTGCTGCGATTACAGG      | 245        |
| 18   | AGTGGTGTTCAGCCTCTG        | CTGAGGTGTTAAAGGGAGGAG     | 283        |
| 19   | TTAAAGGGCTGTGGCTTTAG      | AAGGAAAGTGGTGCATTGAT      | 279        |
| 20   | TGCTAGGATTACAGGGGTGAG     | CCTGTGTGAAAGTATCTAGCACTG  | 346        |
| 21   | CAGGTGGTGAACAGAAGAAA      | ACATTTTCAGCAATCTGAGGA     | 298        |
| 22   | CATCCGGAGAGTGTAGGGTA      | CATCCATAGGGACTGACAGG      | 240        |
| 23   | CCCTGTCTCAAAAACAAACA      | CAAGCACCAGGTAATGAGTG      | 234        |
| 24   | TGGAGTCGATTGATTAGAGC      | AGCCAGGACAGTAGAAGGAC      | 311        |

**Tabelle 5 : Primer zur BRCA1-Amplifikation für die Analyse mittels DHPLC**

| Exon  | 5'Primer               | 3'Primer               | Länge (bp) |
|-------|------------------------|------------------------|------------|
| 2     | TGTTCCCATCCTCACAGTAAG  | GTA CTGGGTTTTAGCAAGCA  | 336        |
| 3     | AACTGTTCTGGGTCACAAAT   | AGAGGCCAGAGAGACTGATT   | 439        |
| 4     | AACACTTCCAAAGAATGCAA   | TACCAGGCTCTTAGCCAAA    | 292        |
| 5 + 6 | TGGCATTTTAAACATCACTTG  | CTCAGGGCAAAGGTATAACG   | 450        |
| 7     | AGCATTCTGCCTCATACAGG   | TCAACCTCATCTGCTCTTTCTT | 284        |
| 8     | TCACTGTGTTGATTGACCTTTC | GGCATTCCAAAATTGTTAGC   | 278        |

| Exon | 5'Primer                    | 3'Primer                       | Länge<br>(bp) |
|------|-----------------------------|--------------------------------|---------------|
| 9    | AAGTGAAACCATGGATAAGG        | CAA CAA AAA AAC CTG TAG TTC    | 238           |
| 10.1 | TAGAAGAACAGGAGAAGGGG        | TCATTTGGTTCCACTTCAGA           | 480           |
| 10.2 | GCAAACGCTGATGAATGTG         | GAAATGAAGAAGCCACTGGA           | 490           |
| 10.3 | AGCAGCATCTTGAATCTCAT        | CAA AAA AAA AAA GAC AGA GGT AC | 521           |
| 11A  | GTGAAAAATATTTAGTGAATGTGATTG | GCAGCCAAGACCTCTTCTTTT          | 365           |
| 11B  | CCCCAGAAGCTGATTCTCTGT       | TTTCAGGTGGCAACAGCTC            | 405           |
| 11C  | TCCCATGGAAAAGAATCAAG        | CCTCTGCAAGAACATAAACCA          | 422           |
| 11D  | CGAACCCATTTTCAAGAACT        | GGCTTGCTCAGTTTCTTTTG           | 432           |
| 11E  | GGAAATCAAGCTCTCTGAACA       | ATTGCTTGCTGCTGTCTACC           | 500           |
| 11F  | AAGTGCCTGAAAACCAGATG        | CAACAAAAGTGCCAGTAGTCA          | 492           |
| 11G  | GTCATGATTCTGTTGTTTCA        | GACTCTTTGGCGACACTAAT           | 532           |
| 11H  | TGCTACTAAAACGGAGCAAA        | GGTCTTTACAGGCCTCTCTG           | 497           |
| 11i  | GGAATCTTTGGACAAAGTGA        | GGTTGACCATCAAATATTCC           | 498           |
| 11j  | TCAGTCCCCTTATTAGTCA         | TGCAGGGTGAAGAGCTAGT            | 491           |
| 11K  | CTTGATTCTGGTATTGAGC         | CACTCTGAATGTCAGCAAAA           | 479           |
| 11L  | ATTATGGCAGGTTGTTACGA        | TCCAGAGAAAGCAGATGAAT           | 507           |
| 11M  | ATTCAGACCAGCTCACAAGA        | AGGTGAAGCCTGTTCTTTTC           | 500           |
| 11N  | TGTTGAAGGTGGTTCTTCAG        | TTT AAA AAT AGT GAT TGG CAA C  | 478           |
| 12   | TGTGGTATCTGGTAGCATCTG       | CACAGTGGCTCATGTCTGTA           | 500           |
| 13   | GTGAGTTATTTGGTGCATAGTC      | CGAGACTTTTCTCATACTGTATTAG      | 317           |
| 14.1 | GGCTAGCCTTGAAAAATGTG        | AAAGACTTTGGTTGGTCTGC           | 382           |
| 14.2 | GCAATTTAGCAGTTTCAGGAC       | GGGCTTTAAAATTACCACCA           | 428           |
| 15   | GGCCAGGGGTTGTGCTTTTT        | CTC TGT CAT AAA AGC CAT CAG    | 284           |
| 16   | GCAGACTGTGGAATGTATGG        | AGAAAGAGGGATGAGGGAAT           | 468           |
| 17   | CAGAGAATAGTTGTAGTTGTTGAA    | AGAAACCTTAACCATACTGC           | 305           |
| 18   | TCAGTGACTTGTTTAAACAGTG      | CATCTAAGAAATTGAGCATCC          | 537           |
| 19   | AAGGCAGTTCTAGAAGAATGAAA     | CAAGAGACCGAAACTCCATC           | 342           |
| 20   | GGTGATCCACTAATCTCAGC        | TGTCCCTTGTTGCTATTCTT           | 452           |

| Exon | 5'Primer                   | 3'Primer                   | Länge (bp) |
|------|----------------------------|----------------------------|------------|
| 21   | CTTTGGGTGTTTTATGCTTG       | CATACTCCTTCCTGTGATGG       | 300        |
| 22   | AGTTACAATAGATGGAACCTTTTTTG | AGTGGATTTTGCTTCTCTGA       | 387        |
| 23   | CCACTACTAATGCCCACAAA       | CAAGCACTTATCAAACTGAAA      | 324        |
| 24   | ACCGGTACAAACCTTTCATT       | AATTTGCCAACTGGTAGCTC       | 334        |
| 25   | AGCACTGTAAGCAACAGGTC       | TACCAAAATGTGTGGTGATG       | 463        |
| 26   | GGTCCCAAACCTTTTCATTTTC     | AGAATATACGATGGCCTCCA       | 310        |
| 27.1 | CTGTGTGTAATATTTGCGTGCT     | TCAATGCAAGTTCTTCGTCA       | 500        |
| 27.2 | CCAAATACGAAACACCCATA       | TGG AAA GGT TAA GCG TCA AT | 386        |

**Tabelle 6 : Primer zur BRCA2-Amplifikation für die Analyse mittels DHPLC**

### 2.7.3 DHPLC

Die DHPLC (“denaturing high-performance liquid chromatography“) ist ein etabliertes Verfahren zur Mutationsanalyse. Als Vorscreeningmethode hat sie sich insbesondere durch ihre schnelle und im Vergleich zur direkten Sequenzierung auch deutlich kostengünstigere Arbeitsweise bewährt [37], was sie insbesondere für die Untersuchung größerer Gene interessant macht.

Aufbau und Prinzip dieser Methode werden im Folgenden am Beispiel des “Wave Systems” der Firma Transgenomic dargestellt. Das Wave System besteht aus einer Hochdruckpumpe, die die flüssige Phase des Systems, bestehend aus zwei Puffern A und B, im gewünschten Verhältnis über eine Chromatographiesäule pumpt. Die zu analysierenden Proben wurden in einer “Autosampler”-Einheit im Microtiter-Platten Format (8 x 12 Reaktionsgefäße) vorgelegt. Durch das darin enthaltene Kühlaggregat wurde gewährleistet, dass die Proben die gewünschte Temperatur hatten. Die Injektion der Proben erfolgte automatisch. Reihenfolge und Analysebedingungen der Injektionen wurden im Programm D-7000 HSM festgelegt. Die Chromatographiesäule selbst befindet sich in einer Ofen-Einheit. Die Proben wurden in einer der Säule vorgeschalteten Temperierungs-Spirale auf die gewünschte Analysetemperatur erhitzt. Die von der Säule eluierten DNA-Fragmente wurden über einen UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 260nm detektiert. Das Trennprinzip der DHPLC besteht aus zwei verschiedenen Komponenten. Zunächst kann über die “ion-pair reversed-phase”-

Chromatographie die Trennung doppelsträngiger DNA Moleküle (dsDNA) zwischen 100 und 1500 bp in Abhängigkeit von ihrer Länge erzielt werden. Kernstück dieser Chromatographie ist eine Säule, deren Matrix aus 2.1 +/- 0.12 µm großen, mit Divinylbenzol vernetzten Polystyrol-Partikeln besteht. Diese stationäre Phase ist elektrisch neutral, jedoch hydrophob. Die flüssige Phase des Systems wird von zwei Puffern A und B gebildet, die unterschiedliche Konzentrationen eines amphiphilen Ions (Triethylammoniumacetat, TEAA) und eines hydrophilen Gegenions (Acetonitril) besitzen. TEAA dient dabei als Brückenmolekül zwischen dem hydrophoben Säulenmaterial und den negativ geladenen DNA Fragmenten. Über die positiv geladenen Ammoniumionen bindet TEAA an das negativ geladene Phosphatrückgrat der DNA Moleküle. Über die Alkylketten findet die hydrophobe Interaktion und damit die Bindung der DNA an die Säulenmatrix statt. Die Ladungsdichte an der Oberfläche der dsDNA (Oberflächenpotential) ist konstant. Mit zunehmender Länge der dsDNA nimmt jedoch die Größe der Kontaktfläche zu, d. h. die Bindung wird fester. Mit steigender Konzentration von Acetonitril im Elutionspuffer werden die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen TEAA und der Säulenmatrix reduziert und die DNA wird eluiert. Die Retentionszeit steigt dabei linear zur Größe des DNA Fragments. Ein zweites Trennprinzip dsDNA Moleküle kann über die Kontrolle der Ofen-Temperatur erzielt werden. Bei Temperaturen über 50°C kann auf diese Weise eine sequenzabhängige Trennung erreicht werden. In Abhängigkeit von der Basensequenz ändert sich bei steigender Temperatur das Schmelzverhalten verschiedener DNA-Fragmente. Auf Grund der erhöhten Flexibilität des Einzelstrang- Anteils (ssDNA) wird die Interaktion zwischen DNA und Säulenmatrix reduziert und es kommt zu einer vorzeitigen Elution. Im Fall einer heterozygoten Mutation werden nach Denaturierung und Renaturierung neben den beiden Homoduplices auch die beiden Heteroduplices gebildet. Diese zeigen wegen ihrer unterschiedlichen Basensequenzen unterschiedliche Schmelzverhalten und können so voneinander getrennt werden [11].

Für die DHPLC-Analyse werden benötigt:

Material: - 2M Triethylammonium Acetat (TEAA) Buffer (Fa. Transgenomic)  
- Acetonitril (Fa. J. T. Baker)  
- Li-Chrosolv Wasser für die Chromatographie (Fa. Merck)

Puffer A: - 50 ml 2M TEAA  
- 250 µl HPLC grade Acetonitril  
- ad 1 l Li-Chrosolv Wasser

Puffer B: - 50 ml 2M TEAA  
- 250 ml HPLC grade Acetonitril

- ad 1 l Li-Chrosolv Wasser

Puffer C: - 750 ml HPLC grade Acetonitril  
- ad 1 l Li Chrosolv Wasser

Syringe (wash solution):

- 80 ml HPLC grade Acetonitril
- ad 1 l Li-Chrosolv Wasser

#### 2.7.4 Überprüfung der PCR-Produkte durch elektrophoretische Auftrennung

Um die Größe der PCR-Produkte zu überprüfen, wurden die PCR-Produkte auf 1,5%-ige Agarosegele aufgetragen. Als Längenstandard wurde eine 1kb ladder von EuroGentec aufgetragen, mit deren Hilfe die Fragmentlänge der aufgetrennten PCR-Produkte ermittelt werden konnte. Die Elektrophorese erfolgte je nach der aufzutrennenden Fragmentlänge bei einer Spannung von 100 bis 110 Volt für 45 bis 90 Minuten. Das Gel wurde nach dem Lauf in einer Ethidiumbromid-Lösung (10 µg/ml) für mindestens 30 Minuten gefärbt. Durch die Bestrahlung mit UV-Licht ( $\lambda=312$  nm) konnten die Fluoreszenz des interkalierten Agens angeregt und die DNA-Fragmente nachgewiesen werden.

#### 2.7.5 MLPA-(“Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification”)-Analysen

MLPA-Analysen stellen eine spezielle PCR-Methode dar, um abnorme Genkopien von bis zu 50 verschiedenen genomischen DNA- oder RNA-Sequenzen zu detektieren. Es können Sequenzaberrationen in Form eines einzelnen variierenden Nukleotids unterschieden werden. Im Rahmen der durchgeführten MLPA-Analysen wurde das Kit der Firma MRC Holland verwendet.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1 Allgemeine Darstellung der Ergebnisse

Eine wesentliche Voraussetzung für die Datenerhebung zur Bewertung von BRCA1- und BRCA2-UVs bestand darin, eine Systematik zu entwickeln, die eine zielgerichtete und strukturierte Suche nach Informationen ermöglichte. Hierzu wurden die zu diesem Thema publizierten Daten [10; 12; 25; 33; 34; 35] systematisch in Excel Datenblättern erfasst. Dabei wurde nicht nur die abschließende Bewertung der jeweiligen Forschungsgruppe, sondern auch die jeweiligen Ergebnisse des zugrunde liegenden Tests gewertet. Bei der Literaturrecherche waren sowohl die Angabe der Position der veränderten Aminosäure (AA = “amino acid”) als auch die nach entsprechender Nomenklatur bezeichnete DNA-Sequenzveränderung (NT = Nucleotid) Suchkriterien, welche, wie im Kapitel „Methoden und Materialien“ beschrieben, mit Hilfe der drei genannten Internetportale in Kombination mit den Begriffen “UV”, “UCV” und “unclassified variant” verwendet wurden.

Wenn möglich wurden diese Informationen durch Daten aus dem Düsseldorfer Zentrum ergänzt: Das bedeutet, dass die der betreuten Familie zugeordnete Familiennummer in die Tabelle eingefügt wurde, um den Zugriff auf klinische Befunde, Stammbäume und auch Statistiken, beispielsweise zum Verhalten der betroffenen Personen bezüglich etwaiger prophylaktischer Maßnahmen, zu ermöglichen und Bewertungen aus der Literatur mit klinischen Daten aus der Frauenklinik Düsseldorf zu vergleichen. Ergänzt wurden diese Daten durch die jeweilige Bewertung des “Breast Cancer Information Core”, einer Datenbank des internationalen “Breast Cancer Linkage Consortiums”, in der BRCA1 / BRCA2 Sequenzvarianten weltweit erfasst werden.

Im Fall von in den angeführten Studien nicht eindeutig als neutral oder pathogen zu klassifizierenden UVs blieb die Bezeichnung als UV bestehen.

Auf die in manchen Quellen verwendete Bezeichnung einer neutralen Variante als Polymorphismus, kurz „Poly“, wurde bewusst verzichtet, da dies impliziert, dass bereits das häufige Vorkommen einer Veränderung den neutralen Charakter einer Mutation zeigt.

UVs, welche häufig im Düsseldorfer Familienkollektiv nachgewiesen wurden, wurden verhältnismäßig oft in der untersuchten Literatur beschrieben. Dies zeigt, dass bei häufig

vorkommenden Sequenzvarianten die Aussicht auf eine umfassende Datenlage größer war als bei solchen mit geringerer Frequenz. Dieser Umstand spiegelt wider, dass die Häufigkeiten von Varianten im untersuchten Kollektiv denen in anderen Populationen entsprechen, da häufig vorkommende UVs mit einer vergleichsweise höheren Wahrscheinlichkeit nachgewiesen und deren Bewertung in Publikationen beschrieben werden.

### 3.2 Datenrecherche und –aufarbeitung als Grundlage für die Klassifizierung von BRCA1- / BRCA2-UVs durch das Deutsche Konsortium für hereditären Brust- und Eierstockkrebs

Auf der systematischen literaturgestützten Erfassung von UVs unter Berücksichtigung von einzelnen Bewertungskriterien sowie auf der Bewertung durch die BIC-Datenbank [19] basierend eröffnete sich ein breites Spektrum von Einzelinformationen. Im Verlauf der Bearbeitung des Themas wurde deutlich, dass eine derart detailreiche Sammlung von Einzelinformationen (Basis für die eigenständige Klassifizierung von UVs) im Zuge der Fortführung von Klassifizierungen durch das Konsortium einer systematischen Bewertung unter Verzicht auf die Berücksichtigung von Einzelbewertungen würde weichen müssen.

Auf der Grundlage der im Rahmen dieser Arbeit erfolgten systematischen Erfassung von UVs und deren Einzelbewertungen in der Fachliteratur wurde in Zusammenarbeit mit der UV-Task-Force des Dt. Konsortiums ein Bewertungs-Maßstab (“Classification Score”, CS) zur zusammenfassenden Bewertung der Datenlage entwickelt.

Dieser CS (Tabelle 7) soll eine Abschätzung ermöglichen, inwieweit die einer Klassifizierung zugrunde liegenden Informationen überzeugend sind und ob eine Klassifizierung auf der Basis einer solchen Datenlage vorgenommen werden kann.

| CS | Beschreibung                                                                                                                                   |
|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1  | übereinstimmende Aussagen der publizierten Arbeiten ( $\geq 2$ ) <b>und</b> des BIC-“reviews”                                                  |
| 2  | übereinstimmende Aussagen der publizierten Arbeiten ( $\geq 2$ ) <b>ohne</b> BIC-“review” (“no additional data”)                               |
| 3  | (nur) eine publizierte Arbeit, überzeugende Aussagekraft                                                                                       |
| 4  | widersprüchliche Literaturdaten in mindestens zwei “papers”, Bewertung erfolgt entsprechend der überzeugendsten Arbeit (als Ref.Nr. angegeben) |
| 5  | widersprüchliche Literaturdaten in mindestens zwei “papers”                                                                                    |
| 6  | eine oder mehr publizierte Arbeiten mit nicht ausreichend überzeugender Aussagekraft bzw. schwacher Datenlage                                  |
| 0  | keine auf publizierten Daten basierende Bewertung sondern von Sequenzinterpretation abgeleitet                                                 |

**Tabelle 7: Der “Classification Score”**

Der höchste erreichbare Grad an Überzeugung (CS 1) wird durch mindestens 2 sich in ihrer Aussage deckenden Arbeiten erreicht, sofern diese Aussage durch eine Evaluation (“BIC-Review”) durch das Fachgremium (“Steering Committee”) der BIC Datenbank zusätzlich gestützt wird. Im Falle des Grades CS 2 liegen übereinstimmende Aussagen von mindestens 2 publizierten, überzeugenden Arbeiten vor, ein BIC-Review steht nicht zur Verfügung. CS 3 ist durch das Vorliegen von einer einzigen publizierten Arbeit definiert, die eine hinreichend überzeugende Aussagekraft besitzt. CS 4 entspricht nicht übereinstimmenden Aussagen in mindestens 2 publizierten Arbeiten. In einem solchen Fall wird die Bewertung anhand der überzeugendsten Literaturquelle vorgenommen. Kann hingegen keine Bewertung vorgenommen werden, so entspricht dies dem Grad CS 5. Liegen eine oder mehr publizierte Arbeiten mit nur unzureichend überzeugender Aussagekraft vor, so wird CS 6 als Bewertungsmaßstab zugrunde gelegt. Sind keinerlei publizierte Daten verfügbar und wird eine Klassifizierung basierend auf der Interpretation der jeweiligen Sequenzveränderung vorgenommen, entspricht dies dem Grad CS 0.

Weitere Datenbanken, wie z.B. die europäische “Leiden Open Variation Database”, kurz LOVD [38], wenden vergleichbare Gewichtungsprinzipien für Klassifikationskriterien an.

| BRCA  | Refer<br>ences | codon | aa<br>change | effect | nucleotide<br>change | Leipziger Beschreibung              | BIC | UV_TF    | Bew.<br>Krit. | Bewertung<br>folgt Ref. |
|-------|----------------|-------|--------------|--------|----------------------|-------------------------------------|-----|----------|---------------|-------------------------|
| BRCA1 | 26             | 7     | R7C          | ms     | c.138C>T             | BRCA1 (EXON 02):<br>c.138C>T p.R7C  | UV  | neutral  | 3             | 26                      |
| BRCA1 |                | 7     | R7G          | ms     | c.138C>G             | BRCA1 (EXON 02):<br>c.138C>G p.R7G  |     | UV       | 0             |                         |
| BRCA1 | 26             | 15    | I15L         | ms     |                      | BRCA1 (EXON 02):<br>c.162A>C p.I15L | UV  | neutral  | 3             | 26                      |
| BRCA1 |                | 23    | E23Q         | ms     | c.185G>C             | BRCA1 (EXON 02):<br>c.185G>C p.E23Q |     | UV       | 0             |                         |
| BRCA1 |                | 25    | P25P         | syn    |                      | BRCA1 (EXON 02):<br>c.194C>A p.P25P |     | UV       | 0             |                         |
| BRCA1 | 26             | 31    | I31M         | ms     |                      | BRCA1 (EXON 03):<br>c.212C>G p.I31M | UV  | UV       | 3             | 26                      |
| BRCA1 |                | 38    | K38K         | syn    | c.233G>A             | BRCA1 (EXON 03):<br>c.233G>A p.K38K |     | UV       | 0             |                         |
| BRCA1 |                | 39    | C39Y         | ms     | c.235G>A             | BRCA1 (EXON 03):<br>c.235G>A p.C39Y |     | UV       | 0             |                         |
| BRCA1 |                | 44    | C44S         | ms     | c.249T>A             | BRCA1 (EXON 03):<br>c.249T>A p.C44S |     | UV       | 0             |                         |
| BRCA1 |                | 47    | C47R         | ms     |                      | BRCA1 (EXON 05):<br>c.258T>C p.C47R |     | UV       | 0             |                         |
| BRCA1 |                | 64    | C64Y         | ms     | c.310G>A             | BRCA1 (EXON 05):<br>c.310G>A p.C64Y |     | pathogen | 0             |                         |
| BRCA1 | 13; 15;<br>26  | 64    | C64G         | ms     | c.309T>G             | BRCA1 (EXON 05):<br>c.309T>G p.C64G | UV  | pathogen | 2             |                         |
| BRCA1 | 5; 26          | 67    | D67Y         | ms     | c.318G>T             | BRCA1 (EXON 05):<br>c.318G>T p.D67Y | UV  | neutral  | 2             |                         |

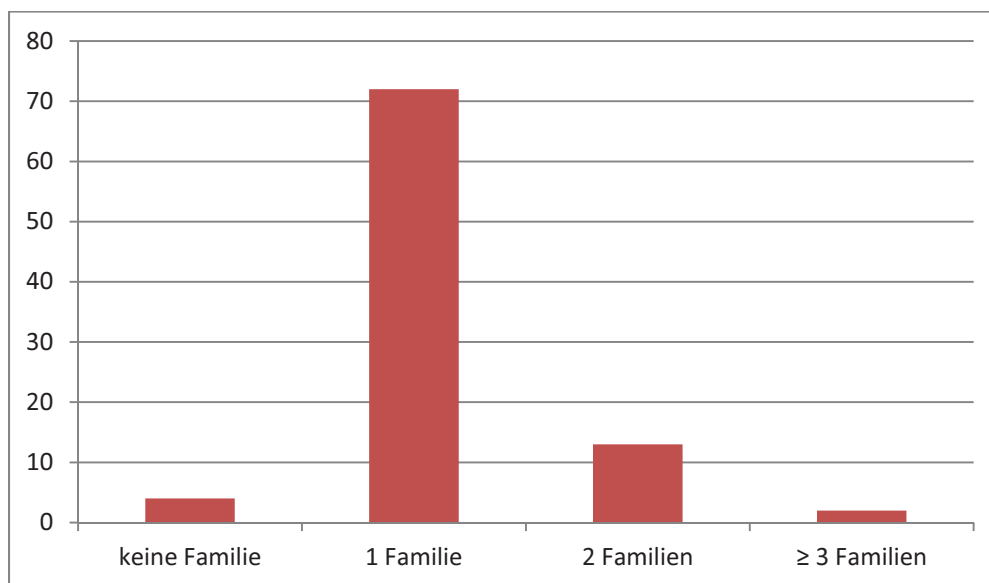
**Tabelle 8: Exemplarische Darstellung der eigenen Anwendung des Bewertungsmaßstabs**

Wie in Tabelle 8 für UVs, die im codierenden Bereich von BRCA1 lokalisiert sind, beispielhaft gezeigt wird, erfolgte eine systematische Bewertung von Sequenzvarianten, welche sowohl im codierenden als auch im nicht-codierenden Bereich von BRCA1 und BRCA2 beschrieben wurden. Die tabellarische Auflistung umfasst sämtliche relevante Informationen zu den erfassten Varianten, wie z.B. die genaue Angabe der Lokalisation und der jeweiligen Art der Mutation sowie der daraus resultierenden Nukleotid- bzw. Aminosäureveränderung. Die Häufigkeit der Sequenzvariante in den durch das Konsortium analysierten Familien, die mit Hilfe des Classification Score vorgenommene Bewertung der Datenlage aus Sicht der UV-Task-Force des Dt. Konsortiums sowie deren Klassifizierung der Sequenzvarianten sind ebenfalls dargestellt. Folgte die Klassifizierung im Fall von

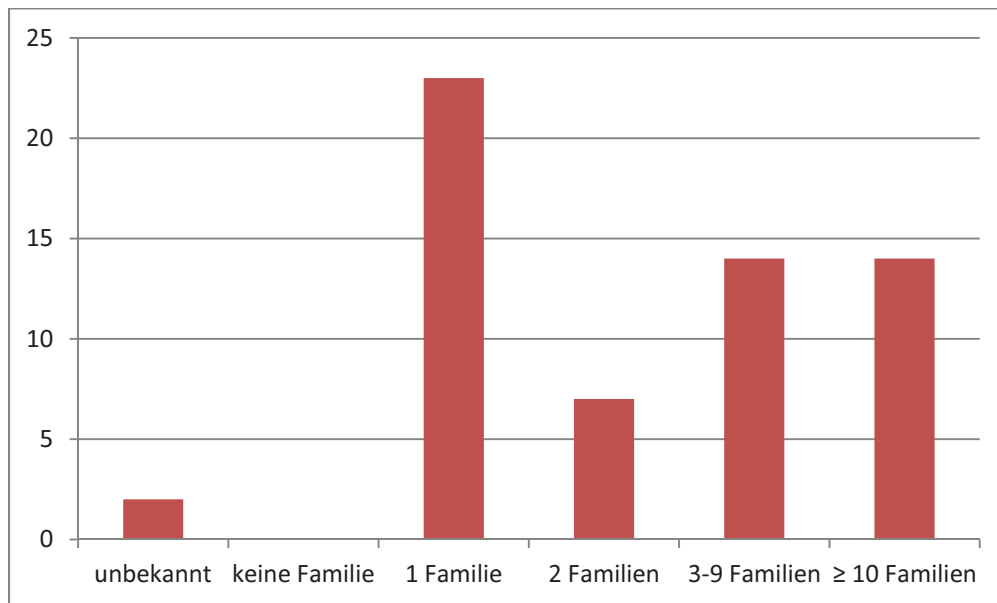
widersprüchlichen Aussagen der ausgewerteten Studien der Aussage der überzeugendsten Arbeit(en), so wurde(n) diese gesondert angeführt.

Ein Großteil der erfassten Sequenzvarianten bestand aus sogenannten “missense”-Mutationen. Allein BRCA1 betreffend wurde diese Art von Mutation bei 151 verschiedenen UVs dokumentiert. Beispielhaft, in Analogie zu vergleichbaren Zahlen für BRCA2, kann konstatiert werden, dass bei 60 (40%) dieser Varianten eine Klassifizierung vorgenommen werden konnte: 44 (29%) dieser UVs wurden als neutral, 16 (11%) als pathogen bewertet. Die übrigen Varianten blieben unklassifiziert. Wie die Abbildung 7 zeigt, wurden solche nicht klassifizierbaren “missense”(ms)-Mutationen vergleichsweise selten in den verschiedenen Familien erfasst, in der Regel in nur ein oder zwei, maximal in vier Familien. Im Vergleich dazu zeigt Abbildung 8 die Anzahl der in Leipzig dokumentierten Familien mit klassifizierbaren “missense“-Mutationen.

Diese Zahlen verdeutlichen, dass häufig vorkommende UVs, bei denen das Interesse an einer Klassifizierung aufgrund einer größeren Anzahl Betroffener im Allgemeinen stärker und die verfügbare Datenlage sich umfassender darstellte, eher klassifiziert werden konnten als solche Varianten niedrigerer Frequenz.



**Abb. 7: Anzahl der in der Leipziger Datenbank dokumentierten Familien mit nicht klassifizierbaren “missense”-Mutationen in BRCA1 (n=91)**



**Abb. 8: Anzahl der in der Leipziger Datenbank dokumentierten Familien mit klassifizierbaren “missense”-Mutationen in BRCA1 (n=60)**

### 3.3 Histopathologische und immunhistochemische Befunde

#### 3.3.1 Heutige Datenlage der Befunde

Die histopathologische und immunhistochemische Befunde betreffende Recherche in den Akten der Familien mit UVs zeigte in zahlreichen Fällen fehlende oder unvollständige Daten. Bei insgesamt 69 untersuchten Familien mit UVs (43 Familien mit einem BRCA1-UV und 26 Familien mit einem BRCA2-UV) wurden für sämtliche Familienmitglieder, bei denen die Möglichkeit der Existenz von histopathologischen bzw. immunhistochemischen Befunden bestand, folgende Ergebnisse ermittelt: bei 146 der insgesamt 241 Mammakarzinome konnten trotz Vorliegen der Akte keinerlei verwertbare Befunde ermittelt werden (95 und 51). In insgesamt 42 Fällen waren die gesuchten Daten in erheblichem Maße unvollständig, so dass sie für eine Bewertung der UVs nur in begrenztem Maße genutzt werden konnten (29 und 13). Bei 4 Familien mit insgesamt 12 Mammakarzinomen war keine Patientenakte aufzufinden (7 und 5), woraus sich ergibt, dass bei nur 39 der insgesamt 237 (~16,5 %) einbezogenen Mammakarzinome umfassende Pathologiebefunde für diese Untersuchungen vorlagen.

### 3.4 Realisierbarkeit von “Co-Occurrence”- und “Co-Segregationsanalysen”

#### 3.4.1 Erläuterungen zur Datenlage (“Co-Occurrence”)

Die Anzahl der im Zuge der Tumorrisikosprechstunde der Düsseldorfer Frauenklinik erfassten Familien, in denen mindestens ein UV in BRCA1 oder BRCA2 diagnostiziert werden konnte, beläuft sich auf 68 Familien (Stand 2008). In 11 dieser Familien konnte außerdem die Existenz mindestens einer weiteren, pathogenen Mutation im selben Gen nachgewiesen werden.

Damit sind in etwa 15% aller Familien mit einem UV grundsätzlich Untersuchungen zur “Co-Occurrence” von UV und pathogener Mutation möglich. Die tatsächliche Anzahl an Familien, die einer solchen Analyse zugeführt werden konnten, war jedoch weitaus geringer: in zahlreichen Fällen standen nur von wenigen Familienmitgliedern Blutproben zur Verfügung. Um im Rahmen von “Co-Occurrence”-Analysen zu einem aussagekräftigen Ergebnis zu gelangen, sind in der Regel mehrere Familienmitglieder zu untersuchen.

Daraus wird deutlich, weshalb die Durchführung von “Co-Occurrence”-Analysen nur bei wenigen ausgewählten Familien möglich war und warum sie, sofern die Untersuchung realisiert wurde, nicht in allen Fällen zur Klassifizierung der jeweiligen Variante beitragen konnte. Zwei der insgesamt vier in dieser Arbeit analysierten UVs konnten mit Hilfe von “Co-Occurrence”-Analysen klassifiziert werden.

#### 3.4.2 Erläuterungen zur Datenlage (“Co-Segregation”)

Um Angaben zur “Co-Segregation” des Tumors und der zu untersuchenden Mutation machen zu können, mussten zweierlei verschiedene Informationen vorliegen:

Zum einen galt es, Angaben zum Mutationsstatus möglichst vieler Familienmitglieder zu ermitteln. Wie auch bei den Untersuchungen zur “Co-Occurrence” war die Anzahl vorliegender Blutproben aus den durch die Tumorrisikosprechstunde betreuten Familien stark limitiert. Daher wurden auch für die “Co-Segregationsanalysen” solche Familien bevorzugt ausgewählt, die eine größere Anzahl an Familienmitgliedern, die sich zu einer Testung entschieden hatten, aufwiesen. Aufgrund dieser Rahmenbedingungen mussten sich die genannten Untersuchungen auf einzelne Familien beschränken.

Zum anderen mussten Informationen zu Erkrankungen an einem Mammakarzinom bei den getesteten Familienmitgliedern einbezogen werden. Durch die kombinierte Verwendung von Unterlagen aus den Akten der Düsseldorfer Frauenklinik sowie der Leipziger Datenbank erschloss sich eine umfangreiche Datensammlung.

Es muss berücksichtigt werden, dass die erhobenen Daten zum Erkrankungsstatus der getesteten Person nicht als statische Werte betrachtet werden dürfen, da sie jederzeit Veränderungen unterliegen und somit vielmehr einer Art „Momentaufnahme“ entsprechen.

### 3.4.3 Realisierbarkeit von systematischen Untersuchungen zur “Co-Occurrence” und “Co-Segregation”

Die geschilderten Umstände machten eine stark selektive Vorgehensweise bei der Beantwortung der Frage, welche Familien für die o.g. Untersuchungen in Frage kämen, notwendig. Daraus resultiert die limitierte Anzahl der Sequenzvarianten, bei denen der Versuch einer Klassifizierung unternommen wurde.

## 3.5 Analyse der Häufigkeiten verschiedener Formen von UVs aus der Düsseldorfer Tumorrisikosprechstunde

Den mit Abstand größten Anteil der in BRCA1 und BRCA2 diagnostizierten unterschiedlichen UVs stellen sogenannte ms-Mutationen dar. Diese sind dadurch charakterisiert, dass sie den Sinn der codierten Information verändern. In BRCA1 wurden insgesamt 143 (86 %) sowie in BRCA2 112 (88 %) dieser Mutationen nachgewiesen. Dabei stellt das Kollektiv von zwischen dem Jahr 2002 und dem Frühjahr 2011 im Rahmen der Tumorrisikosprechstunde der Frauenklinik Düsseldorf analysierten Familien die Grundgesamtheit dar.

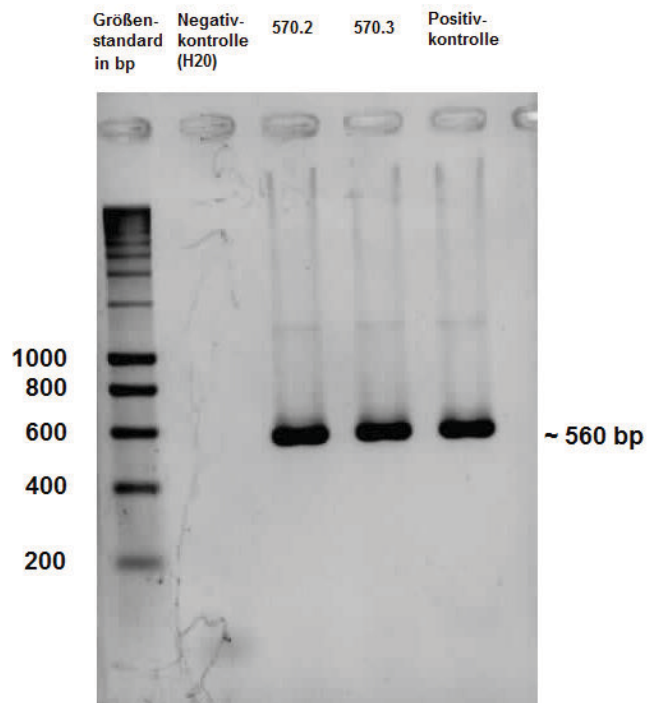
Frameshift-Mutationen dagegen führen durch Insertionen bzw. Deletionen einzelner oder mehrerer Basenpaare ( $n \neq 3$ ) zu einer Leserasterverschiebung, in deren Folge es in der Regel zu einer Abänderung der Aminosäuresequenz und zu einem vorzeitigen Translationsstop kommt. Sie sind in der Regel als pathogene Mutationen anzusehen (einzige Ausnahme: fehlende funktionelle Relevanz von Mutationen in BRCA2, Exon 27). Darüber hinaus wurden

in BRCA1 1 (< 1%) und in BRCA2 3 (2 %) weitere “in-frame” Deletionsmutationen nachgewiesen, welche aufgrund einer Deletion von ein oder mehreren Codons das Fehlen der entsprechenden Aminosäure(n) aber keine Beeinflussung des Leserasters verursachen.

Mutationen, die im nicht-codierenden Anteil der Gensequenz, den Introns, vorkommen, wurden in BRCA1 23 mal (14 %) bzw. in BRCA2 13 mal (10 %) identifiziert.

### 3.6 Auswertung der Daten und Versuch der Klassifizierung ausgewählter UVs

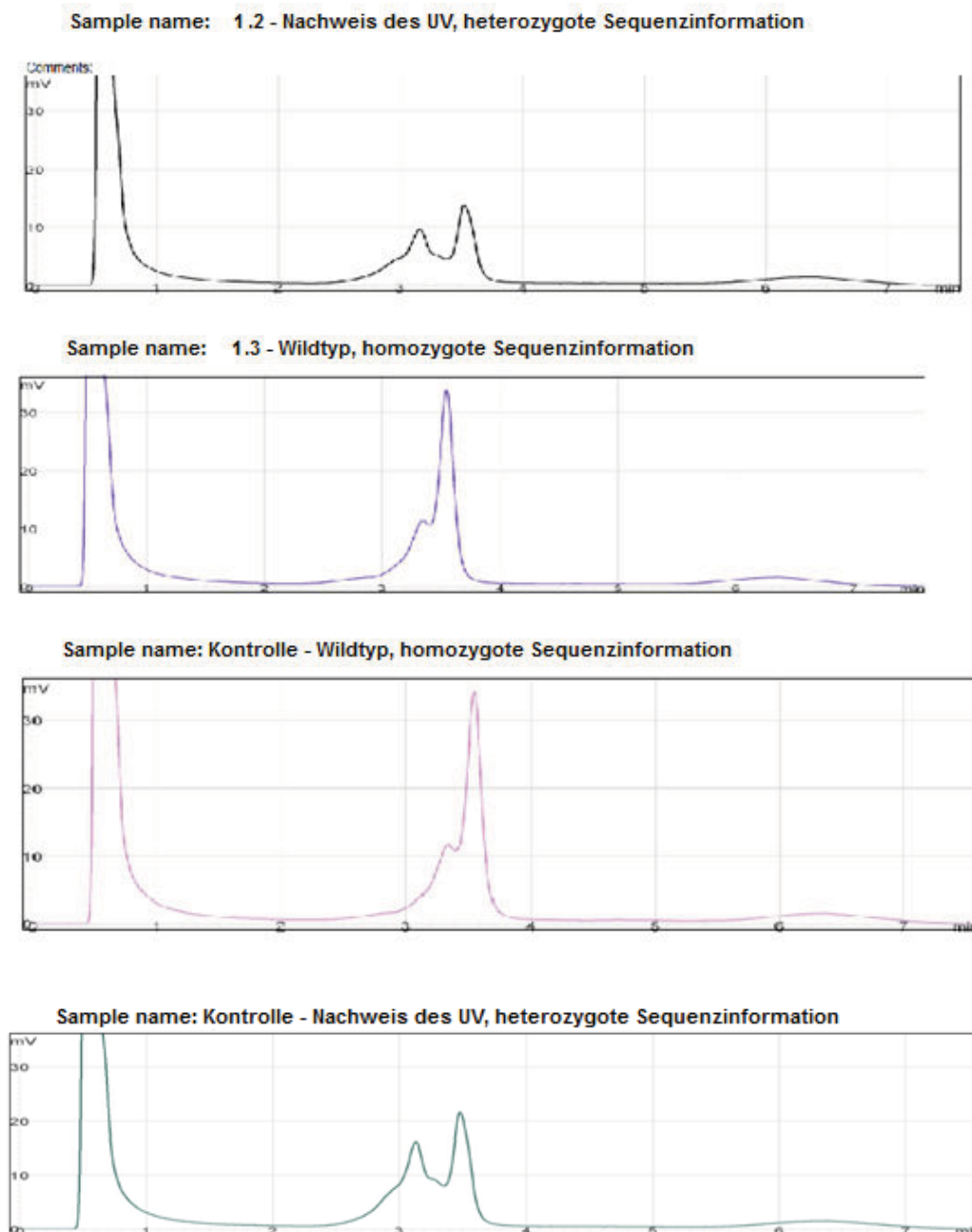
#### 3.6.1 Der UV c.5075 G>A (M1652I)



**Abb. 9: PCR-Analyse des c.5075 G>A – UV mit Darstellung der Elektrophorese**

Durch das Exon 16 flankierende Primer (s. Kapitel „Material und Methoden“) wird das Exon 16 beinhaltende BRCA1-Genfragment von 560bp Länge amplifiziert und die erhaltenen PCR-Produkte in einer Agarosegelelektrophorese bezüglich der korrekten Größe, der spezifischen Amplifikation (nur ein PCR-Produkt) und der PCR-Ausbeute (Intensität der Bande) überprüft. Abb. 9 zeigt exemplarisch, im Vergleich zur Kontrolle, die PCR Produkte

der Proben 1.2 und 1.3, die in ausreichender Qualität und Quantität für die weitere Analytik eingesetzt werden können.

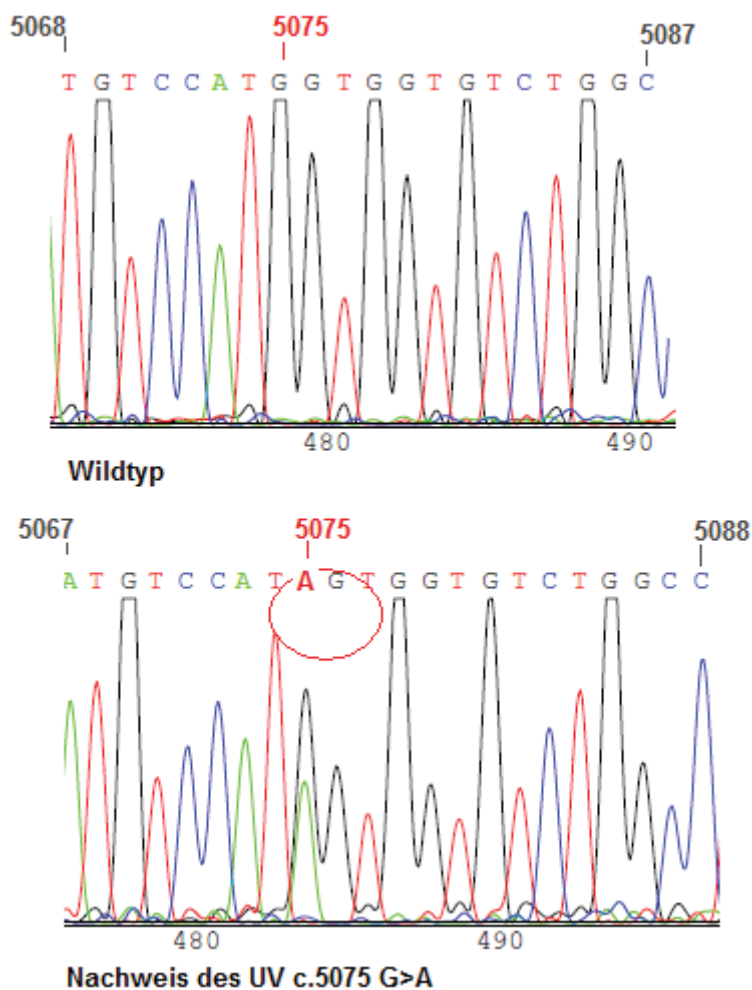


**Abb. 10: DHPLC-Untersuchungsergebnisse zum c.5075 G>A (Familie 1)**

Die Abbildung 10 zeigt die DHPLC-Ergebnisse der beiden Patientenproben (Nachweis des UV in der Probe 1.2, Nachweis des Wildtyps in der Probe 1.3) im Vergleich zu den beiden Kontrollen (Darstellung jeweils einer homo- sowie einer heterozygoten Sequenzinformation als Kontrollergebnis). Die im Fall eines Nachweises des UV dokumentierten „Doppelpeaks“

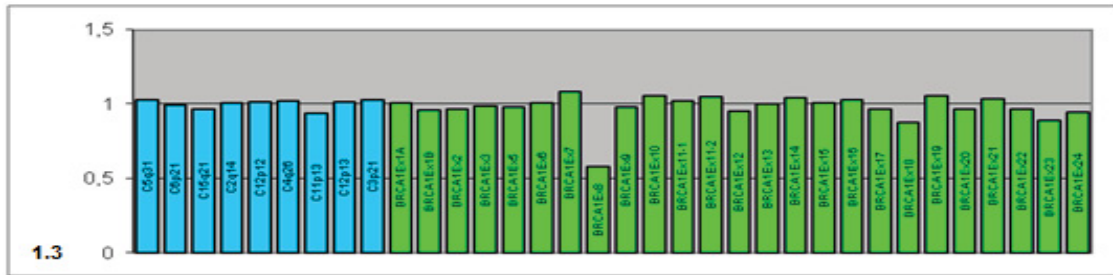
sind als Korrelat des heterozygoten Genotyps zu interpretieren. Die in der DHPLC-Analyse des PCR-Produkts ausgebildeten „Doppelpeaks“ setzen sich aus einem linken “Peak“ (Bildung von Heteroduplices, kürzere Retentionszeit) sowie einem rechten “Peak“ (Bildung von Homoduplices, längere Retentionszeit) zusammen. Exemplarisch wird hier der Nachweis des c.5075 G>A-Genotyps von 1.2 und des Wildtyps (c.5075 G/G) bei 1.3 gezeigt.

Die Abbildungen zu den Ergebnissen der Sequenzierungsanalysen des Exons 16 (Wildtyp sowie Nachweis des UV 5075 G>A) sind im Anhang (Abb. A.1 und A.2) dargestellt.

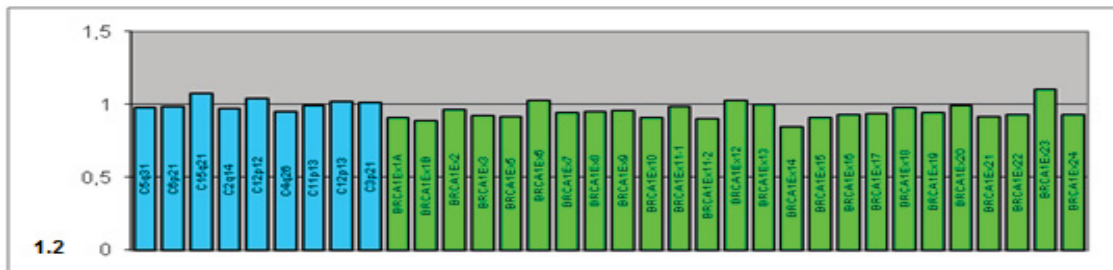


**Abb. 11: Sequenzierungsanalysen Exon 16 (Vergleich von Wildtyp und c.5075G>A-UV)**

In Abb. 11 ist eine Detailaufnahme der Sequenzierungsanalysen, welche in Abb. A.1 und A.2 dargestellt sind, zu sehen. Der nicht übereinstimmende Verlauf der Kurve an der Nukleotidposition 5075 ist eindeutig zu erkennen. Ein weiterer Sequenzvergleich von Wildtyp und c.5075G>A-UV ist in der Abb. A.3 im Anhang dargestellt.



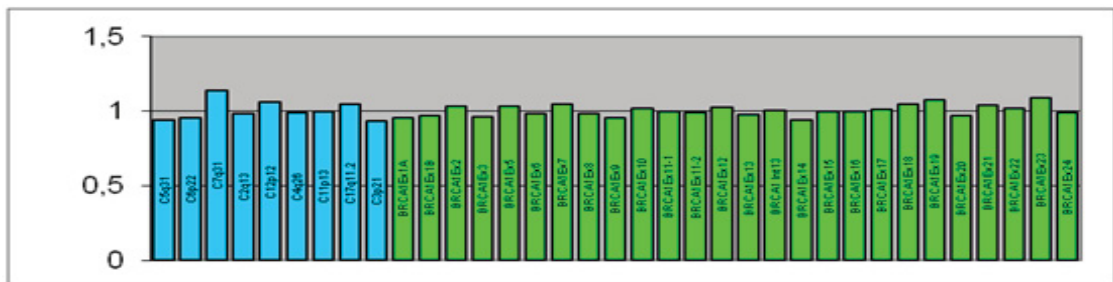
Del Ex 8 positiv



Del Ex 8 negativ



Positivkontrolle Del Ex 22



Negativkontrolle

**Abb. 12: MLPA- Untersuchung der Familie 570 (Kit der Firma MRC Holland)**

In Abb. 12 ist der anhand einer “Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification”-Analyse erbrachte Nachweis der Deletion des Exon 8 in der Probe 1.3 sowie der fehlende Nachweis dieser Deletion in der Probe 1.2 im Vergleich zu zwei Kontrollen dargestellt.



Der oben dargestellte Stammbaum (Abb. 13) zeigt die Familie 1, in der sowohl der UV c.5075 G>A als auch eine pathogene BRCA1-Mutation in Form einer Deletion des Exons 8 identifiziert wurden. Anhand der Ergebnisse der Sequenzierungsanalysen lässt sich erkennen, dass der hier untersuchte UV nicht nur wie bei den im Stammbaum mit den Nummern 1 und 12 gekennzeichneten Personen in Kombination mit der pathogenen Mutation auftritt, sondern die Deletion des Exons 8 des BRCA1-Gens wie bei den Personen 3; 9; 15; 16 und 32 auch ohne den UV nachzuweisen ist. Da die Mutter 1.3 nur die pathogene Mutation, nicht aber den UV aufweist, muss der Vater 1.2 den UV an seine Kinder vererbt haben. Der UV alleine ist in 1.2 und 1.8 nachzuweisen. Es kann geschlussfolgert werden, dass die beiden genannten Mutationen unabhängig voneinander vererbt werden und auf verschiedenen Allelen lokalisiert sind.

Aus der “Co-Occurrence” des UVs mit einer eindeutig pathogenen Mutation in den Familienmitgliedern 1.1 und 1.12 lässt sich schlussfolgern, dass es sich bei dem UV c.5075 G>A um eine neutrale Sequenzvariante handelt. Diese Befunde stimmen mit denen von Tavtigian et al. und Deffenbaugh et al. [39; 40] überein.

#### 3.6.1.2 “Co-Segregationsanalysen” der c.5075 G>A-Mutation

Bei einer weiteren Familie (ID 2) konnte bei insgesamt 4 Familienmitgliedern der UV c.5075 G>A nachgewiesen werden (Ausschnitt des Stammbaums: Abb. 14). Eine Besonderheit dieser Familie ist die Belastung mit Eierstockkrebs. Mammakarzinome sind bis dato nicht diagnostiziert worden. Insgesamt sind 4 Fälle von Ovarialkarzinomen aufgetreten. Bis zum heutigen Zeitpunkt ist kein Erkrankungsfall in den positiv auf den UV c.5075 G>A getesteten Personen aufgetreten. 3 der 4 Patientinnen waren zum Zeitpunkt der Diagnosestellung mindestens 50 Jahre alt (50 Jahre; 55 Jahre; 67 Jahre). In einem Fall wurde die bösartige Erkrankung im Alter von 45 Jahren diagnostiziert. Von erkrankten Familienmitgliedern lagen keine Blutproben zur Analyse vor. Dennoch ist der Sachverhalt, dass die bereits bekannten Träger des UV bislang nicht erkrankt sind, ebenso wie das eher hohe Erkrankungsalter der betroffenen Familienmitglieder, als deutliches Indiz für ein neutrales Verhalten der c.5075 G>A-Variante zu beurteilen.

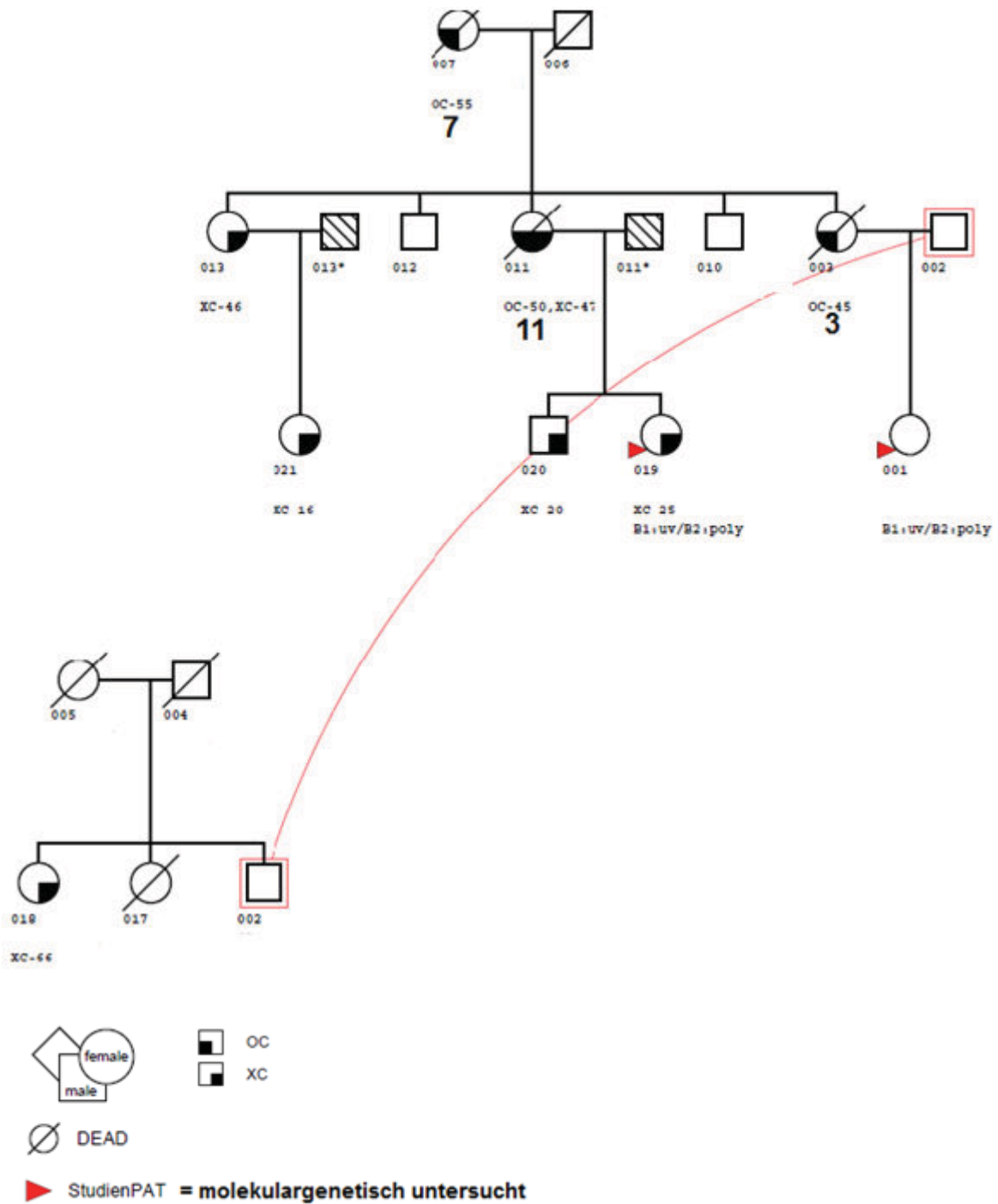


Abb. 14: Stammbaum der Familie Nummer 2

### 3.6.1.3 Histopathologische Befunde zum UV c.5075 G>A

Da der UV c.5075 G>A bei an Mammakarzinomen Erkrankten der Familien 1 und 2 nur mit einer pathogenen Mutation vorkommt, erfolgte in diesen Fällen keine Auswertung

histopathologischer Befunde. Ebenso ist die Patientin 3.2, zur der ausführliche Pathologiebefunde vorliegen, Trägerin des UV sowie der pathogenen Mutation c.6190delG in BRCA2.

Die weitere Recherche erbrachte unvollständige Pathologiebefunde der Familien 4; 5 und 6 sowie fehlende Pathologiebefunde der Familien 7 und 8.

Im Folgenden werden die histopathologischen Befunde der Patienten 9.15 und 10.1 dargestellt:

Das Mammakarzinom der Patientin 9.15 wurde als niedrig differenziertes (G3) und solide wachsendes invasives, lobuläres Karzinom eingestuft. Die Hormonrezeptor-Reaktion fiel negativ aus.

Die Untersuchungen des Mammakarzinoms der Patientin 10.1 zeigten kleine bis mittelgroße Tumorzellen sowie eine ausgeprägte Stromadysplasie; in der PAS-Reaktion eine diskrete PAS-Positivität des Cytoplasmas. Der Differenzierungsgrad des invasiven, scirrhösen, lobulären Mammakarzinoms wurde als G2 gewertet. Immunhistochemisch wurden eine mittelgradige Progesteron-Rezeptor-Expression sowie eine grenzwertige Östrogen-Rezeptor-Expression festgestellt.

#### 3.6.1.4 Bewertung des UV c.5075 G>A

| Familien-ID | Bekannte UV-Träger o. path. Mut. | Nicht-Erkr. (MC/OC) mit nachgew. UV | Erkrankte (MC/OC) mit nachgewiesenem UV | Erkrankte (MC/OC) ohne nachgewiesenen UV |
|-------------|----------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------------------|
| 2           | 4                                | 4                                   | 0 / 0                                   | 0 / 4                                    |
| 7           | 1                                | 1                                   | 0 / 0                                   | 3 / 0                                    |
| 4           | 1                                | 1                                   | 0 / 0                                   | 0 / 0                                    |
| 9           | 1                                | 0                                   | 1 / 0                                   | 1 / 2                                    |
| 3           | 2                                | 1                                   | 1 / 0                                   | 4 / 0                                    |
| 8           | 0                                | 0                                   | 0 / 0                                   | 1 / 3                                    |

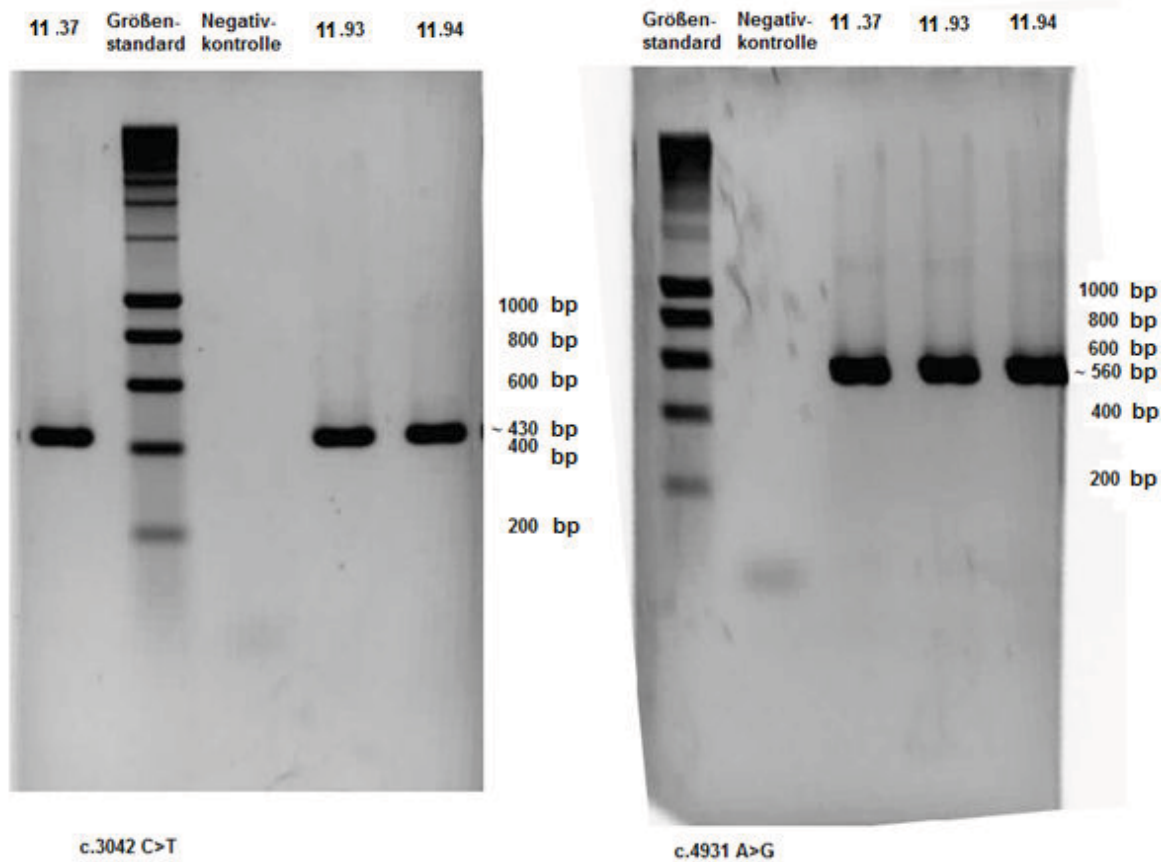
|    |   |   |       |       |
|----|---|---|-------|-------|
| 10 | 1 | 0 | 1 / 0 | 5 / 0 |
| 1  | 2 | 2 | 0 / 0 | 3 / 0 |
| 5  | 1 | 0 | 1 / 0 | 4 / 0 |
| 6  | 1 | 0 | 1 / 0 | 3 / 4 |

**Tabelle 9: Assoziation von UV-Trägerstatus und Erkrankung am MC / OC**

Die Tabelle 9 zeigt eine Übersicht über sämtliche in Düsseldorf vorstellig gewordene Familien, in denen der c.5075 G>A nachgewiesen wurde. Die Daten zeigen, dass die meisten an Mamma- und / oder Ovarialkarzinomen erkrankten Familienmitglieder keine bekannten Träger des UV sind. Umgekehrt kann festgestellt werden, dass etwa 65% der bekannten UV-Träger, bei denen keine pathogene Mutation identifiziert wurde, bis heute weder ein Mamma- noch ein Ovarialkarzinom entwickelt haben. Mehr als 60% dieser Träger sind heute älter als 60 Jahre. Würde es sich bei dem c.5075 G>A-UV um eine pathogene Mutation handeln, so wäre mit einer deutlich früheren Entwicklung eines familiären Mammakarzinoms zu rechnen gewesen. Es ist weder eine positive noch eine negative Korrelation zwischen UV-Trägerstatus und Erkrankungsstatus der Familienmitglieder erkennbar. Diese Daten sind als Hinweis auf ein neutrales Verhalten der Sequenzvariante zu werten und unterstützen die in dieser Arbeit vorgenommene Klassifizierung.

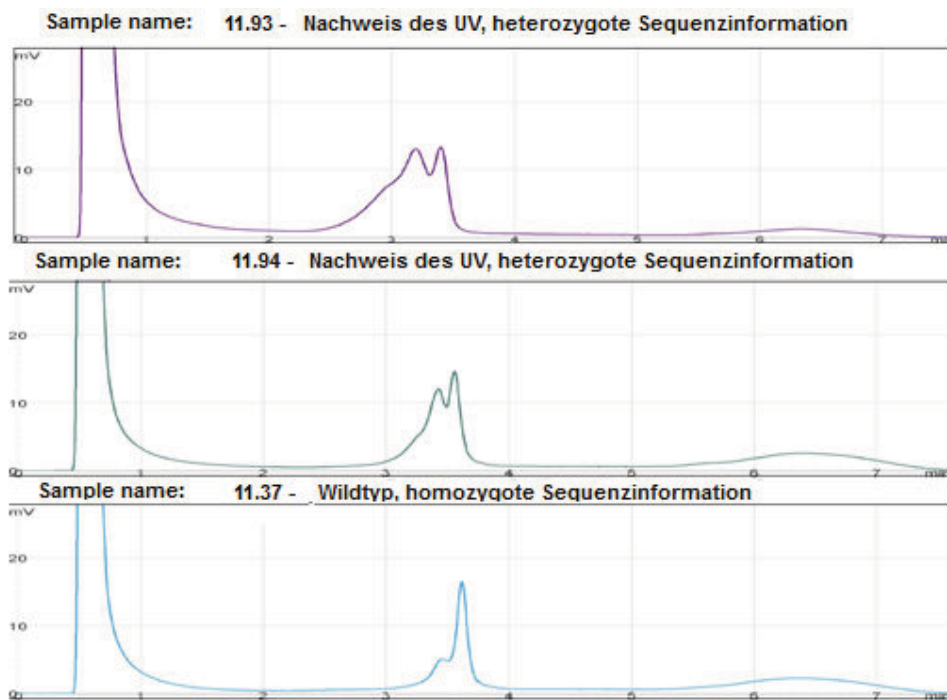
Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen beweisen, dass vom c.5075 G>A – UV kein erhöhtes Erkrankungsrisiko ausgeht. Das in diesem Zusammenhang aussagekräftigste und für die vorgenommene Bewertung der Variante entscheidende Kriterium ist die “Co-Occurrence”. Die Ergebnisse histopathologischer und immunhistochemischer Analysen stellten sich inhomogen dar und bedeuteten keinen Zugewinn an für die Klassifizierung relevanten Informationen. Die Sequenzvariante muss als neutral bewertet werden.

### 3.6.2 Der UV c.4931 A>G (Q1604Q)



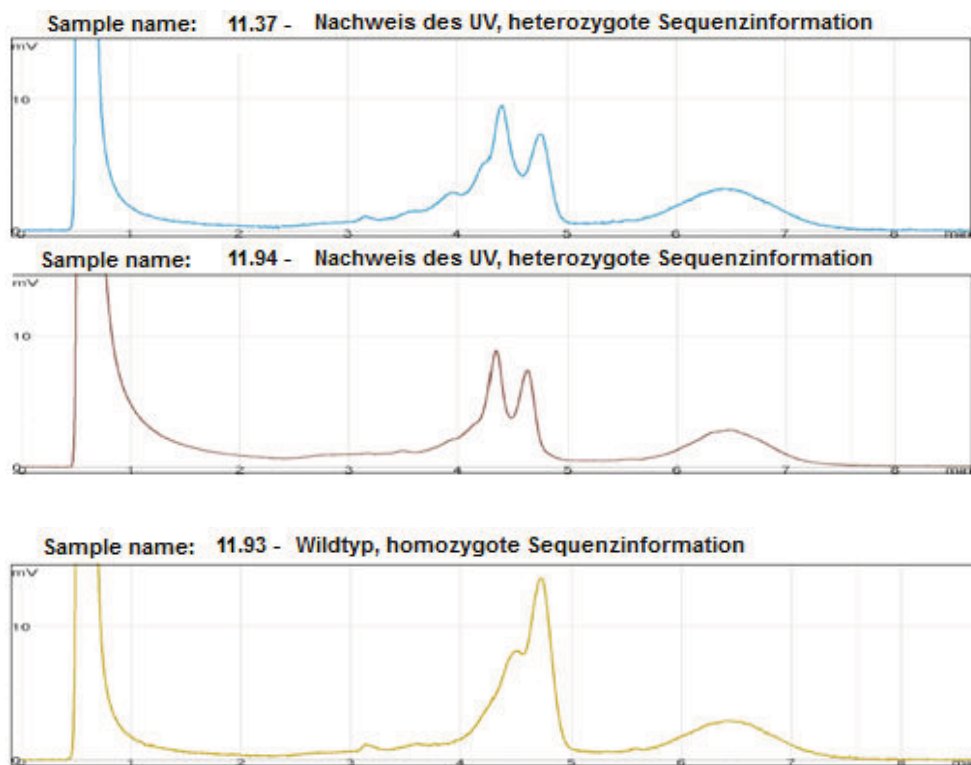
**Abb. 15: PCR-Gelelektrophorese der Mutation c.3042 C>T und des UV c.4931 A>G**

Durch das Exon 11 (bzw. Exon 16) flankierende Primer (s. Kapitel „Material und Methoden“) wird das Exon 11 (sowie Exon 16) beinhaltende BRCA1 Genfragment von 430bp (sowie 560bp) Länge amplifiziert und die erhaltenen PCR-Produkte in einer Agarosegelelektrophorese bezüglich der korrekten Größe, der spezifischen Amplifikation (nur ein PCR-Produkt) und der PCR-Ausbeute (Intensität der Bande) überprüft. Abb. 15 zeigt exemplarisch, im Vergleich zur Kontrolle, die PCR Produkte der Proben 11.37, 11.93 und 11.94, die in ausreichender Qualität und Quantität für die weitere Analytik eingesetzt werden können.



**Abb. 16: DHPLC-Untersuchungsergebnisse zum c.4931 A>G**

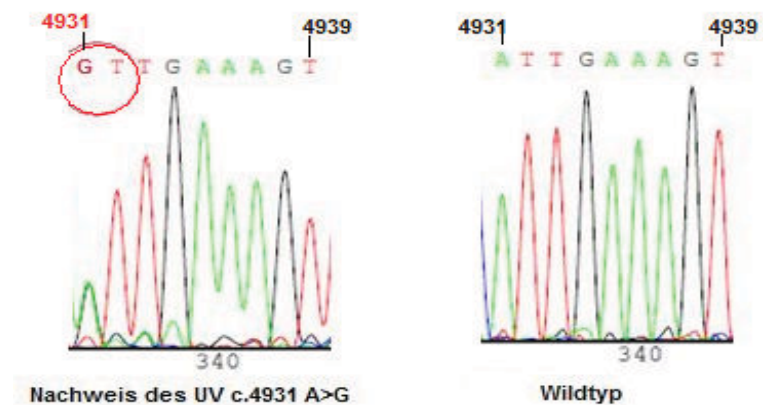
Die Abbildung 16 zeigt die DHPLC-Ergebnisse der beiden Patientenproben (Nachweis des UV c.4931 A>G in den Proben 11.93 und 11.94, Nachweis des Wildtyps in der Probe 11.37).



**Abb. 17: DHPLC-Untersuchungsergebnisse zum c.3042 C>T**

Die Abbildung 17 zeigt die DHPLC-Ergebnisse der beiden Patientenproben (Nachweis des UV c.3042 C>T in den Proben 11.37 und 11.94, Nachweis des Wildtyps in der Probe 11.93).

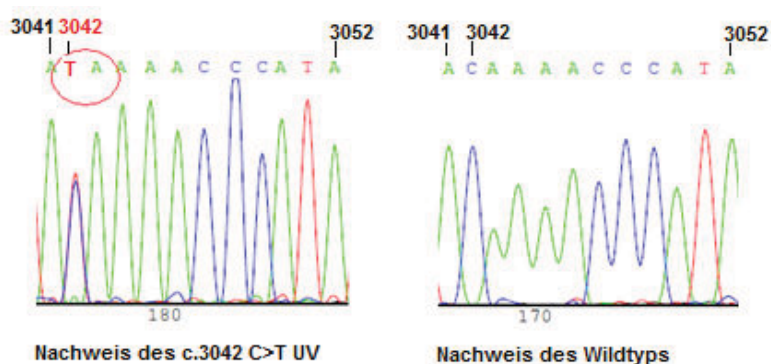
Die Ergebnisse der Sequenzierungsanalysen zum c.4931 A>G (Wildtyp sowie Nachweis des UV im Exon 16) sind in den Abb. A.4 und A.5 im Anhang dargestellt.



**Abb. 18: Vergleich der Sequenzierungsanalysen zum c.4931 A>G (Nachweis des UV und Wildtyp)**

In Abb. 18 ist eine Detailaufnahme der Sequenzierungsanalysen, welche in Abb. A.4 und A.5 dargestellt sind, zu sehen. Der nicht übereinstimmende Verlauf der Kurve an der Nukleotidposition 4931 ist zu erkennen. Ein weiterer Sequenzvergleich von Wildtyp und c.4931 A>G ist in der Abb. A.8 im Anhang dargestellt.

Die Ergebnisse der Sequenzierungsanalysen zum c.3042 C>T (Wildtyp sowie Nachweis des UV im Exon 11) sind in den Abb. A.6 und A.7 im Anhang dargestellt.



**Abb. 19: Vergleich der Sequenzierungsanalysen zum c.3042 C>T (Nachweis des UV und Wildtyp)**

In Abb. 19 ist eine Detailaufnahme der Sequenzierungsanalysen, welche in Abb. A.6 und A.7 dargestellt sind, zu sehen. Der nicht übereinstimmende Verlauf der Kurve an der Nukleotidposition 3042 ist deutlich zu erkennen. Ein weiterer Sequenzvergleich der jeweiligen Wildtypen und des c.4931 A>G-UV bzw. des c.3042 C>T sind in den Abb. A.8 und A.9 im Anhang dargestellt.

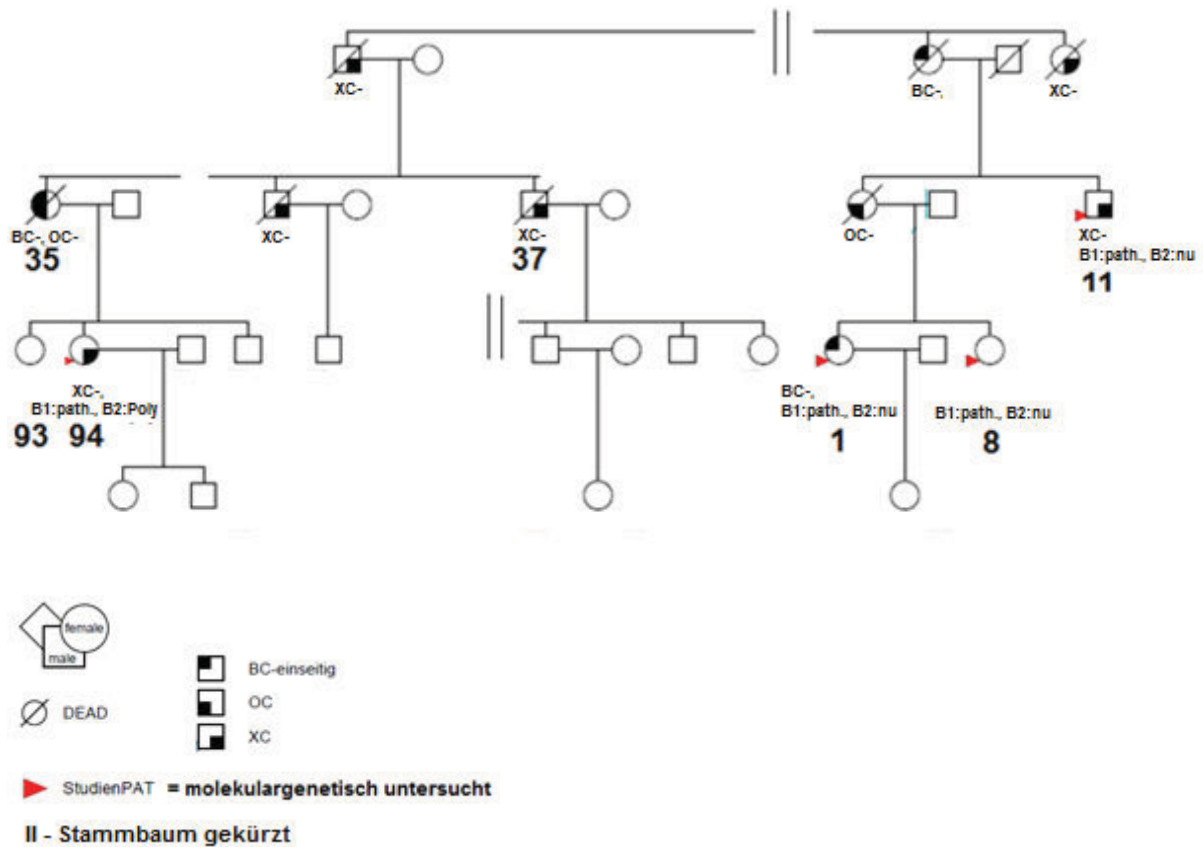
### 3.6.2.1 “Co-Occurrence”-Analysen der c.4931 A>G-Mutation

Im Düsseldorfer Familienkollektiv wurde der UV in 2 Familien nachgewiesen (ID 11 und 12, s. Tabelle 10). In der Leipziger Datenbank wurde er in 6 Familien dokumentiert (Stand 2010).

| Familien-ID<br>(Anzahl<br>Mitgl.) | Analysierte | Träger des UV<br>o. path. Mut. | Nicht-Erkrankte<br>(MC/OC) UV-Träger<br>o. path. Mut. | Erkrankte<br>insgesamt<br>(MC/OC) |
|-----------------------------------|-------------|--------------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| 11 (140)                          | 6           | 1                              | 1                                                     | 13 / 3                            |
| 12 (100)                          | 2           | 1                              | 1                                                     | 5 / 3                             |

**Tabelle 10: Familien aus der Düsseldorfer Tumorrisikosprechstunde mit dem UV c.4931 A>G**

In Familie 11 (Abb. 20) wurde eine auf Exon 11 lokalisierte “nonsense”- Mutation c.3042 C>T (Q975X) sowie eine stille Mutation c.4931 A>G (Q1604Q) identifiziert.



**Abb. 20: Stammbaum der Familie 11**

Dass beide Mutationen unabhängig voneinander vererbt werden, zeigt sich am Beispiel der Personen 11.37; 11.93 und 11.94. Die Person 11.94 weist sowohl den UV als auch die pathogene Mutation auf. Die Ratsuchende mit der Nummer 93 ist dagegen nur von der c.4931 A>G (Q1604Q)-Variante betroffen. Gegensätzlich dazu verhält sich die Situation bei der Person 11.37, dem Onkel der beiden zuvor genannten Frauen, der ausschließlich Träger der pathogenen c.3042 C>T-Mutation ist. Beide Sequenzveränderungen liegen demnach auf verschiedenen Allelen und das Vorkommen von UV und pathogener Mutation in 11.94 sprechen für eine neutrale c.4931 A>G (Q1604Q) Mutation.

### 3.6.2.2 “Co-Segregationsanalysen” der c.4931 A>G-Mutation

In der Familie 11 wurden 13 unilaterale Mammakarzinome sowie drei Ovarialkarzinome beschrieben. 5 Mitglieder der Familie wurden als Träger der c.3042 C>T – Mutation

identifiziert (11.1; 11.8; 11.11; 11.37; 11.94). Der UV wurde insgesamt zweimal nachgewiesen (11.93; 11.94).

Vier der fünf Träger der pathogenen Mutation sind an einem malignen Tumor erkrankt (11.1; 11.11; 11.37; 11.94). Dabei handelt es sich um ein Mammakarzinom, einen Hodentumor, ein Pankreaskarzinom und ein Melanom. Das Familienmitglied 11.94 ist auch Träger des UV. Es ist bislang nicht an einem Mammakarzinom erkrankt. Die Person 11.93, die nur den UV aufweist, ist bis zu ihrem 55. Geburtstag nicht an einem Mammakarzinom erkrankt. Dies ist ein Indiz für ein neutrales Verhalten der Sequenzvariante. Aufgrund der geringen Anzahl diagnostizierter UV-Träger kann anhand dieser Familie nur eingeschränkt beurteilt werden, inwieweit das Vorkommen des UV mit dem Auftreten von Mammakarzinomen einhergeht.

#### 3.6.2.3 Histopathologische Befunde zum UV c.4931 A>G

Ausschließlich zur Person 11.35, die rechtsseitig an einem Mammakarzinom sowie an einem Ovarialkarzinom erkrankt war, liegen Ergebnisse histopathologischer Untersuchungen vor.

Weder medulläre noch atypische medulläre Formen des Brustkrebses wurden nachgewiesen. Neben infiltrierend wachsenden Tumorearealen wurden angrenzende Bereiche eines sogenannten *in-situ*-Karzinoms identifiziert.

#### 3.6.2.4 Bewertung des UV c.4931 A>G

Die Untersuchungen zur “Co-Occurrence” belegen, dass es sich bei dem UV c.4931 A>G um eine neutrale Variante handelt. Die Ergebnisse der “Co-Segregationsanalyse” der Familie 11 decken sich mit der Bewertung des UV als neutrale Sequenzvariante. Ebenso wird die Klassifizierung durch die Daten in Tabelle 10 gestützt, aus denen hervorgeht, dass Träger des UV, bei denen keine pathogene Mutation identifiziert wurde, nicht gehäuft an einem Mamma- oder Ovarialkarzinom erkrankt sind.

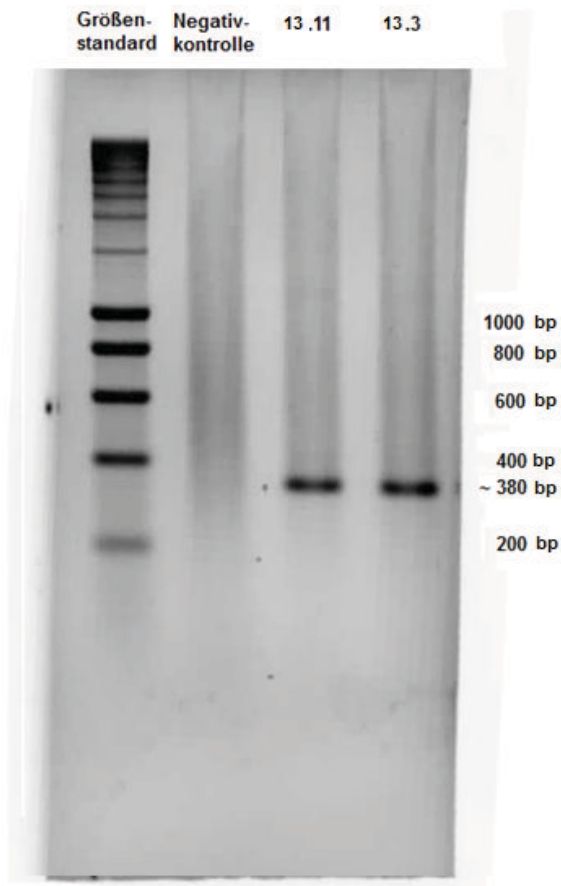
### 3.6.3 Der UV IVS 20 + 60 ins12bp

Der UV wurde in 4 Familien aus der Düsseldorfer Tumorrisikosprechstunde identifiziert (s. Tabelle 11). In Leipzig wurde der IVS 20 + 60 ins12bp in 24 Familien dokumentiert (Stand 2010).

| Familien-ID<br>(Anzahl Mitgl.) | Träger des UV<br>o. path. Mut. | Nicht-Erkrankte (MC/OC)<br>UV-Träger o. path. Mut. | Erkrankte<br>(MC/OC) |
|--------------------------------|--------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------|
| 13 (16)                        | 1                              | 0                                                  | 3 / 0                |
| 14 (23)                        | 1                              | 1                                                  | 3 / 0                |
| 15 (81)                        | 2                              | 0                                                  | 3 / 1                |
| 16 (44)                        | 1                              | 0                                                  | 3 / 0                |

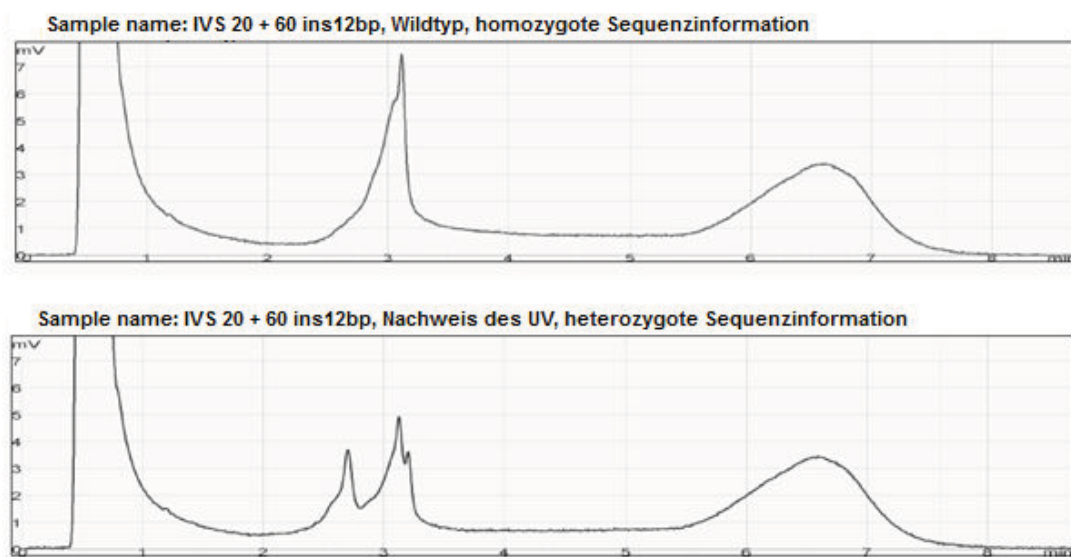
**Tabelle 11: Familien aus der Düsseldorfer Tumorrisikosprechstunde mit dem intronischen UV**

Da bei keiner der bislang analysierten Familien neben der IVS 20 + 60 ins12bp Sequenzvariante eine pathogene Mutation nachgewiesen wurde, konnten keine Untersuchungen zur “Co-Occurrence” erfolgen.



**Abb. 21: PCR-Analyse des IVS 20 + 60 ins12bp mit Darstellung der Elektrophorese**

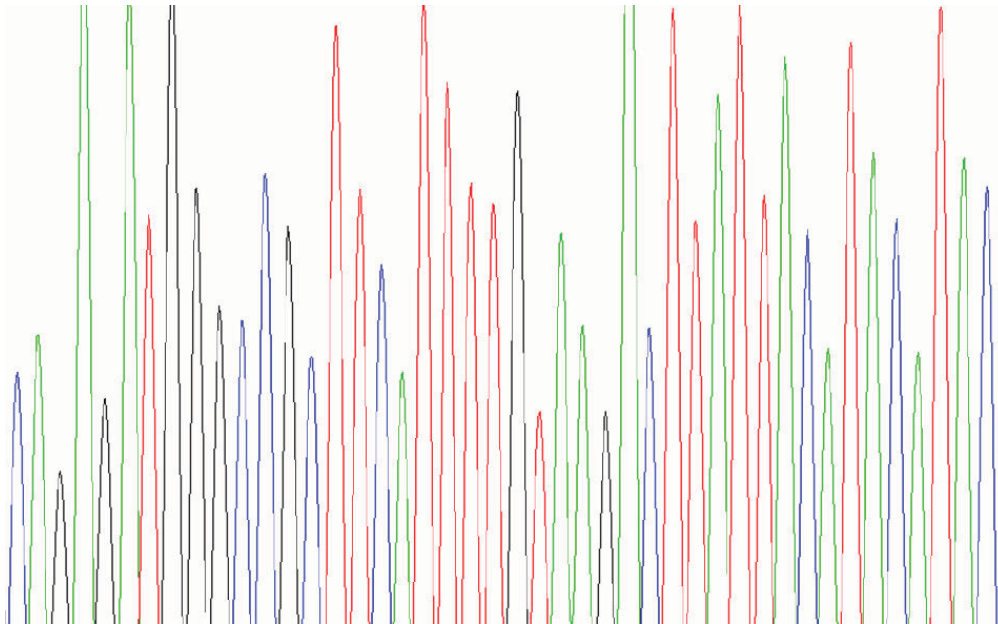
In der Abb. 21 ist das Ergebnis der PCR-Analyse mit dem betreffenden BRCA1 Genfragment von etwa 380bp dargestellt.



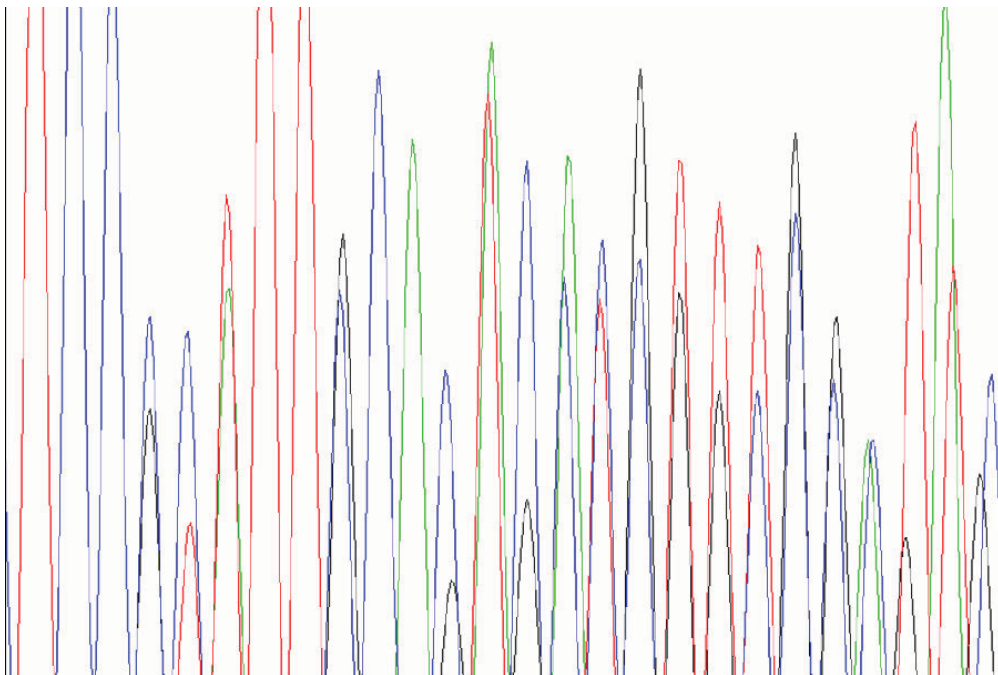
**Abb. 22: DHPLC-Untersuchungsergebnisse zum IVS 20 + 60 ins12bp**

Die Abb. 22 zeigt sowohl den Nachweis des genotypischen Wildtyps (homozygote Sequenzinformation) als auch des UV IVS 20 + 60 ins12bp (heterozygote Sequenzinformation, „Doppelpeak“).

Die Ergebnisse der Sequenzierungsanalysen zum IVS 20 + 60 ins12bp sind in den Abb. A.10 und A.11 im Anhang dargestellt.



**Abb. 23: Ausschnitt des Sequenzierungsergebnisses (Wildtyp)**



**Abb. 24: Ausschnitt des Sequenzierungsergebnisses (Nachweis des UV IVS 20 + 60 ins12bp)**

Die Abbildung 24 zeigt im Vergleich zur Abbildung 23 (Wildtyp) den Nachweis des IVS 20 + 60 ins12bp. Der aberrante Kurvenverlauf in Abbildung 24 ist durch die Insertionsmutation bedingt. Ein weiterer Vergleich der Sequenzanalysen zum IVS 20 + 60 ins12bp (Wildtyp und positiver Nachweis des UV) ist in Abb. A.12 im Anhang dargestellt.

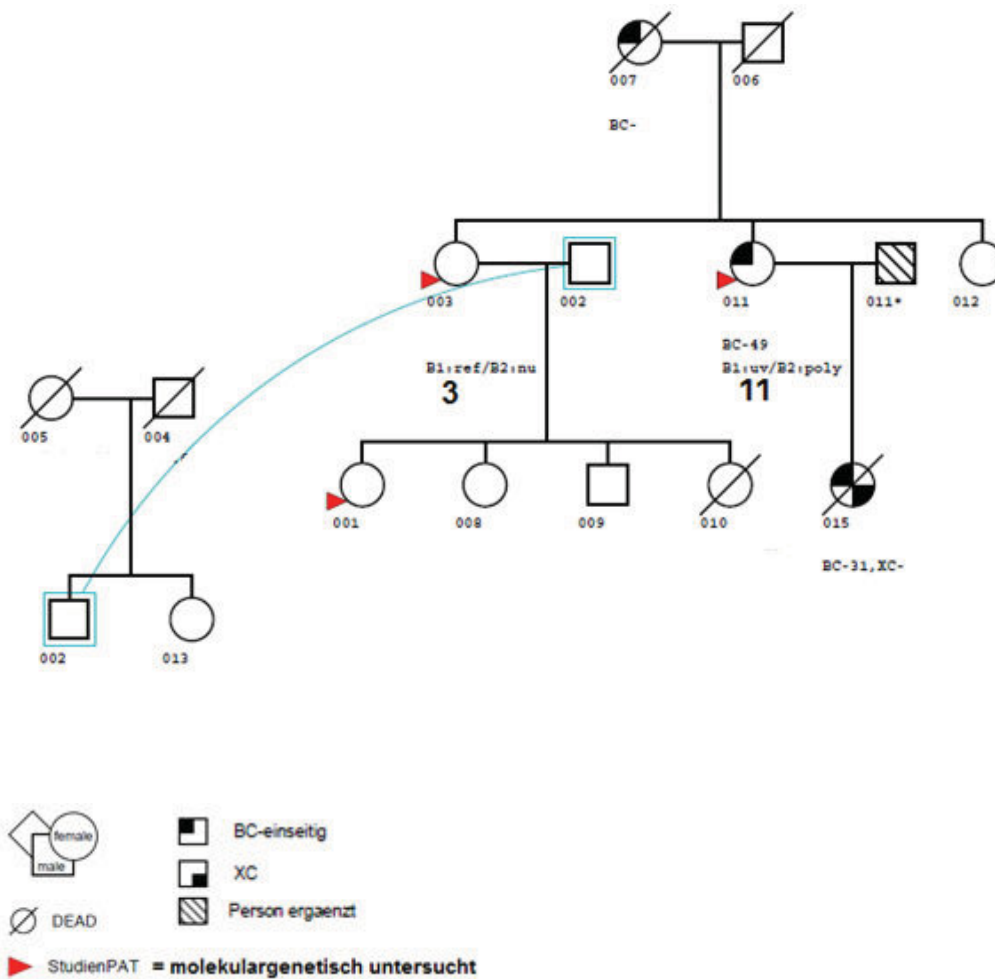
#### 3.6.3.1 “Co-Segregationsanalysen” zum IVS 20 + 60 ins12bp

Der Stammbaum der Familie 13 (Abb. 25) zeigt insgesamt 3 weibliche Familienmitglieder mit Mammakarzinomen. Das Erkrankungsalter beträgt in allen Fällen maximal 50 Jahre; eine Patientin erkrankte mit 30 Jahren.

Nur von einer der erkrankten Frauen, Person 13.11, wurde eine Blutprobe zur molekulargenetischen Untersuchung asserviert. Sie ist Trägerin des UV.

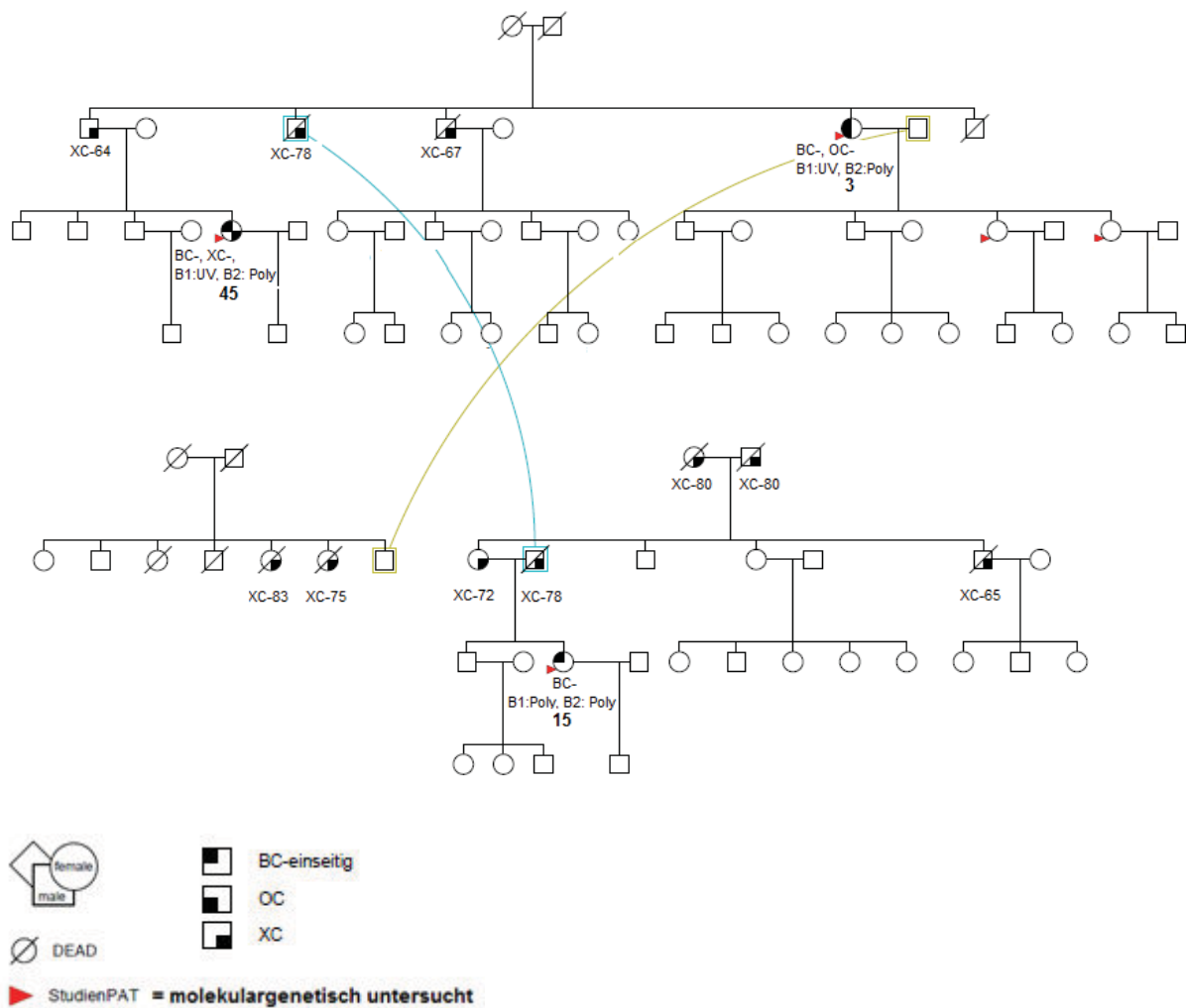
Bei einer weiteren Person (13.3) wurde der UV nicht nachgewiesen.

Der geringe Umfang vorliegender Blutproben lässt keine aussagekräftige Beurteilung der “Co-Segregation” von Tumorerkrankung und UV zu.



**Abb. 25: Stammbaum der Familie Nummer 13**

In der Familie 15 (Abb. 26) sind die Personen 15.15 und 15.45 Frauen jeweils an unilateral wachsenden Mammakarzinomen erkrankt. Deren Alter bei Stellung der Erstdiagnose betrug 45 bzw. 39 Jahre. Die gemeinsame Tante der beiden Cousins (15. 3) ist ebenfalls an einem unilateralen Mammakarzinom (Erstdiagnose mit 63 Jahren) erkrankt. 4 Jahre später erkrankte sie außerdem an einem Ovarialkarzinom. Bei den Personen 15.3 und 15.45 konnte der UV 20 + 60 ins12bp nachgewiesen werden. Bei keiner der getesteten Frauen konnte eine sicher pathogene Mutation ermittelt werden. Wie an der erkrankten Frau ohne UV gezeigt werden kann, scheint das frühe Auftreten von Mammakarzinomen in dieser untersuchten Familie nicht konsequent mit der Insertionsmutation einher zu gehen.



**Abb. 26: Stammbaum der Familie 15**

Von 2 weiteren Familien mit dem IVS 20 + 60 ins12bp lagen nur vereinzelte Proben vor, die sich aufgrund ihrer geringen Anzahl nicht für “Cosegregationsanalysen” sowie aufgrund des Fehlens einer pathogenen Mutation nicht für “Co-Occurrence”-Analysen eigneten.

### 3.6.3.2 Histopathologische Befunde

Die Untersuchung histopathologischer Befunde lieferte keine eindeutigen Hinweise auf ein neutrales oder pathogenes Verhalten des UV:

Von Familie 13 lag nur ein histopathologischer Befund zu einer der erkrankten Personen vor. Diese Daten stammen nicht aus der Originalfassung eines Pathologie-Berichts. Es handelt sich vielmehr um Informationen, die im Rahmen eines Arztbriefes an einen niedergelassenen

Kollegen gerichtet sind. Da hier, wie auch im Fall der Familie 14, der Mutationsstatus der einzigen Patientin, zu der solche Befunde verfügbar waren, unbekannt ist, kann der jeweils vorliegende Befund nicht in die Klassifizierung des UV einbezogen werden.

Die Person 15.3, die sowohl an einem Mammakarzinom als auch einem Ovarialkarzinom erkrankt ist, ist Trägerin des UV. Zur Histopathologie des Mammakarzinoms wurden in einem Kurzarztbrief folgende Angaben gemacht: es wurde ein invasiv-duktales Wachstum des Tumors (pT1c) mit Tendenz zur intraduktalen Propagation beschrieben. Das “Grading” ergab eine Differenzierung, die dem G2-Stadium entspricht. Für die verschiedenen Hormonrezeptor-Scores im Tumorgewebe wurden folgende Werte ermittelt: ER: 4, PR: 10, Her2-neu: 0. Diese Befunde können nicht eindeutig einem für eine pathogene Mutation typischen (immun-)histopathologischen Bild zugeordnet werden. Dennoch zählen z.B. die genannte Wachstumsform sowie der relativ niedrige “score” für Östrogenrezeptoren zu den Charakteristika, die bei einer pathogenen Mutation in BRCA1 gehäuft gefunden werden. Das niedrige Tumorstadium (pT1c), die vergleichsweise gute Differenzierung des Gewebes sowie relativ hohe Progesteronrezeptor-“scores“ sprechen jedoch dagegen. Es fehlen Daten zur Mitoserate, dem Grad an Pleomorphie und der Anzahl an Proliferationsraten.

Bei der Person 15.45 wird ein pT2-Tumor beschrieben, dessen Differenzierungsgrad im Grading als G3 bewertet wurde. Mit einem Score von jeweils 6 wird der Hormonrezeptorstatus als Östrogen- und Progesteronrezeptor -positiv beschrieben. Außerdem wurde eine DCIS-Komponente beobachtet. Die Wachstumsrate wurde mit „stark proliferativ“ angegeben. Sowohl die hohe Proliferationsrate, als auch die relativ schlechte Differenzierung sind typische Charakteristika einer pathogenen BRCA1-Mutation. Das niedrige Tumorstadium sowie die positiven Rezeptor-“scores“ spiegeln dieses Bild nicht wider, so dass auch bei dieser Patientin kein eindeutiges Urteil über die histopathologischen Eigenschaften des Tumors gebildet werden kann.

Bei der beidseits an Mammakarzinomen erkrankten Person 16.1, bei der der UV nachgewiesen werden konnte, zeigte sich bei dem rechts gelegenen Tumor ein mäßig differenziertes (G2) Karzinom des Stadiums cT2 mit überwiegend invasiv-duktalem Wachstum. Die Hormonrezeptor-Scores betrugen für Östrogenrezeptoren IRS 6/12 und für Progesteronrezeptoren IRS 0/12, Her-2/neu negativ. Bei dem linksseitigen Tumor handelte es sich um ein invasiv-lobulär wachsendes Karzinom des Stadiums pT1b mit mäßiger

Differenzierung. Es wurde ein CLIS-artiges Wachstum im Randbereich konstatiert sowie folgende Rezeptorstatus: ER IRS 6/12, PR negativ, Her-2/neu negativ.

Die Ergebnisse beider histopathologischer Untersuchungen unterscheiden sich grundlegend in der Art des Tumorwachstums und stellen sich insgesamt heterogen dar. Sie entsprechen nicht einheitlich einer für pathogene BRCA1-Mutationen typischen Histopathologie.

Die histopathologischen Befunde stellen sich bei den untersuchten Familien uneinheitlich dar und liefern keine für die Klassifizierung des UVs entscheidenden Informationen.

#### 3.6.3.3 Bewertung des UV IVS 20 + 60 ins12bp

Aufgrund des Fehlens einer zusätzlichen pathogenen Mutation bei den Trägern des IVS 20 + 60 ins12bp waren keine Analysen zur “Co-Occurrence” möglich. Die erhobenen Daten zur “Cosegregation“ sind als Folge der geringen Anzahl zur Verfügung stehender Blutproben der jeweiligen Familienmitglieder für eine allgemein gültige Bewertung des UVs nicht ausreichend.

Eine eindeutige Beurteilung der histopathologischen Befunde erscheint aufgrund der Inhomogenität der Daten nicht realisierbar.

Eine Klassifizierung der Sequenzvariante ist zum heutigen Zeitpunkt mit den aktuell verfügbaren Materialien nicht möglich.

#### 3.6.4 Der UV BRCA1 (Exon 18) c.5253\_5258del6 p.W1712\_V1713del

Dieser UV wurde in der Düsseldorfer Tumorrisikosprechstunde bislang nur in einer Familie identifiziert. Diese ist auch die einzige in Leipzig dokumentierte Familie mit dieser seltenen Sequenzvariante.

In der Abb. 27 ist das Ergebnis der PCR-Analyse mit dem betreffenden BRCA1 Genfragment dargestellt.

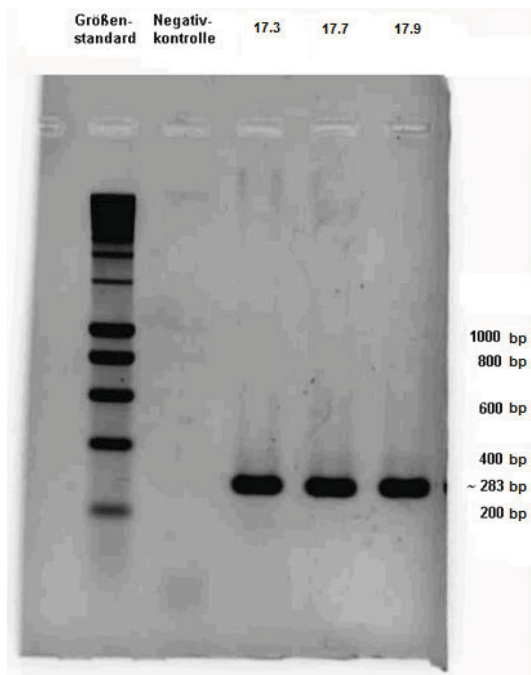


Abb. 27: PCR-Analyse des c.5253\_5258del6 p.W1712\_V1713del mit Darstellung der Elektrophorese

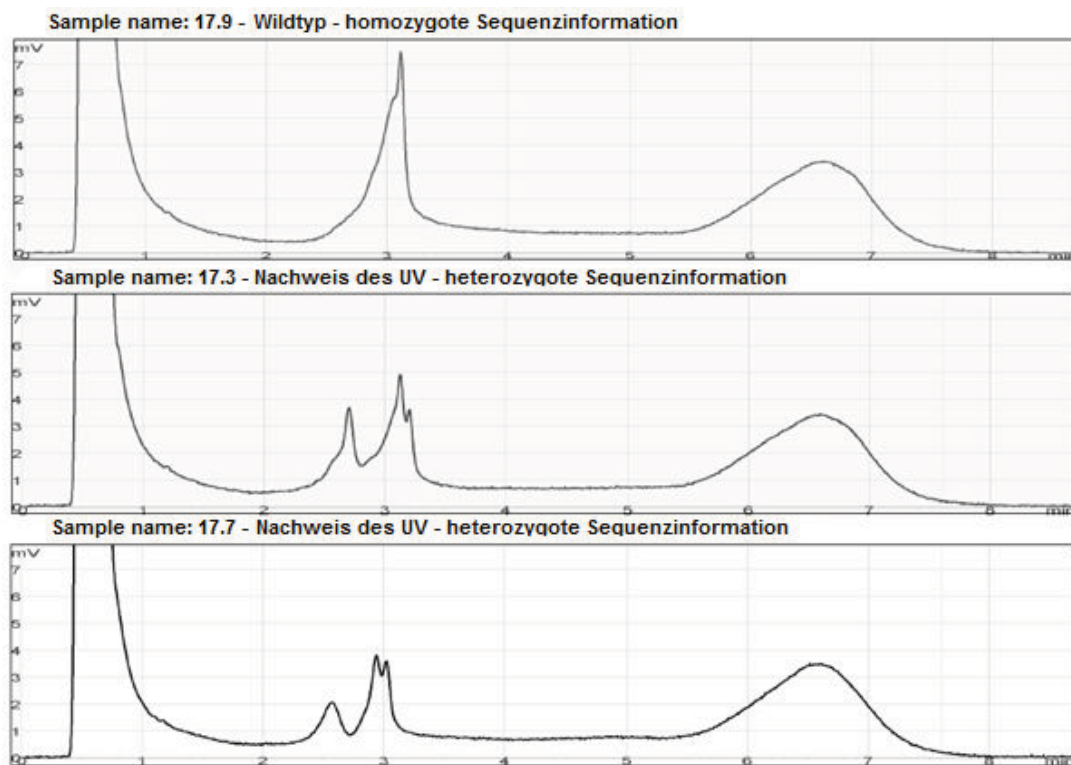
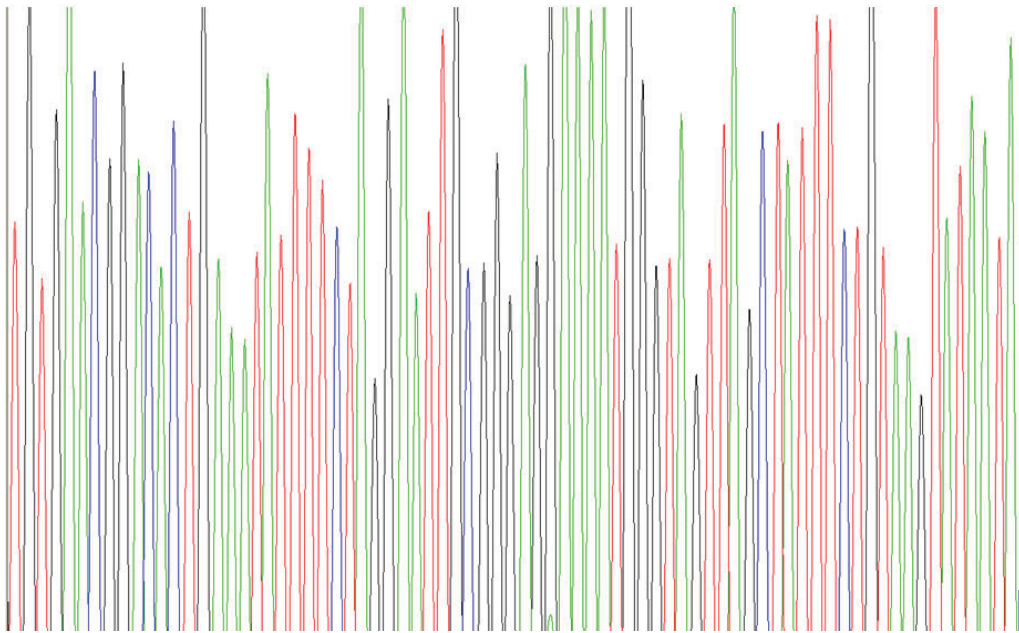


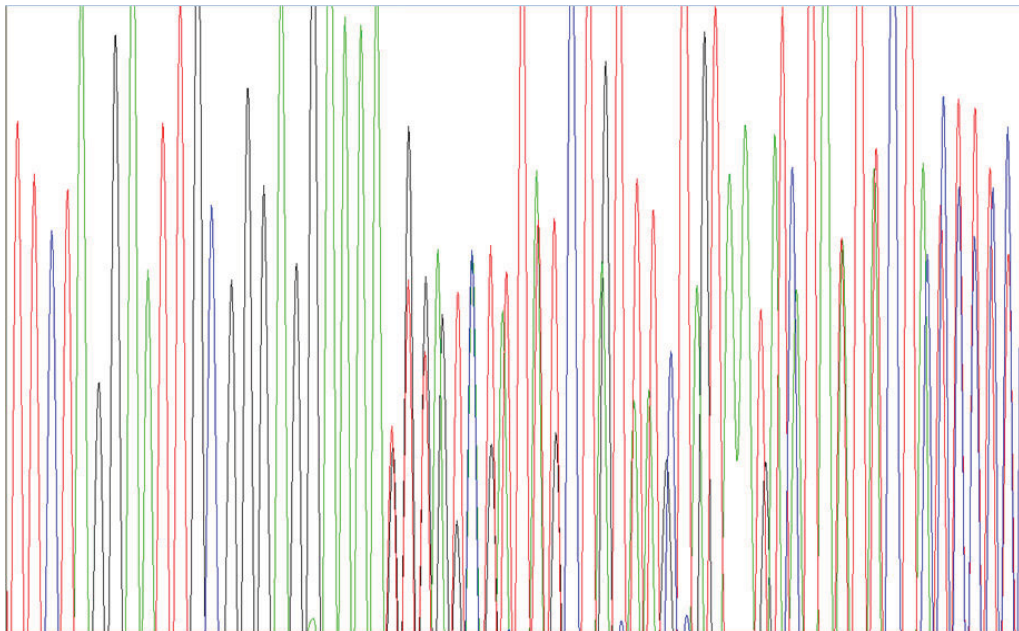
Abb. 28: DHPLC-Untersuchungsergebnisse zum c.5253\_5258del6 p.W1712\_V1713del

Die Abb. 28 zeigt sowohl den Nachweis des genotypischen Wildtyps (homozygote Sequenzinformation) als auch des c.5253\_5258del6 p.W1712\_V1713del (heterozygote Sequenz-information, „Doppelpeak“).

Die Ergebnisse der Sequenzierungsanalysen zum c.5253\_5258del6 p.W1712\_V1713del (Wildtyp sowie Nachweis des UV) sind in den Abb. A.13 und A.14 im Anhang dargestellt.



**Abb. 29: Ausschnitt des Sequenzierungsergebnisses (Wildtyp)**



**Abb. 30: Ausschnitt des Sequenzierungsergebnisses (Nachweis des UV c.5253\_5258del6 p.W1712\_V1713del)**

#### 3.6.4.1 “Co-Segregationsanalysen” zum UV BRCA1 (Exon 18) c.5253\_5258del6 p.W1712\_V1713del

65

Bei vier Frauen wurde die Diagnose eines Mammakarzinoms gestellt (1; 3; 7 und 15). Die Person 17.3 ist sowohl an einem Mamma- als auch an einem Ovarialkarzinom erkrankt, bei 17.10 wurden ein Corpuskarzinom des Uterus sowie ein Colonkarzinom diagnostiziert.

Bei zwei der betroffenen Frauen (17.1 und 17.10) konnte die c.5253\_5258del6 Mutation nachgewiesen werden und damit die Mutter (17.3) der Ratsuchenden ebenfalls als obligater “Carrier” identifiziert werden.

Es kann konstatiert werden, dass bei zwei an Brust- bzw. Eierstockkrebs erkrankten Frauen (17.3 und 17.7) die gesuchte Mutation mit hoher Wahrscheinlichkeit vorliegt. Dass die Person 17.10 mehrere mit einer pathogenen Mutation in BRCA1 assoziierte Karzinome (Uterus- und Colonkarzinom) aufweist, kann als Hinweis auf einen pathogenen Charakter des UV gewertet werden.

Bei der nicht erkrankten Schwester 17.9 (48 Jahre) der Ratsuchenden konnte die Mutation ausgeschlossen werden.

Die “Co-Segregationsanalyse” zeigt, dass das Auftreten der relevanten Tumorentitäten mit dem Vorliegen des UV einhergeht. In einem Fall konnte außerdem das Fehlen der Mutation bei Ausbleiben einer Tumorerkrankung mindestens bis zum 49. Lebensjahr nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse sind als Hinweise auf einen pathogenen Charakter der Sequenzvariante zu interpretieren.

#### 3.6.4.2 Histopathologische Befunde zum UV BRCA1 (Exon 18) c.5253\_5258del6 p.W1712\_V1713del

Von zweien der insgesamt vier Mammakarzinome lagen histopathologische Befunde vor. In beiden Fällen waren in den Präparaten sowohl für pathogene BRCA1-Mutationen typische (z.B. negative Rezeptorstatus, hohe Mitoserate und schlecht differenziertes Gewebe) als auch untypische Merkmale (z.B. Fehlen von medullären oder atypischen Wachstumsformen, z.T. positiven Rezeptorstatus sowie nur mäßiger Pleozytose und Lymphozyteninfiltration) vorzufinden. Dieses insgesamt uneinheitliche Bild ließ keine definitive Zuordnung der genannten Tumoreigenschaften zu den Charakteristika pathogener Mutationen zu.

#### 3.6.4.3 Bewertung des UV BRCA1 (Exon 18) c.5253\_5258del6 p.W1712\_V1713del

Die erläuterten Ergebnisse der selbst durchgeführten Untersuchungen sind als Hinweis für ein pathogenes Verhalten der Variante einzustufen, auch wenn sie ein solches nicht beweisen können. Unter Berücksichtigung der Lokalisation dieser Mutation in der funktionell bedeutenden BRCT-Domäne des BRCA1-Proteins (s. Diskussionsteil) ist mit hoher Wahrscheinlichkeit von einem pathogenen Charakter der Sequenzvariante auszugehen.

## 4. DISKUSSION

### 4.1 Bedeutung und Ziele der Arbeit

In bis zu 10% aller Fälle von Mammakarzinomen liegt der Tumorerkrankung eine genetische Prädisposition zugrunde. Meist stammen diese Patientinnen aus Familien, die durch zahlreiches oder frühes Auftreten von Mamma- und/oder Ovarialkarzinomerkrankungen charakterisiert sind. Zwischen 2000 und 4000 Neuerkrankungen in Deutschland werden jährlich auf eine vererbte Mutation in BRCA1 und/oder BRCA2 zurückgeführt [20].

Wird in molekulargenetischen Untersuchungen der Familien eines vorselektionierten Patientenkollektivs eine Mutation in den BRCA-Genen identifiziert, so sind dies in etwa der Hälfte der Fälle sicher zu bewertende pathogene Mutationen, in den übrigen handelt es sich um Sequenzveränderungen mit unklarer klinischer Bedeutung (UV) [10].

Diese Umstände verdeutlichen die Relevanz der im Rahmen dieser Arbeit vorgenommenen Klassifizierung ausgewählter Varianten. Insgesamt konnten, zwei (UV c.5075 G>A; UV c.4931 A>G) der insgesamt vier ausgewählten Varianten eindeutig klassifiziert werden. Beide wurden als neutrale Polymorphismen eingestuft. Bei den nicht klassifizierbaren Varianten (UV IVS20 + 60 ins12bp und BRCA1 (Exon 18): c.5253\_5258del6 p.W1712\_V1713del) ließ die unzureichende Verfügbarkeit fundierter Daten eine eindeutige Bewertung nicht zu. Eines der wesentlichen Ziele, nämlich die Klassifizierung von UVs zur Optimierung der Beratung von Patientinnen bzw. Ratsuchenden, konnte somit bei entsprechend umfangreicher Datenlage in der Hälfte der analysierten Fälle mit Erfolg durchgeführt werden. Das Ergebnis der Untersuchung zur Verfügbarkeit von für diese Klassifizierungen relevanten Daten wird im Folgenden näher erläutert.

### 4.2 Kritische Beurteilung von Methodik und Ergebnissen

Vergleichbar mit der Beschränkung auf einzelne labortechnische Untersuchungsmethoden, wie “Co-Segregations”- und “Co-Occurrence”-Analysen musste eine Auswahl der verfügbaren Literatur getroffen werden. Im Besonderen traf dies auf solche Sequenzvarianten zu, welche, wie der c.5075 G>A, zahlreich in der Fachliteratur beschrieben worden sind. Dabei sollten unter Berücksichtigung der Aktualität der Daten jene Materialien vorzugsweise

selektioniert werden, die sich durch möglichst aussagekräftige und – wenn vorhanden – verschiedenartige Untersuchungsansätze auszeichnen. Im Gegensatz dazu war die publizierte Datenlage bei anderen UVs, wie dem IVS 20 + 60 ins12bp, limitiert. Die verfügbaren Artikel zu den jeweiligen UVs unterschieden sich unter qualitativen und quantitativen Gesichtspunkten z.T. deutlich, so dass teilweise auf eine Klassifizierung des UVs verzichtet werden musste.

Des Weiteren musste in diesem Zusammenhang kritisch hinterfragt werden, inwieweit eine angestrebte Klassifizierung seltenerer Sequenzvarianten nach sorgfältiger Kosten-Nutzen-Abwägung sinnvoll erscheint und ob die für die Allgemeinheit im Vergleich geringere Relevanz des Ergebnisses den Aufwand hinsichtlich durchzuführender Untersuchungen rechtfertigt.

Eine weitere Problematik, die sich im Zuge der Bewertung sowohl eigener als auch fremder Untersuchungsergebnisse abzeichnete, war die Gewichtung unterschiedlicher Daten. Um Daten in eine Relation zueinander zu setzen, wurden von diversen Autoren, wie z.B. Goldgar et al., sogenannte “likelihood ratios” entwickelt. Die Ergebnisse verschiedener Tests werden in speziellen Rechenmodellen evaluiert, so dass ein Vergleich der Gesamtheit aller ermittelten Einzelergebnisse möglich wird. Aufgrund abweichender Untersuchungsmethoden können die vorliegenden “likelihood ratios“ nicht übernommen werden. Aufgrund dieser Rahmenbedingungen musste eine individuelle Evaluation der Einzelergebnisse vorgenommen werden. Eine Bewertung erfolgte anhand des eigens entwickelten Bewertungsschemas, jeweils unter Berücksichtigung aller vorliegenden Daten.

Um die Problematik bezüglich der Wertigkeit einzelner Klassifikationsmerkmale zu verdeutlichen, ist beispielhaft das Kriterium der Funktionsanalysen zu nennen. Z.B. in Hefezellkolonien mit der betreffenden Sequenzvariante wurden ausgewählte Funktionen des BRCA-Proteins überprüft. Zum heutigen Zeitpunkt sind jedoch nicht alle Funktionen des Proteins bekannt. Eine differenzierte Betrachtungsweise einer erhaltenen, verminderten oder fehlenden Funktion des Proteins ist unmöglich. Inwieweit die Ergebnisse, die mit Hilfe von Hefezellen oder Lymphozyten ermittelt wurden, auf *in-vivo* Bedingungen im Brustdrüsengewebe transferiert werden können, ist ebenfalls unklar. Dennoch sind die mit dem aktuellen Kenntnisstand zu den Funktionen des Proteins durchgeführten Tests als Hinweise auf den Charakter der Aberration zu bewerten.

Das Sammeln der Daten, die von den in der hiesigen Beratungssprechstunde betreuten Familien stammen, stellte sich teilweise problematisch dar. Die Stammbäume zahlreicher Familien, welche für weitergehende Analysen in Frage kamen, variierten in ihrem Umfang z.T. erheblich. Je kleiner sich der Stammbaum einer Familie darstellte und je weniger Blutproben von relevanten Familienmitgliedern vorlagen, desto schwieriger war es, aussagekräftige Bewertungen eigener Analysen wie die der “Co-Segregation” oder der “Co-Occurrence” vorzunehmen. Neben der Größe der untersuchten Familie wirkte somit auch die zur Verfügung stehende Menge an Blutproben der Personen als limitierender Faktor. Die zusätzliche Gewinnung von Blutproben weiterer, bislang nicht getesteter, Personen konnte aus ethischen Gründen nicht realisiert werden.

Es mag zahlreiche Ursachen für die defiziente Datenlage (z.B. histopathologische Befunde betreffend) geben. Im Hinblick auf die vertikale Verteilung von Karzinomen in den belasteten Familien ist zu bedenken, dass viele der Patientinnen bereits in den 70er und 80er Jahren oder früher operiert wurden. Hinzu kommt die Frage, ob zum damaligen Zeitpunkt überhaupt Untersuchungen durchgeführt wurden oder der Qualitätsstandard bei histopathologischen und immunhistochemischen Untersuchungen dem heutigen gleichgesetzt werden kann. Zu erwähnen ist die Tatsache, dass Kliniken die Befunde ihrer Patienten nur über einen begrenzten Zeitraum hinweg archivieren, so dass nach einem entsprechend langen Zeitintervall damit gerechnet werden musste, dass Daten nur noch unvollständig vorliegen oder nicht mehr existieren würden. Damit wird die limitierte Aussagekraft dieses Klassifikationskriteriums bei der Bewertung von UVs in dieser Arbeit als ein weiteres wesentliches Ergebnis evident.

## 4.3 Diskussion der Ergebnisse

### 4.3.1 Diskussion der Ergebnisse zum UV c.5075 G>A

Bei dieser Sequenzveränderung handelt es sich um einen UV des BRCA1-Suszeptibilitätsgens. Er ist in der C-terminalen-Region des Gens lokalisiert. Die c.5075 G>A missense-Mutation führt zum Austausch der Base Guanin zu Adenin in Codon 1652 und die Aminosäure Methionin wird durch Isoleucin ersetzt. Auffällig ist, dass diese Variante häufig bei den in Düsseldorf analysierten Familien diagnostiziert wurde. Er wurde in zehn Familien

diagnostiziert. In ebenfalls zehn Familien und somit gleich stark vertreten war nur die auch in BRCA1 lokalisierte UV-Mutation c.3238 G>A.

| BRCA  | References  | codon | aa change | effect | nucleotide change | Leipziger Beschreibung              | BIC          | in Leipzig erfasste Familien | UV_TF   | Bew. Krit. | Bewertung folgt Ref. |
|-------|-------------|-------|-----------|--------|-------------------|-------------------------------------|--------------|------------------------------|---------|------------|----------------------|
| BRCA1 | 4, 6, 8, 11 | 1652  | M1652I    | ms     | c.5075G>A         | BRCA1 (EXON 16): c.5075G>A p.M1652I | UV (23.3.08) | 173                          | neutral | 4          | 4, 8, 11             |

**Tabelle 12: Anwendung des Bewertungsmaßstabs für den c.5075 G>A-UV**

Die Datenlage zum c.5075 G>A präsentiert sich auffallend umfassend. Obwohl die Mehrheit der publizierten Daten [39; 40; 41; 42; 43; 44; 45; 46; 47; 48, s. Tabelle 12 und 13] für ein neutrales Verhalten des UV spricht, stellen sich die Studienergebnisse insgesamt inhomogen dar. Darüber hinaus wird der c.5075 G>A von der BIC-Datenbank weiterhin als UV bewertet. Diese Umstände gaben Anlass zu einer eigenständigen Untersuchung der Sequenzvariante mit dem Ziel der Klassifizierung. Gegenstand der Diskussion zum c.5075 G>A sollen vor allem diejenigen publizierten Daten sein, die die Klassifizierung als neutrale Variante nicht stützen. Die bei den o.g. 10 Studien verwendeten Klassifikationsmethoden umfassen ein Spektrum von insgesamt 7 verschiedenen Untersuchungsmerkmalen. Dazu zählen unter anderem Kriterien wie die “Co-Occurrence”. In den beiden Studien von Deffenbaugh et al. [40] und Tavtigian et al. [39] konnte ein gemeinsames Auftreten der Variante mit einer bekannten pathogenen Mutation auf verschiedenen Allelen gezeigt werden. Somit ist ein eindeutiges Indiz dafür gegeben, dass der UV einen neutralen Charakter aufweist.

Auffällig ist, dass in den Studien, die den UV abschließend nicht sicher als neutral einstufen [12; 49], Funktionsanalysen (z.B. Untersuchungen zur Proteinstruktur und -faltung) einen wesentlichen Beitrag zur Bewertung beitragen. Sowohl Lee et al. als auch Huyton et al. deuten die Ergebnisse dieser Untersuchungen als für pathogene Mutationen charakteristische Befunde. Andere Autoren (z.B. Carvalho et al. [44], Monteiro et al. [47], Mirkovic et al. [48]) hingegen erhalten mit Hilfe ihrer Funktionsanalysen dazu gegensätzliche Resultate und werten ihre Ergebnisse als Hinweis auf eine neutrale Variante.

Daraus lässt sich folgern, dass Funktionsanalysen kein eindeutiges Ergebnis im Hinblick auf die Klassifizierung des UV c.5075 G>A liefern können.

| <u>Quelle</u> | <u>Kriterium</u>                                                             | <u>Wertung als</u>                                |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| 12            | Frequenz<br>Konservierung<br>Funktion                                        | pathogen<br>neutral<br>pathogen                   |
| 39            | “Co-Occurrence”<br>Konservierung                                             | neutral<br>neutral                                |
| 40            | Frequenz<br>“Co-Occurrence”                                                  | neutral<br>neutral                                |
| 41            | Frequenz<br>Konservierung                                                    | neutral<br>neutral                                |
| 42            | “Co-Segregation”                                                             | neutral                                           |
| 43            | Funktion                                                                     | neutral                                           |
| 44            | Funktion                                                                     | neutral                                           |
| 45            | Funktion                                                                     | neutral                                           |
| 46            | LOH<br>Tumorstadium<br>Immunhisto / Patho<br>Familiäre Belastung<br>Frequenz | k. A.<br>neutral<br>neutral<br>neutral<br>neutral |
| 47            | Funktion                                                                     | neutral                                           |
| 48            | Funktion                                                                     | neutral                                           |
| 49            | Funktion                                                                     | (eher) pathogen                                   |

**Tabelle 13: Teilergebnisse der Literaturlauswertung zum UV c.5075 G>A – tabellarischer Überblick**

Lee et al. [12] bewerten den UV c.5075 G>A als „wahrscheinlich pathogene Mutation“ ohne eine konkrete Beurteilung vorzunehmen. Das den Frequenzanalysen dienende Kollektiv an Studienteilnehmern ist in seiner Größe stark limitiert und beschränkt sich geographisch gesehen auf eine in der Region um Los Angeles lebende Population. Eine durch diese Selektion bedingte “bias” kann nicht ausgeschlossen werden. Inwieweit die Daten somit für die europäische Bevölkerung repräsentativ sind, ist nicht eindeutig.

Die Problematik der Interpretation von Funktionsanalysen wurde bereits erläutert. Diese Untersuchungen wurden auch von Lee et al. [12] als Klassifikationskriterium benutzt. Aufgrund unzureichender Kenntnisse über die Funktionen von BRCA1 und BRCA2 sind diese kritisch zu hinterfragen und bei der Bewertung des UV als nicht „harte“ Kriterien zu werten. Sowohl die Frequenz- als auch die Funktionsanalysen stützen das Gesamtergebnis dieser Studie, den UV als wahrscheinlich pathogene Mutation zu klassifizieren.

Es fällt auf, dass die als Teilergebnis in die Bewertung eingehende Beurteilung anhand des erprobten und bewährten Kriteriums des Konservierungsgrades - im Gegensatz zu den zuvor genannten Methoden – eher für ein neutrales Verhalten des UV spricht.

Huyton et al. [49] berichten, dass der Austausch der Aminosäure Methionin durch Isoleucin zu strukturellen, insbesondere die Faltung betreffenden, Veränderungen des Proteins führt. Dies ist nicht mit den Ergebnissen zahlreicher anderer Studien [12; 41; 43; 39; 48] zu vereinbaren, dass die Sequenz eher geringgradig konserviert ist und beide Aminosäuren derselben Gruppe von hydrophoben Aminosäuren zuzuordnen sind. Funktionelle Auswirkungen sind aus den genannten Gründen als unwahrscheinlich anzusehen.

In allen der hier aufgeführten Quellen wird von einer neutralen Sequenzveränderung ausgegangen oder es werden weitere Untersuchungen aufgrund unzureichender oder widersprüchlicher Ergebnisse gefordert. Letzteres mag auch einen Grund darstellen, weshalb der Status dieser Variante als UV bis heute in der BIC-Datenbank [19] aufrecht erhalten wird. In keiner der angeführten Studien wird der betreffende UV als pathogen eingestuft.

Eine große Mehrheit der Studien, nämlich Tavtigian et al. [39], Deffenbaugh et al. [40], Arnold et al. [41], Beristain et al. [42], Ang et al. [43], Carvalho et al. [44], Coyne et al. [45], Osorio et al. [46], Monteiro et al. [47] sowie Mirkovich et al. [48] bewerten den UV übereinkommend als neutral. Auch die Aspekte betreffend, die Lee et al. aufgrund widersprüchlicher Ergebnisse zum Gesamturteil “unclassified” leiteten, wie z.B. der Konservierungsgrad, A-GVGD oder Funktionsanalysen, konnten oben genannte Autoren eindeutige Ergebnisse liefern, die die Einstufung als „neutral“ unterstützen.

Eine solche Bewertung des c.5075 G>A deckt sich mit der vorgenommenen Klassifizierung als neutrale Variante. Die eigenen Ergebnisse, die das apathogene Verhalten des c.5075 G>A beweisen, werden somit zusätzlich durch einen überwiegenden Anteil der Literaturdaten gestützt.

#### 4.3.2 Diskussion der Ergebnisse zum UV c.4931 A>G

Der UV c.4931 A>G kommt in einer Familie des Düsseldorfer Familienkollektivs vor. In der BIC-Datenbank [19] sind hierzu drei Einträge registriert. Diese Sequenzveränderung ist eine synonyme Mutation. D.h., dass durch die Mutation keine Veränderung der durch das Codon 1604 kodierten Aminosäure Glutamin verursacht wird. Ebenso wie der UV c.5075 G>A ist auch der c.4931 A>G im Exon 16 zu finden (s. Tabelle 14).

| BRCA  | Reference | codon | aa change | effect | nucleotide change | Leipziger Beschreibung                | BIC          | in Leipzig erfasste Familien | UV_TF | Bew. Krit. | Bewertung folgt Ref. |
|-------|-----------|-------|-----------|--------|-------------------|---------------------------------------|--------------|------------------------------|-------|------------|----------------------|
| BRCA1 | 6         | 1604  | Q1604Q    | syn    | c.4931A>G         | BRCA1 (EXON 16): c.4931A>G p.Q1604Q - | UV (23.3.08) | 6                            | UCV   | 5          |                      |

**Tabelle 14: Anwendung des Bewertungsmaßstabs für den c.4931 A>G-UV**

Im Vergleich zum UV c.5075 G>A präsentierte sich die publizierte Datenlage wenig umfangreich. Einer der Hauptgründe dürfte in dem selteneren Vorkommen des UV c.4931 A>G bestehen. Das seltenere Auftreten im Düsseldorfer Patientenkollektiv wird durch die geringe Anzahl der in der BIC-Datenbank [19] erfassten Fälle (n=3) widerspiegelt (vgl. c.5075 G>A (n=38)).

Insgesamt wurden im Rahmen der Untersuchungen 7 Studien berücksichtigt, die sich mit dem UV c.4931 A>G befassen. Das besonders aussagekräftige Kriterium der “Co-Occurrence” wurde ausschließlich von Judkins et al. [50] angeführt. Judkins et al. [50] konnten keinen Nachweis für das gemeinsame Vorkommen der Variante mit einer bekannten pathogenen Mutation liefern. Das Patientenkollektiv wurde mit mehr als 55.000 Patientinnen vergleichsweise groß gewählt. Das wird auch durch die Anzahl (> 20) der innerhalb dieser Gruppe ermittelten Patientinnen mit dem UV verdeutlicht. Dass die Untersuchungen zur “Co-Occurrence” kein positives Ergebnis lieferten, beweist nicht das Vorliegen einer pathogenen Mutation. Sie kann jedoch als Hinweis auf einen nicht-neutralen Charakter der Variante gewertet werden, der in Zusammenschau mit anderen Testergebnissen in die abschließende Bewertung einbezogen werden sollte.

Keine Berücksichtigung in den genannten Studien fanden die möglichen Auswirkungen der synonymen Mutation auf Veränderungen von sogenannten “exonic splicing regulatory elements”. Dabei handelt es sich um spezielle Genabschnitte, die wichtige Funktionen für das “Splicing”, also die Prozessierung von RNA, inne haben.

Wie durch entsprechende Analysen des kodierten Proteins gezeigt werden konnte, hat die Substitution der Base keinen Einfluss auf die Art der kodierten Aminosäure und somit keine Beeinflussung der Aminosäuresequenz des Proteins zur Folge. Dennoch bleibt auch unter Berücksichtigung aktueller Studien unklar, inwieweit synonyme Mutationen wie die des UV c.4931 A>G Einfluss auf bestimmte Funktionen von Gensequenzen haben. Im Zusammenhang mit dem c.4931 A>G sind aufgrund der zentralen Lage des UV im Exon “exonic splicing regulatory elements” von Bedeutung. Diese Elemente können entweder eine verstärkende (“exonic splicing enhancers”, ESE) oder eine inhibierende Wirkung (“exonic splicing silencers“, ESS) auf benachbarte Spleißstellen ausüben. ESE und ESS funktionieren in Form einer Aktivierung von *trans*-Spleißfaktoren, die eine Spliceosom-Bildung aktivieren bzw. verhindern. Diese “exonic splicing regulatory elements” können auch im Rahmen einer stillen Mutation funktionell bedeutsame Veränderungen aufweisen.

Durch die Substitution von Guanin durch Adenin könnte ein “exonic splicing regulatory element” eingeführt worden sein, so dass als mögliche Folge eine durch aberrantes Spleißen bedingte Beeinträchtigung der Proteinfunktion resultieren könnte.

Das Beispiel zeigt, dass synonyme SNP (= “single nucleotid polymorphisms”) – obwohl sie zu den häufigsten und vielfältigsten Sequenzvariationen zählen und somit einen nicht-pathogenen Charakter als wahrscheinlich erscheinen lassen – funktionelle Eigenschaften des Gens beeinflussen können. Synonyme Mutationen können folglich nicht mit „stummen“, wirkungslosen Mutationen gleichgesetzt werden.

In mehreren Studien wurden für den c.4931 A>G UV nicht alle Untersuchungsmethoden angewendet. So verzichteten Lee et al. [12] sowie Borg et al. [51] bei der Untersuchung des UV c.4931 A>G auf Analysen zum Konservierungsgrad der Sequenz bzw. auf Funktionsanalysen. Gründe für das Auslassen dieser Untersuchungen wurden nicht angegeben. Es bleibt fraglich, ob dem UV in diesen Fällen allein aufgrund der Art seiner Veränderung, nämlich der einer synonymen Mutation, ein neutraler Charakter unterstellt wurde. Dies würde allerdings einer wissenschaftlich begründeten Arbeitsweise widersprechen.

In den meisten Studien [12; 51; 52; 53] stellen Untersuchungen zur Frequenz des UV die – zum Teil alleinige – Grundlage bei der Beschreibung bzw. Beurteilung der Sequenzvariante dar. Keine der einbezogenen Studien kommt zu dem eindeutigen Urteil, den UV als neutral

oder pathogen zu klassifizieren. Die Klassifizierung des UV c.4931 A>G auf der Basis eines einzigen Kriteriums wie z.B. dem Vergleich der Häufigkeit der Variante in Erkrankten und Personen einer Vergleichspopulation wäre ohnehin als problematisch zu beurteilen gewesen. Verdeutlicht wird dies durch den Umstand der oft stark limitierten Anzahl einbezogener Personen und der Beschränkung auf ein möglicherweise “bias“-behaftetes, selektionsiertes Kollektiv an Personen, wie z.B. bei der Auswahl von Kontrollpopulationen.

Die Studie von Judkins et al. [50] unterscheidet sich insofern von den übrigen Auswertungen, als sie als einzige den Versuch der Beurteilung des UV anhand von “Co-Occurrence“-Analysen beinhaltet.

Im Gegensatz zu dieser Studie konnte im Rahmen eigener Untersuchungen das gemeinsame Auftreten einer als sicher pathogen nachgewiesenen Mutation und des c.4931 A>G auf verschiedenen Allelen gezeigt werden. Dies beweist das neutrale Verhalten des UV.

Histopathologische Befunde erbrachten keinen Zugewinn an bewertungsrelevanten Informationen. Die Ergebnisse immunhistochemischer Untersuchungen konnten nicht ohne Weiteres in die abschließende Beurteilung des c.4931 A>G – UV einbezogen werden: Grund dafür ist die Tatsache, dass die hier verwendeten Informationen der Familie 11 nicht aus einem originalen Pathologiebefund stammen, sondern aus herkömmlichen Briefwechseln der involvierten Ärzte aus dem Jahr 1980. In diesen werden die im Zusammenhang mit der Hormonrezeptorbestimmung ermittelten Konzentrationen für Östrogen- und Gestagenrezeptoren pauschal mit Werten zwischen 10 und 100 fmol/mg Cytosolprotein angegeben. Nach heutigem Wissensstand gilt, dass ab einer Konzentration von 10 fmol/mg für Östrogen und 20 fmol/mg für Progesteron der Test als positiv bewertet wird. Dadurch, dass der hier angeführte Bereich zwischen 10 und 100 fmol/mg Protein liegt, ist keine eindeutige Aussage zum Hormonrezeptorstatus möglich. Es kann also nicht geklärt werden, ob die Befunde in diesem Fall der typischen Immunhistochemie eines Karzinoms als Folge einer pathogenen BRCA-Mutation entsprechen oder der einer neutralen Variante. Insgesamt zeigen sich in den Befunden mehrere Anzeichen eines neutralen Verhaltens der c.4931 A>G – Mutation.

#### 4.3.3 Diskussion der Ergebnisse zum UV IVS 20 + 60 ins12bp

Bei dem UV handelt es sich um eine “intervening sequence mutation” innerhalb des Introns 20 von BRCA1, nämlich um eine Insertion von 12 Basenpaaren an der Nukleotidposition c.5396+60. In diesem Fall sind die 12 Basenpaare mit der Sequenz GTA TTC CAC TCC eingefügt. Die Entstehung oder die Veränderung einer bereits vor der Insertion der Nukleotide existierenden und für den Prozess des “Splicing” bedeutsamen intronischen Gensequenz ist nicht sicher auszuschließen und muss bei der Beurteilung des UV berücksichtigt werden.

Der IVS 20 + 60 ins12bp wurde im Düsseldorfer Patientenkollektiv bis heute in vier verschiedenen Familien (Stand 2008) nachgewiesen. In der BIC-Datenbank [19] wurde der UV mit den 2 genannten Nukleotidsequenzen bislang insgesamt 33mal erfasst. Von Seiten der BIC-Datenbank sind keine weiteren Informationen zu Referenzliteratur, auf der das Urteil UV basiert, verfügbar.

Die Anzahl publizierter Studien, die sich mit der Häufigkeit bzw. der Pathogenität des IVS 20 + 60 ins12bp befassen, ist gering. Um gleichwohl ein umfassendes Urteil zu diesem UV bilden zu können, wurden die Ergebnisse ausgewählter Analysen einer anderen, eng benachbarten und ebenfalls 12bp langen Insertionsmutation im Intron 20 von BRCA1 herangezogen. Eine unmittelbare Übertragbarkeit der Ergebnisse des IVS 20 + 48 ins12bp auf den hier behandelten UV ist nicht gegeben. Dennoch dienen die Ergebnisse dazu, Einblicke in die grundsätzliche Problematik der Bewertung intronischer Mutationen dieses Genabschnitts zu gewinnen.

Eine Studie, die den IVS 20 + 48 ins12bp mit der Insertion der Basenpaare 5'GTA TTC CAC TCC3' beschreibt, ist jene von Robledo et al. [54]. Es wird berichtet, dass der UV bei einem 44 Jahre alten männlichen Patienten mit Mammakarzinom beobachtet wurde. Bei diesem Patienten wurde keine familiäre Vorbelastung mit Mammakarzinomen eruiert. Bei den Untersuchungen einer weniger als 100 Personen umfassenden Kontrollpopulation wurde der IVS 20 + 48 ins12bp bei einer weiteren männlichen Person nachgewiesen, so dass eine Frequenz der Variante von etwa 1% angenommen wird. Dies stimme in etwa mit der von

Krzyzosiak [55] et al. angegebenen Häufigkeit des Auftretens der Sequenzvariante in einer polnischen Kontrollpopulation von ca. 2% überein.

Weiter wird berichtet, dass der betroffene männliche Patient außer der Sequenzvariante unbekannter Signifikanz eine als neutral bekannte Variante in BRCA1 aufweist. Dabei handelt es sich um den im Exon 13 lokalisierten Polymorphismus c.4427 C>T, für den der Patient heterozygot ist. Bei weiterführenden Analysen dieses Genabschnitts mit Hilfe von cDNA wurde festgestellt, dass statt der in der genomischen DNA nachgewiesenen Heterozygotie eine homozygote Form dieser Variante vorlag. Robledo et al. deuten dies als mögliche Folge einer durch die intronische Variante IVS 20 + 60 ins12bp bedingten Instabilität des Transkripts. Es wird betont, dass für eine Schlussfolgerung auf den Charakter des UV weitere Untersuchungen, insbesondere auch der Familienanamnese sowie der Lage von UV und Polymorphismus zueinander unverzichtbar seien.

Untersuchungen zur möglichen Instabilität des Transkripts wurden auch von Kozlowski et al. [56] durchgeführt. Im Gegensatz zu Robledo et al. [54], welche nicht den Nachweis liefern konnten, dass die beobachtete einzige Variante des Transkripts von dem BRCA1-Allel mit der Insertion stammte, wird in dieser Studie berichtet, dass mit Hilfe von cDNA bei einem anderen Patienten mit dem IVS 20 + 48 ins12bp ebenfalls ein einzelnes BRCA1-Transkript ermittelt wurde, welches nachweislich von dem Allel stammt, das die Insertionsmutation trägt. Dies erfolgte anhand von molekulargenetischen Untersuchungen hinsichtlich des Nachweises des außer der Insertion vorkommenden Polymorphismus c.3667 A>G in Exon 11 im jeweiligen Transkript. Die Ergebnisse deuten auf eine Transkriptinstabilität hin, jedoch wird von den Autoren nur spekuliert, welcher Mechanismus diesem Phänomen zugrunde liegen könnte: Diskutiert werden u.a. der “loss of transcript” (= LOT) des nicht die intronische Variante kodierenden Allels, sowie der “gain of transcript” (=GOT) mit Überexpression der intronischen Mutation. Es wird betont, dass beide Möglichkeiten auch durch eine andere, bislang noch nicht detektierte, pathogene Mutation bedingt sein könnten, welches einen apathogenen Charakter der Insertionsmutation unterstellen würde. Um ein sämtliche Möglichkeiten berücksichtigendes Urteil zu dieser Problematik fällen zu können, ist auch die zu untersuchende Variante selbst als Ursache der beschriebenen Instabilität in Betracht zu ziehen. Eine erhöhte Expression (GOT) wäre charakteristisch für eine neutrale Sequenzvariante. Diese vermehrt transkribierten, apathogenen Veränderungen der Gensequenz sind nicht selten. Eine verminderte Expression des anderen BRCA1-Allels (LOT)

spricht dagegen für eine pathogene Mutation. Obwohl diese Fragen unbeantwortet bleiben, sind die ermittelten Ergebnisse bezüglich ihrer Qualität und somit ihrer Aussagekraft als hochwertiger anzusehen als solche von Robledo et al. In ihrer Grundaussage stimmen die Studien überein.

Dörk et al. [57] konnten keine Belege für einen regulatorischen Effekt des IVS 20 + 48 ins12bp erbringen. Aufgrund der bei einer Patientin außer dem UV parallel bestehenden neutralen Variante Ser-1613-Gly in Exon 16 konnte gezeigt werden, dass beide Allele von BRCA1 in lymphozytärer mRNA exprimiert werden. Somit unterscheidet sich das Ergebnis von denen Robledos und Kozlowskis. Die eingeschränkte Übertragbarkeit der Ergebnisse, die mit Hilfe von Lymphozyten ermittelt wurden, auf Auswirkungen der Sequenzvariante im Brustdrüsengewebe muss in allen genannten Fällen berücksichtigt werden. Darüber hinaus gilt es die Abhängigkeit der Expression in mRNA von physiologischen Rahmenbedingungen wie z.B. dem Zellzyklus in der Interpretation der Ergebnisse zu beachten. Inwieweit solche Umgebungsfaktoren den *in-vivo*-Bedingungen von Brustdrüsengewebe entsprechen, kann nur spekuliert werden.

Scholl et al. [58] stützen mit ihren Analysen die Annahme, dass beide BRCA1-Allele von Trägern des UV exprimiert werden. Dies spricht gegen einen regulatorischen Einfluss der Variante auf die Genexpression.

Die verfügbare Literatur zum IVS 20 + 60 ins12bp zeigte sich wenig umfangreich. Ein grundsätzliches Problem bei der Auswertung der angegebenen Literatur ist der Umstand, dass mehrere verschiedene Insertionssequenzen unter der Bezeichnung „ins12bp“ zusammengefasst werden. Eine weitere Differenzierung erfolgt in der aktuellen Literatur nicht. Dass eine Abweichung der Sequenzen voneinander in nur einer einzelnen Base zu einer vollkommen anderen Beurteilung der Pathogenität der Variante führen kann, muss berücksichtigt werden.

In keiner der verfügbaren Studien, die sich mit dem genannten UV befassen, wurde der Versuch einer Klassifizierung dieser Variante unternommen. Die Untersuchungsmerkmale, mit denen der UV jeweils beschrieben wird, erreichen nicht die Breite des Spektrums, welche bei anderen Sequenzvarianten angetroffen wird. Die angeführten Kriterien, die zur Beurteilung selbiger angewendet wurden, umfassen keine Aspekte, die als „harte Kriterien“

angesehen werden. Die Literaturrecherche deckte somit sowohl quantitative als auch qualitative Defizite der verfügbaren Artikel auf.

Die herausragende Bedeutung intronischer Mutationen bei der Beeinflussung sogenannter “splice-sites” wurde in keinem der publizierten Artikel bei der Bewertung des IVS 20 + 60 ins12bp berücksichtigt. Dadurch, dass die Insertion der 12 Basenpaare 60 Basenpaare von dem nächstgelegenen Exon entfernt ist, ist eine Interferenz mit einer “splice-site” in unmittelbarer Nähe zur Grenze zwischen Intron und Exon, unwahrscheinlich. Dennoch kann eine solche Auswirkung nur durch den Nachweis des Fehlens einer solchen “site” an der betreffenden Stelle bzw. durch die fehlende Beeinflussung einer bestehenden “Splice”-Stelle erbracht werden. Dies ist bislang nicht erfolgt.

Die geringe Menge vorhandener Blutproben von Familienmitgliedern aus betroffenen Familien für Untersuchungen der “Co-Occurrence” und der “Co-Segregation” machte eine eigenständige Klassifizierung der Variante unmöglich. Insbesondere ist die Fragestellung von Interesse, ob erkrankte Frauen aus Familie 5, die bereits verstorben sind, Träger des UV waren. Dadurch, dass der UV bei keinem nicht-erkrankten Familienmitglied gefunden wurde, kann nicht gezeigt werden, dass der UV auch ohne Assoziation zu Fällen von Mammakarzinomen vorkommt. Die molekulargenetische Untersuchung weiterer Personen der beiden einbezogenen Familien wäre für eine umfassende Beurteilung erforderlich gewesen.

Weiterhin stellten sich die Befunde histopathologischer Untersuchungen unvollständig und teilweise widersprüchlich dar. Die angestrebte Klassifizierung des UV kann mit Hilfe der vorliegenden Daten derzeit nicht realisiert werden und wird somit Gegenstand zukünftiger Untersuchungen bleiben.

#### 4.3.4 Diskussion der Ergebnisse zum UV BRCA1 (Exon 18): c.5253\_5258del6 p.W1712\_V1713del

Bei dem UV c.5253\_5258del6 p.W1712\_V1713del handelt es sich um eine Mutation, die die Deletion von 6 Basenpaaren in einem codierenden Anteil (Exon 18) von BRCA1 umfasst. Die beiden deletierten Aminosäuren befinden sich in der BRCT-Domäne des BRCA1-Proteins. Es handelt sich bei der betroffenen Struktur um eine  $\beta$ 4-Faltblattstruktur der N-terminalen BRCT-repeats.

| BRCA  | Reference | codon | aa change      | effect | nucleotide change | Leipziger Beschreibung BIC                        | in Leipzig erfasste Familien | Leipziger Gruppierung/ Bewertung | UV_TF | Bew. Krit. | Bewertung folgt Ref. |
|-------|-----------|-------|----------------|--------|-------------------|---------------------------------------------------|------------------------------|----------------------------------|-------|------------|----------------------|
| BRCA1 |           | 1712  | W1712_V1713del | ifdel  |                   | BRCA1 (EXON 18): c.5253_5258del6 p.W1712_V1713del | 1                            | UV                               | UCV   | 0          |                      |

**Tabelle 15: Anwendung des Bewertungsmaßstabs für den c.5253\_5258del6 p.W1712\_V1713del**

Die Literaturrecherche erbrachte keinerlei Artikel, die im Kontext der Diskussion der vorgenommenen Bewertung des UVs einen Informationsgewinn bedeutet hätten (vgl. Tabelle 15). Der Umstand lässt sich u.a. auf die vergleichsweise geringe Prävalenz dieser Variante zurückführen. Dies wird durch die geringe Anzahl an Familien mit dieser Sequenzvariante im Kollektiv von Familien der Düsseldorfer Tumorrisikosprechstunde (nur eine Familie) widerspiegelt.

Aufgrund dieser Ausgangssituation wurden für die Diskussion der Ergebnisse solche Artikel herangezogen, welche sich mit Varianten, die in der näheren Umgebung der Deletionsmutation lokalisiert sind, befassen.

Zahlreiche benachbarte Sequenzvarianten, welche ebenfalls einen Einfluss auf die BRCT-Domäne haben, wurden von diversen Forschungsgruppen bereits zuvor als pathogen klassifiziert. Die Bewertungen von vier solcher Missense-Mutationen sollen im Folgenden kurz vorgestellt werden: Sowohl die Mutation R1699W als auch A1708E wird in der BIC-Datenbank (Stand: 07.04.2011) [19] als pathogen klassifiziert. Diese Einstufung erfolgte auf der Grundlage einer Vielzahl verschiedener Studien, welche in ihrer Gesamtheit ein breites Spektrum an unterschiedlichen Klassifikationsmethoden aufweisen.

Die Mutation G1738R, welche in der BIC-Datenbank [19] derzeit noch als unklassifiziert bezeichnet wird (Stand: 07.04.2011), wird von Chenevix-Trench et al. [10] als pathogen bewertet. Ebenso sehen Autoren wie Easton et al. [33] und Anagnostopoulos et al. [59] Anzeichen für pathogene Eigenschaften der Sequenzaberration.

Wie auch bei der Variante G1738E bewerten sowohl Williams et al. [35] als auch Carvalho et al. [60] die Effekte der G1738R-Mutation auf die Proteinstruktur als hochgradig destabilisierend.

Die BRCT-Domäne ist für die Ausbildung einer Faltstruktur des Proteins von zentraler Bedeutung. Wie Caldecott [61] konstatiert, ist diese spezielle räumliche Anordnung von Strukturen des Proteins für die Bindung an andere Proteine sowie die daraus resultierende Wechselwirkung mit diesen von hohem Stellenwert.

Die aus der fehlenden Fachliteratur zu dem beschriebenen UV resultierende Datenlage ist als problematisch zu beurteilen. Aus den weiteren angeführten Artikeln zu benachbarten Mutationen können jedoch wichtige Erkenntnisse gezogen werden. Diese machen einen pathogenen Charakter der Variante wahrscheinlich, liefern jedoch nicht den notwendigen Beweis.

Die aus der Literatur angeführten zahlreichen Hinweise auf einen pathogenen Charakter der Deletionsmutation werden durch die eigene “Co-Segregationsanalyse” gestützt.

Ausschlaggebend für die Entscheidung zur Beibehaltung der Bezeichnung als UV war der Umstand, dass im Zuge der Bewertung der Sequenzaberration eine Beschränkung auf sehr wenige relevante Aspekte erfolgen musste. Das Vorliegen einer pathogenen Mutation konnte nicht bewiesen werden.

#### 4.4 Schlussfolgerung

Anhand einer systematischen Vorgehensweise war es möglich, zwei von vier UVs zu charakterisieren. Im Zusammenhang mit der großen Zahl weiterer bislang noch nicht klassifizierter Sequenzvarianten wird die Charakterisierung solcher Varianten auch zukünftig

einen zentralen Gegenstand der Forschung darstellen. Da zahlreiche der bestehenden Methoden zur Klassifizierung von UVs problembehaftet sind, ist die Entwicklung neuer Kriterien wünschenswert.

## Literaturverzeichnis

- 1     Stauber M, Weyerstahl T  
Mammakarzinom, In:  
Duale Reihe: Gynäkologie und Geburtshilfe  
3., aktualisierte Auflage; 2007: 371-395  
Thieme Verlag; Stuttgart, Deutschland
- 2     Beckmann MW, Lux MP  
Hereditäres Mammakarzinom - Prädiktive Diagnostik und präventive Maßnahmen.  
Der Onkologe, 2004; 10: 20-28
- 3     Krebs in Deutschland 2003-2004 - Häufigkeiten und Trends; Berlin, Deutschland:  
Robert Koch-Institut / Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland  
e.V., 2008  
(Abgerufen am 20.7.2008 unter:  
<http://www.krebsregister.saarland.de/publikationen/PDF/KID2008.pdf>)
- 4     Konsensus-Konferenz der „Konzertierten Aktion zur Brustkrebsfrüherkennung in  
Deutschland“; Berlin, Deutschland:  
Konsensusberichte der Deutschen Gesellschaft für Senologie, 2000  
(Abgerufen am 17.03.2010 unter:  
[http://www.senologie.org/konsensusberichte/konsensusberichte\\_frueherkennung2000.p  
hp?PHPSESSID=cfc33733accf11d8b755ce8935f6c556](http://www.senologie.org/konsensusberichte/konsensusberichte_frueherkennung2000.php?PHPSESSID=cfc33733accf11d8b755ce8935f6c556))
- 5     Wawrzyn H, Resch HD  
Brustkrebs: Karzinogenese und Prävention unter Berücksichtigung hormoneller und  
molekulargenetischer Aspekte - ein Paradigmenwandel.  
Journal für Menopause, 1999; 6 (2) (Ausgabe für Deutschland) 21-41
- 6     Fischer N  
Immunhistochemischer Nachweis des Retinoblastomgenproduktes und seine Bedeutung  
als Prognosefaktor bei Patientinnen mit primärem Mammakarzinom.  
Medizinische Dissertation, Universität Aachen, 2006
- 7     Beckmann MW, Fasching PA, Gall C et al.  
Genetische Risikofaktoren des Mammakarzinoms.  
Der Gynäkologe, 2002; 35: 527-536
- 8     Buselmaier W, Tariverdian G  
Chromosomenstörungen - Mammakarzinom, In:  
Humangenetik,  
4. Auflage; 2007: 170-171  
Springer Verlag, Heidelberg

- 9 Kuschel B, Köchli OR, Niederacher D et al.  
Hereditäre Karzinomsyndrome in der Frauenheilkunde: Was der Praktiker wissen sollte!  
Schweizerische Medizinische Wochenschrift, 2000; 130: 362-375
- 10 Chenevix-Trench G, Healey S, Lakhani S et al.  
Genetic and Histopathologic Evaluation of BRCA1 and BRCA2 DNA Sequence Variants of Unknown Clinical Significance.  
Cancer Research, 2006; 66 (4): 2019-2027
- 11 Betz B  
Molekulare Untersuchung der Tumorsuppressorgene *BRCA1* und *BRCA2* bei familiären und sporadischen Mamma- und/oder Ovarialkarzinomen.  
Medizinische Dissertation, Universität Düsseldorf, 2000
- 12 Lee E, McKean-Cowdin E, Ma H et al.  
Evaluation of unclassified variants in the breast cancer susceptibility genes BRCA1 and BRCA2 using five methods: results from a population-based study of young breast cancer patients.  
Breast Cancer Research, 2008; 10; R19
- 13 Passarge E  
The breast cancer susceptibility gene BRCA1 / The breast and ovarian susceptibility gene BRCA2, In:  
Color Atlas of Genetics  
3rd Edition, 2006  
Thieme Verlag, Stuttgart  
(Abgerufen am 2.8.2008 unter  
<http://cancergenetics.files.wordpress.com/2007/07/brca.jpg>)
- 14 Lancaster JM, Carney ME, Futreal PA  
BRCA 1 and 2 - A Genetic Link to Familial Breast and Ovarian Cancer.  
Medscape women's health, 1997; 2 (2): 7
- 15 Aba-Kircin, F  
Risikoberechnungsverfahren für die Entstehung eines Mammakarzinoms und das Vorliegen einer prädisponierenden BRCA1- / 2-Mutation.  
Medizinische Dissertation, Universität Düsseldorf, 2001
- 16 Schmutzler R, Schlegelberger B, Meindl A et al.  
Beratung, Genetische Testung und Prävention von Frauen mit einer familiären Belastung für das Mamma- und Ovarialkarzinom.  
Zentralblatt für Gynäkologie, 2003; 125 (12): 494-506
- 17 Warner E, Foulkes W, Goodwin P et al.  
Prevalence and Penetrance of BRCA1 and BRCA2 Gene Mutations in Unselected Ashkenazi Jewish Women with Breast Cancer.  
Journal of the National Cancer Institute, 1999; 91 (14): 1241-1247

- 18 Neuhausen S, Gilewski T, Norton L et al.  
Recurrent *BRCA2* 6174delT mutations in Ashkenazi Jewish women affected by breast cancer.  
Nature Genetics, 1996; 13: 126-128
- 19 Breast Cancer Information Core (BIC); Bethesda, Maryland:  
National Human Genome Research Institute  
(Abgerufen am 26.04.2011 unter <http://research.nhgri.nih.gov/bic/>)
- 20 Die Blauen Ratgeber; Bonn, Deutschland:  
Brustkrebs  
Deutsche Krebshilfe e.V.
- 21 Claus EB, Risch N, Thompson WD  
Autosomal dominant inheritance of early-onset breast cancer. Implications for risk prediction.  
Cancer, 1997; 73 (3): 643-651
- 22 Schiffer T  
Molekulare Analyse des *BRCA1*-Gens in familiären und sporadischen Mammakarzinomen.  
Medizinische Dissertation, Universität Düsseldorf, 2002
- 23 Kiechle M, Böttcher B, Ditsch N et al.  
Hereditäres Mammakarzinom  
Manual Mammakarzinome, 2003  
Tumorzentrum München und W. Zuckerschwerdt Verlag München
- 24 Abkevich V, Zharkikh A, Deffenbaugh AM et al.  
Analysis of missense variation in human *BRCA1* in the context of interspecific sequence variation.  
Journal of Medical Genetics, 2004; 41: 492-507
- 25 Goldgar DE, Easton DF, Deffenbaugh AM et al.  
Integrated Evaluation of DNA Sequence Variants of Unknown Clinical Significance: Application to *BRCA1* and *BRCA2*.  
The American Journal of Human Genetics, 2004; 75: 535-544
- 26 Align-GVGD; Lyon, Frankreich:  
IARC TP 53 Database, 2007  
(Abgerufen am 01.01.2012 unter <http://agvgd.iarc.fr/>)
- 27 Align-GVGD methods; Lyon, Frankreich:  
IARC TP 53 Database, 2008  
(Abgerufen am 5.8.2008 unter <http://www-p53.iarc.fr/AGVGDmethod.html>)
- 28 Niederacher D, Beckmann MW  
Bedeutung der LOH Analyse für die Identifizierung von Tumorgenen.  
Medizinische Genetik, 1998; 10 (2): 256-258

- 29 Knudson's two-hit hypothesis for tumorigenesis involving a tumour suppressor gene (TSG)  
Expert Reviews in Molecular Medicine, 2001  
Cambridge University Press  
(Abgerufen am 2.8.2008 unter <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/01002678a.pdf>)
- 30 Chappuis PO, Nethercot V, Foulkes WD  
Clinico-pathological characteristics of BRCA1- and BRCA2-related breast cancer.  
Seminars in Surgical Oncology, 2000; 18 (4): 287-295
- 31 Fasching PA, Lux MP, Bani M et al.  
Hereditäres Mamma- und Ovarialkarzinom - ein Update Teil I – molekulare Grundlagen.  
Tumorrisikoberatung und Risikoberechnung  
Geburtshilfe und Frauenheilkunde, 2004; 64: 900-911
- 32 BRCA 2006; Leipzig, Deutschland:  
Institut für medizinische Informatik, Statistik und Epidemiologie (IMISE)  
(Abgerufen am 27.04.2011 unter <https://ias3.imise.uni-leipzig.de/forms/frmservlet?config=brca2006>)
- 33 Easton DF, Deffenbaugh AM, Pruss D et al.  
A Systematic Genetic Assessment of 1,433 Sequence Variants of Unknown Clinical Significance in the BRCA1 and BRCA2 Breast Cancer-Predisposition Genes.  
The American Journal of Human Genetics, 2007; 81 (5): 873-883
- 34 Phelan CM, Dapic V, Tice B et al.  
Classification of BRCA 1 missense variants of unknown clinical significance.  
Journal of Medical Genetics, 2005; 42: 138-146
- 35 Williams RS, Chasman DI, Hau DD et al.  
Detection of Protein Folding Defects Caused by BRCA1-BRCT Truncation and Missense Mutations.  
The Journal of Biological Chemistry, 2003; 278 (52): 53007-53016
- 36 Brodie SG, Denk CX  
BRCA1-associated tumorigenesis: what have we learned from knockout mice?  
Trends in Genetics, 2001; 17 (10): 18-22
- 37 Wagner T, Stoppa-Lyonnet D, Fleischmann E et al.  
Denaturing high-performance liquid chromatography detects reliably BRCA1 and BRCA2.  
Genomics, 1999; 62 (3): 369-376
- 38 Leiden Open Variation Database (LOVD); Leiden, Niederlande:  
Leiden University Medical Center  
(Abgerufen am 15.04.2011 unter [http://chromium.liacs.nl/LOVD2/cancer/home.php?select\\_db=BRCA1](http://chromium.liacs.nl/LOVD2/cancer/home.php?select_db=BRCA1))

- 39 Tavgigian SV, Deffenbaugh AM, Yin L et al.  
Comprehensive statistical study of 452 BRCA1 missense substitutions with classification of eight recurrent substitutions as neutral.  
Journal of Medical Genetics, 2006; 43 (4): 295-305
- 40 Deffenbaugh AM, Frank TS, Hoffman M et al.  
Characterization of Common *BRCA1* and *BRCA2* Variants.  
Genetic Testing, 2002; 6 (2): 71-74
- 41 Arnold N, Peper H, Bandick K et al.  
Establishing a control population to screen for the occurrence of nineteen unclassified variants in the BRCA1 gene by denaturing high-performance liquid chromatography.  
The Journal of Chromatography B, 2002; 782: 99–104
- 42 Beristain E, Martínez-Bouzas C, Guerra I et al.  
Differences in the frequency and distribution of BRCA1 and BRCA2 mutations in breast/ovarian cancer cases from the Basque country with respect to the Spanish population: implications for genetic counseling.  
Breast cancer research and treatment, 2007; 106: 255–262
- 43 Ang P, Lim IHK, Lee TC et al.  
BRCA1 and BRCA2 Mutations in an Asian Clinic-based Population Detected Using a Comprehensive Strategy.  
Cancer epidemiology, biomarkers & prevention, 2007; 16 (11): 2276-2284
- 44 Carvalho M, Pino MA, Karchin R et al.  
Analysis of a set of missense, frameshift, and in-frame deletion variants of BRCA1.  
Mutation Research, 2009; 660 (1-2): 1-11
- 45 Coyne RS, McDonald HB, Edgemon K et al.  
Functional Characterization of BRCA1 Sequence Variants Using a Yeast Small Colony Phenotype Assay.  
Cancer Biology & Therapy, 2004; 3 (5): 453-457
- 46 Osorio A, Milne RL, Honrado E et al.  
Classification of Missense Variants of Unknown Significance in BRCA1 Based on Clinical and Tumor Information.  
Human Mutation, 2007; 28 (5): 477-485
- 47 Monteiro AN, August A, Hanafusa H  
Common BRCA1 variants and transcriptional activation.  
The American Journal of Human Genetics, 1997; 61 (3): 761-762
- 48 Mirkovic N, Marti-Renom MA, Weber BL et al.  
Structure-Based Assessment of Missense Mutations in Human BRCA1: Implications for Breast and Ovarian Cancer Structure.  
Cancer Research, 2004; 64 (11): 3790-3797

- 49 Huyton T, Bates PA, Zhang X et al.  
The BRCA1 C-terminal domain: structure and function.  
Mutation Research, 2000; 460 (3-4): 319-332
- 50 Judkins T, Hendrickson BC, Deffenbaugh AM et al.  
Application of Embryonic Lethal or Other Obvious Phenotypes to Characterize the Clinical Significance of Genetic Variants Found in Trans with Known Deleterious Mutations.  
Cancer Research, 2005; 65: 10096-10103
- 51 Borg A, Haile RW, Malone KE et al.  
Characterization of *BRCA1* and *BRCA2* Deleterious Mutations and Variants of Unknown Clinical Significance in Unilateral and Bilateral Breast Cancer: The WECARE Study.  
Human Mutation, 2010; 31 (3): E1200-1240
- 52 Kim BY, Lee DG, Lee KR et al.  
Identification of BRCA1 and BRCA2 mutations from Korean breast cancer patients using denaturing HPLC.  
Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006; 349 (2): 604-610
- 53 McKean-Cowdin R, Feigelson HS, Xia LY et al.  
BRCA1 variants in a family study of African-American and Latina women.  
Human Genetics, 2005; 116: 497-506
- 54 Robledo M, Osorio A, Sentis C et al.  
The 12 base pair duplication/insertion alteration could be a regulatory mutation.  
Journal of medical genetics, 1997; 34: 592-593
- 55 Krzyzosiak, WJ.  
Breast information core  
(Abgerufen am 5.8.2008 unter [http://www.nchgr.nih.gov/dir/lab\\_transfer/bic](http://www.nchgr.nih.gov/dir/lab_transfer/bic))
- 56 Kozlowksi P, Sobczak K, Jasinska A et al.  
Allelic Imbalance of BRCA1 Transcript in the IVS20 12-bp Insertion Carrier.  
Human Mutation, 2000; 16 (4): 371
- 57 Dörk T, Skawran B, Stuhmann M et al.  
BRCA1 expression is not affected by the intronic 12 bp duplication.  
Journal of medical genetics, 1999; 36: 262-263
- 58 Scholl T, Pyne MT, Ward B et al.  
Biochemical and genetic characterisation shows that the BRCA1 IVS20 insertion is a polymorphism.  
Journal of medical genetics, 1999; 36: 571-572

- 59 Anagnostopoulos T, Pertesi M, Konstantopoulou I et al.  
G1738R is a BRCA1 founder mutation in Greek breast/ovarian cancer patients:  
evaluation of its pathogenicity and inferences on its genealogical history.  
Breast cancer research and treatment, 2008; 110: 377-385
- 60 Carvalho MA, Marsillac SM, Karchin R et al.  
Determination of Cancer Risk Associated with Germ Line BRCA1  
Missense Variants by Functional Analysis.  
Cancer Research, 2007; 67 (4): 1494-1501
- 61 Caldecott KW  
The BRCT Domain: Signaling with Friends?  
Science, 2003; 302 (5645): 579-580

**Abb. A.1: Ergebnisse der Sequenzierungsanalysen Exon 16 (Wildtyp)**





c.5075G/G-Wildtyp:

NNNNNNNNNNNNNNNTNATTCTTANaGAGACCAGAACTTTGTAATTCAACATTCATCGTTGTGTAAATTAAACTTCTCCCATTCCTTTTCAGAGGGAACCCCTTACCTGGAATCTGGAATCAGCCTCTTCTCTGATGACCCTGAATCTGATCCTTCTGAAGACAGAGCCCCAGAGTCAGCTCGTGTGGCAACATAACCATCTTCAACCTCTGCATTGAAAGTTCCCAATTGAAAGTTGCAGAATCTGCCCAGNGTCCAGCTGCTGCTCATACTACTGATACTGCTGGGTATAATGCAATGGAAGAAAGTGTGAGCAGGGAGAAGCCAGAATTGACAGCTTCAACAGAAAGGGTCAACAAAAGAATGTCCA**TGG**TGGTGTCTGGCCTGACCCAGAGAATTTGTGAGTGTATCATATGTATCTCCCTAATGACTAAGACTTAACAACATTCTGGAAAGAGTTTATGTAGGTATTGTCAATTAATAACCTAGAGGAAGAAATCTAGAAAACANN

c.5075G>A-UV:

ATTCTTAcGAGACCAGAACTTTGTAATTCAACATTCATCGTTGTGTAAATTAAACTTCTCCCATTCCTTTTCAGAGGGAACCCCTTACCTGGAATCTGGAATCAGCCTCTTCTCTGATGACCCTGAATCTGATCCTTCTGAAGACAGAGCCCCAGAGTCAGCTCGTGTGGCAACATAACCATCTTCAACCTCTGCATTGAAAGTTCCCAATTGAAAGTTGCAGAATCTGCCAGGGTCCAGCTGCTGCTCATACTACTGATACTGCTGGGTATAATGCAATGGAAGAAAGTGTGAGCAGGGAGAAGCCAGAATTGACAGCTTCAACAGAAAGGGTCAACAAAAGAATGTCCA**TAG**TGGTGTCTGGCCTGACCCAGAGAATTTGTGAGTGTATCCATATGTATCTCCCTAATGACTAAGACTTAACAACATTCTGGAAAGAGTTTATGTAGGTATTGTCAATTAATAACCTAGAGGAAGAAATCTAGAAAACAA TCNNNNNTTCTGTG

**Abb. A.3: Sequenzvergleich von Wildtyp und c.5075G>A-UV**







Abb. A.6: Sequenzierungsanalysen zum c.3042 C>T (Wildtyp)



#### c.4931 A/A - Wildtyp:

NNNNNNNCNNNNiTiATTGGTCTTTTAAATTCTTAACAGAGACcaGAACTTTGTAATTcaACATTcATCGTTGTGTAAATTAAACT  
TCTCCCATTCCTTTTCAGAGGGAACCCCTTACCTGGAATCTGGAATCAGCCTCTTCTCTGATGACCCTGAATCTGATCCTTCTGA  
AGACAGAGCCCCAGAGTCAGCTCGTGTGGCAACATACCATCTTCAACCTCTGCATTGAAAGTTCCCCAATTGAAAGTTGCAG  
AATCTGCCCAGNGTCCAGCTGCTGCTCATACTACTGATACTGCTGGGTATAATGCAATGGAAGAAAGTGTGAGCAGGGAGAA  
GCCAGAATTGACAGCTTCAACAGAAAGGGTCAACAAAAGAATGTCCATGGTGGTGTCTGGCCTGACCCAGAGAAGATTTGTG  
AGTGTATCCATATGTATCTCCCTAATGACTAAGACTTAACAACATTCTGGAAAGAGTTTATGTAGGTATTGTCAATTAATAA  
CCTAGAGGAAGAAATCTAGAAAACAATCACAgTnCTGTGNNN

#### c.4931 A>G - UV:

TTTTNATTCTNANaGAGACCAGAACTTTGTAATTcaACATTCATCGTTGTGTAAATTAACTTCTCCCATTCCTTTCAGAGGGAA  
CCCCTTACCTGGAATCTGGAATCAGCCTCTTCTCTGATGACCCTGAATCTGATCCTTCTGAAGACAGAGCCCCAGAGTCAGCT  
CGTGTGGCAACATACCATCTTCAACCTCTGCATTGAAAGTTCCCCAGTTGAAAGTTGCAGAATCTGCCCAGAGTCCAGCTGC  
TGCTCATACTACTGATACTGCTGGGTATAATGCAATGGAAGAAAGTGTGAGCAGGGAGAAGCCAGAATTGACAGCTTCAACA  
GAAAGGGTCAACAAAAGAATGTCCATGGTGGTGTCTGGCCTGACCCAGAGAAGATTTGTGAGTGTATCCATATGTATCTCCCT  
AATGACTAANACTTAACAACATTCTGGAAAGAGNTTATGTAGGTATTGTCAATTAATAACCTAGAGGAAGAAATCTAGAAA  
ACNNN

#### **Abb. A.8: Sequenzvergleich von Wildtyp und c.4931A>G-UV**

#### c.3042 C>T - Wildtyp:

TTNGNCNATCATCTCNGTTCNGAGGCAACGAACTGGACTCATTACTCCNAATAAACATGGaCTTTTACAAAACCCATATCGT  
ATACCACCACCTTTTCCCATCAAGTCATTTGTTAAACTAAATGTAAGAAAAATCTGCTAGAGGAAAACTTTGAGGAACATTC  
AATGTCACCTGAAAGAGAAAATGGGAAATGAGAACATTCCAAGTACAGTGAGCACAATTAGCCGTAATAACATTAGAGAAAA  
TGTTTTTAAAGAAGCCAGCTCAAGCAATATTAATGAAGTAGGTTCCAGTACTAATGAAGTGGGCTCCAGTATTAATGAAATAG  
GTTCCAGTGATGAAAACATTCAAGCAGAACTAGGTAGAAAACANNGGGGCCAAAAA

#### c.3042 C>T - UV:

NNNNNNNNNNNNGGNGcTCTAGGTTTTGTCTATcaTCTcagTcaGAGGCAACGAACTGGACTcATTACTCCAAATAAACATG  
GACTTTTATAAAAACCCATATCGTATACCACCACCTTTTCCCATCAAGTCATTTGTTAAACTAAATGTAANAAAATCTGCTAG  
AGGAAAACCTTTGAGGAACATTCAATGTCACCTGAAAGAGAAAATGGGAAATGAGAACATTCCAAGTACAGTGAGCACAATTA  
GCCGTAATAACATTAGANAAAATGTTTTTAAAGRAGCCAGCTCAAGCAATATTAATGAAGTAGGTTCCAGTACTAATGAAGT  
GGGCTCCAGTATTAATGAAATAGGTTCCAGTGATRAAAACATTCAAGCAGAACTAGGTAGAAAACAGAGGGCCAAAA

#### **Abb. A.9: Sequenzvergleich von Wildtyp und c.3042C>T-UV**





Wildtyp:

NNNNNNNNNNCNCNNNNNNNNNNCNCNTNNNTTGAAGGAANCTTCTCTTTCTCTTATCCTGATGGGTTGTGTTGGTTTCTTT  
CAGCATGATTTTGAAGTCAGAGGAGATGTGGTCAATGGAAGAAACCACCAAGGTCCAAAGCGAGCAAGAGAATCCCAGGAC  
AGAAAGGTAAAGCTCCCTCCCTCAAGTTGACAAAAATCTCACCCACCACTCTCCTTTGCANAGATGGGCCGCTTCATTTTGT  
AANACTTATTACATACATACACAGNGCTANATANNNTTACACAGGN

IVS 20 + 60 ins12bp – UV:

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTNNNNNNNNNNNTNNNNNNNNNANGAANCTTCTNTTTCTCTTATCCTGATGGGTTGNG  
TTTGGTTTCTTTTTCAGCATGATTTTGAAGTCANAGGAGATGTGGTCAATGGAANAAACCACCAAGGTCCAAAGCGAGCAAGAG  
AATCCCAGGACAGAAAGGTAAAGCTCCCTCCCTCAAGTTGACAAAAATCTCACCCACCACTCTGTATTCCAATCCNNNTTN  
CNNNNNGNNNNNTANATGNNNNNNNNNNNTNTNNNNNNNNNTNNNNNNNNNANNNNCNNNNNNNNNNNNNTCACACA  
GG

**Abb. A.12: Vergleich der Sequenzierungsanalysen zum IVS 20 + 60 ins12bp (Wildtyp und Nachweis der Insertionsmutation)**

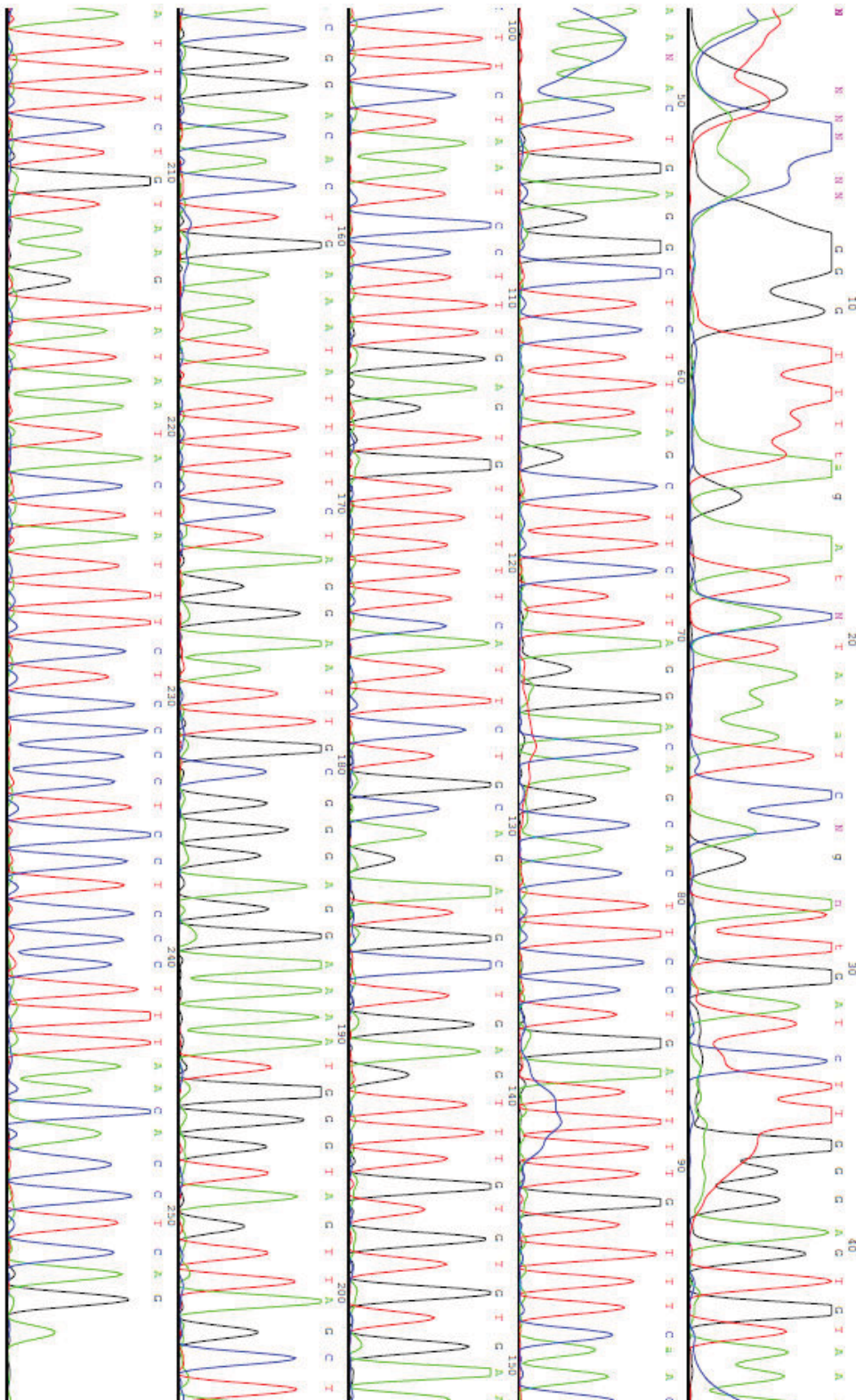


Abb. A.13: Sequenzierungsergebnisse zum c.5253\_5258del6 p.W1712\_V1713del (Wildtyp)



# Curriculum vitae

## **Persönliche Angaben**

|               |                     |
|---------------|---------------------|
| Name          | Dominik Falkenstein |
| Geburtsdatum  | 25.05.1985          |
| Geburtsort    | Duisburg            |
| Familienstand | ledig               |
| Konfession    | römisch-katholisch  |

## **Schulbildung**

|             |                                                                               |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| 1991 – 2004 | Grundschule und Gymnasium in Duisburg<br>Abschluss: Allgemeine Hochschulreife |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------|

## **Studium**

|                   |                                                                                                           |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 10/2004 – 11/2010 | Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität<br>Düsseldorf                                  |
| 08/2006           | Prüfung zum ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: 1,5                                            |
| 11/2010           | Prüfung zum zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: 1,5<br>Gesamtnote der Ärztlichen Prüfung: 1,5 |

## **Praktisches Jahr**

|                   |                                              |
|-------------------|----------------------------------------------|
| 08/2009 – 07/2010 | Helios Klinikum Krefeld, Wahlfach: Pädiatrie |
|-------------------|----------------------------------------------|

## **Berufliche Tätigkeit**

|              |                                                                          |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------|
| Seit 08/2011 | Assistenzarzt in der Weiterbildung<br>Innere Medizin, Kliniken Essen Süd |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------|

Duisburg, den 02.08.2012

## Danksagung

Zuallererst möchte ich Herrn PD Dr. med. Markus Fleisch für die Überlassung des Themas sowie Herrn Dr. rer. nat. Dieter Niederacher für die langjährige persönliche und freundschaftliche Betreuung, die ich bei der Bearbeitung des Themas erfahren durfte, danken.

Mein Dank gilt außerdem dem ehemaligen Leiter der Frauenklinik Düsseldorf, Herrn Prof. Dr. med. Hans Georg Bender sowie seinem Nachfolger Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Janni. Beide ermöglichten mir, die Arbeiten zur Promotion in dieser Klinik aufzunehmen bzw. durchzuführen.

Für die hilfsbereite Unterstützung vor allem bei der Einarbeitung in labortechnische Arbeitsweisen danke ich insbesondere Frau Nora Hinssen sowie dem gesamten Team des molekulargenetischen Labors der Frauenklinik Düsseldorf.

Meinen Freunden danke ich für ihren Zuspruch und ihre Unterstützung.

Abschließend danke ich meiner Familie und Verwandtschaft, ebenso wie meiner Freundin Victoria Piech. Einen ganz besonderen Dank möchte ich meinen Eltern Helga und Norbert Falkenstein aussprechen, die mich während der gesamten Zeit tatkräftig unterstützt und immer wieder motiviert haben.

Meiner lieben Mutter, die die Fertigstellung dieser Arbeit leider nicht mehr miterlebt hat, ist diese Arbeit gewidmet.

## Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

02.08.2012

Dominik Falkenstein