

Molekulargenetische Diagnostik bei Brustkrebs: Neueste Ergebnisse und Auswirkungen auf die genetische Beratung

Alfons Meindl^{1,2}, Astrid Golla¹

- 1 Abteilung Medizinische Genetik der Kinderpoliklinik, LMU, Goethestr. 29, 80336 München
- 2 Deutsches Brustkrebskonsortium, gefördert von der Deutschen Krebshilfe, Thomas Mann Str. 40, 53111 Bonn

Tab 1 Risikogruppen für eine BRCA1- und BRCA2-Mutationsanalyse

| Gruppe | Familienanamnese |
|--------|--|
| A | Drei oder mehr Frauen in der Familie die an Brustkrebs erkrankt sind. |
| B | Mindestens zwei Frauen in einer Familie mit Auftreten von Brust- und Eierstockkrebs |
| C1 | Zwei betroffene Frauen in einer Familie, wobei eine Frau vor dem 50. Lebensjahr erkrankt ist, oder eine Frau mit beidseitigem Brustkrebs mit Erstdiagnose vor dem 40. Lebensjahr |
| C2 | Eine Frau mit einem BC vor dem 30. Lebensjahr, oder einem Eierstockkrebs vor dem 40. Lebensjahr |

Einer der stärksten Risikofaktoren für Brustkrebs ist die positive Familiengeschichte. Bei etwa 10-12% der an Brustkrebs erkrankten Frauen gibt es weitere Betroffene in der erstgradigen Verwandtschaft. Insgesamt sind etwa 5% aller Brustkrebsfälle auf prädisponierende autosomal dominante Gene zurückzuführen. Die Gene BRCA1 auf Chromosom 17 und BRCA2 auf Chromosom 13 sind seit 1994, bzw. 1995 bekannt und sind zusammengenommen etwa für die Hälfte der erblich bedingten Brustkrebserkrankungen verantwortlich. Diese Gene können bei Frauen mit familiärem Brustkrebs molekulargenetisch untersucht werden. Eine Mutation in einem dieser beiden Gene bedeutet ein gegenüber der Normalbevölkerung (10%) stark erhöhtes Risiko (50-80%) an Brustkrebs zu erkranken.

Beide Gene BRCA1 (Miki et al., 1994) und BRCA2 (Wooster et al., 1995) sind sehr groß und ihre Untersuchung ist aufwendig, zumal die bisherigen Analysen keine Konzentration der Mutationen in bestimmten Bereichen der Gene gezeigt haben. Bisher sind weltweit über 450 verschiedene Mutationen im BRCA1-Gen und über 250 verschiedene Mutationen im BRCA2-Gen gefunden worden, davon sind etwa 50 im BRCA1-Gen und etwa 20 im BRCA2-Gen sogenannte unclassified variants (s.u.) (Breast Cancer Information Core (BIC)-Datenbank). Bei beiden Genen handelt es sich um Tumor-Suppressorgene (siehe Artikel Passarge), welche vermutlich an DNA-Reparaturfunktionen und an der Regulation der Transkription (Sharan et

al., 1997, Scully et al., 1997, Zhang et al., 1988) beteiligt sind.

Die Wahrscheinlichkeit, eine Veränderung im BRCA1-Gen oder BRCA2-Gen zu finden, hängt stark davon ab, wieviele Erkrankte in der Familie vorgekommen sind und ob neben Brustkrebs noch Eierstockkrebs aufgetreten ist (Easton et al., 1993, Ford et al., 1998). Nach Daten des internationalen Breast Cancer Linkage Konsortiums sind in Familien mit mehreren Frauen mit frühem Erkrankungsalter und mit Auftreten von Eierstockkrebs häufiger (bis zu 75%) Mutationen im BRCA1-Gen zu erwarten, in Familien, in denen auch Männer an Brustkrebs erkrankt sind, ist eine Mutation im BRCA2-Gen wahrscheinlicher.

Um die aufwendigen Untersuchungen in den Genen BRCA1 (22 Exons, 7800 Nukleotide, 1863 Aminosäuren) und BRCA2 (27 Exons, 11300 Nukleotide, 3418 Aminosäuren) durchführen und ein Mutationsprofil für die deutsche Population ermitteln zu können, fördert die Deutsche Krebshilfe bundesweit elf Zentren, die das deutsche Brustkrebs-Konsortium bilden (siehe Begleitartikel von Jonat, Fischer, Propping). Innerhalb von etwas mehr als einem Jahr wurden in den deutschen Zentren mehr als 900 Familien beraten, dokumentiert und klassifiziert. Bei mehr als 300 dieser Familien wurde eine komplette Mutationsanalyse im BRCA1-Gen und bei etwa 100 zusätzlich im BRCA2-Gen durchgeführt. Etwa die Hälfte der Familien gehört den Gruppen A oder B an (mehr als drei betroffene Frauen mit isoliertem

Mammakarzinom oder Familien, in denen Mammakarzinom assoziiert mit Ovarialkarzinom auftritt), die andere Hälfte der Gruppe C (siehe Tabelle 1). Bisher wurden in 65 Familien 34 verschiedene Veränderungen im BRCA1-Gen und in 12 Familien 10 verschiedene Mutationen im BRCA2-Gen nachgewiesen. Wie auch für andere Populationen berichtet, wurden Mutationen im BRCA1-Gen am häufigsten in den Gruppen A und B gefunden werden. In Familien mit nur zwei Betroffenen (Tabelle, Gruppe C1) wurden, entsprechend der Erwartung, selten Veränderungen im BRCA1-Gen nachgewiesen. In solchen Familien ist aufgrund der Häufigkeit von Brustkrebs in der Allgemeinbevölkerung (ca. 10%) ein zufälliges Vorkommen von zwei „sporadischen“ Erkrankungsfällen deutlich wahrscheinlicher als das Vorliegen einer prädisponierenden Mutation. Auch bei einzelnen sehr früh an Brustkrebs erkrankten Frauen („early onset“ Gruppe C2 in Tabelle 1) wurde nur in wenigen Fällen eine Mutation gefunden.

Abgesehen von Familien, in denen auch Männer an Brustkrebs erkrankt sind, wurden BRCA2-Mutationen seltener als BRCA1-Mutationen nachgewiesen. Dies reflektiert vermutlich die bereits für andere Populationen gemachten Erfahrungen einer niedrigen Mutationsfrequenz von BRCA2 in eindeutig erblich bedingten Mammakarzinomfamilien (Szabo und King, 1997, Phelan et al., 1996, Chen et al., 1998).

In einigen Populationen (z.B. Ashkenazi-Juden, Island) sind bestimmte, immer wieder gefundene Mutationen beschrieben worden, sogenannte „founder“-Mutationen (Struewing et al. 1995, Szabo und King, 1997). In den deutschen Familien konnte wiederholt die Mutation insC5382 im Exon 20 des BRCA1-Gens nachgewiesen werden (14 von 65 Mutationen), die auch in anderen Bevölkerungen auftritt. Andere wiederholt beobachtete Veränderungen (z. B. Cys61Gly oder 4650delCA) sind möglicherweise spezifisch für unsere Population.

Ein ungeklärtes Problem der molekulargenetischen BRCA-Diagnostik stellt der Nachweis von sogenannten „unclassified variants“ (UV) dar. Hier handelt es sich meistens um „missense mutations“ die zum Austausch einzelner Aminosäuren führen. Während einige Proteinpolymorphismen als prädisponierende Varianten ausgeschlossen werden konnten, bleiben andere, wie z.B. R1347G schwer beurteilbar (Frequenz <1%). Dazu soll die Häufigkeit solcher unklaren Varianten in der Population und ihre Assoziation mit Mammakarzinomfamilien bestimmt werden. Kommen diese Varianten bei gesunden Kontrollpersonen genauso häufig vor, wie bei Brustkrebspatientinnen, kann man eine pathogene Wirkung hinsichtlich Brustkrebs weitgehend ausschließen.

Bisher werden auch in großen Familien, in denen die Wahrscheinlichkeit, daß es sich um eine erbliche Brustkrebsform handelt, sehr hoch ist, weniger Mutationen in den Genen BRCA1 und BRCA2 nachgewiesen, als man aufgrund von Kopplungsanalysen vermuten konnte. Der Grund dafür könnte sein, daß vorhandene Mutationen mit den verwendeten „Mutations-Screening“-Methoden nicht erfaßt werden. Tatsächlich ist es daher notwendig, Qualitätskontrollen in der BRCA-Diagnostik einzuführen und die gegenwärtig angewandten „Screening“-Methoden gegeneinander zu evaluieren. Eine komplette Analyse der BRCA-Gene wird gegenwärtig in den verschiedenen deutschen Zentren entweder durch die Anwendung mehrerer Techniken (z.B. PTT und Sequenzierung) oder nur einer einzelnen

Methode (Konformationsanalyse oder komplette Sequenzierung) durchgeführt. Für die Konformationsanalyse stehen zur Zeit DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis), SSCP (single stranded conformation polymorphism) und DHPLC (denaturing high performance liquid chromatography) zur Verfügung. Die DHPLC hat dabei, neben der wahrscheinlich höchsten Sensitivität, den Vorteil, das sie zumindest halbautomatisierbar ist. Die Sensitivität dieser einzelnen Methoden soll im Vergleich zur kompletten Sequenzierung im Rahmen des Verbundprojektes evaluiert werden. Die meisten der verwendeten Methoden sind darauf ausgerichtet, Mutationen auf Basenpaarniveau, d.h. Punktmutationen oder kleinere Deletionen, zu erfassen. Größere Deletionen entgehen damit dem Nachweis. Mittels entsprechender komplementärer Methoden (Southern-Blot Analyse) wurden allerdings in der deutschen Population bisher keine Deletionen gefunden.

Fundierte, auf großen Fallzahlen beruhende Erkenntnisse über die Häufigkeit von Mutationen in „Prädispositionsgenen“ und deren Verhalten hinsichtlich der Penetranz sind für die Beratung von Ratsuchenden aus betroffenen Familien wichtig. Die Auswertung der Daten aus dem Deutschen Brustkrebs-Konsortium wird zeigen, ob die in den bisherigen Studien ermittelten Daten auf unsere Bevölkerung übertragbar sind, oder ob mit Besonderheiten gerechnet werden muß. Die bisherigen Ergebnisse weisen darauf hin, daß ein routinemäßiges Screening in den Genen BRCA1 und BRCA2 nicht für alle Ratsuchenden möglich und sinnvoll ist. In Zukunft sollte der molekulargenetischen Diagnostik eine Berechnung vorausgehen, wie wahrscheinlich eine Mutation im BRCA1- oder BRCA2-Gen bei der speziellen Familiensituation einer Ratsuchenden ist. Ein die bisherigen Kenntnisse umfassend berücksichtigendes Modell hierfür wurde kürzlich veröffentlicht (Parmigiani et al. 1998). Dadurch kann die Beratung von Ratsuchenden hinsichtlich ihres persönlichen Erkrankungsrisikos sowohl vor, als auch nach einer molekular-genetischen Diagnostik verbessert werden. Die molekulargenetische Diagnostik wird effek-

tiver und damit kostengünstiger werden, wenn nur Indexpatientinnen untersucht werden, die eine hohe Wahrscheinlichkeit haben, eine prädisponierende Mutation aufzuweisen. In ausgesuchten Fällen wird vielleicht sogar die Untersuchung ratsuchender Frauen aus Hochrisikofamilien, in denen keine Betroffene untersucht werden kann, sinnvoll sein.

Die bisherigen Ergebnisse der molekulargenetischen Brustkrebsdiagnostik haben die Erwartungen, die die Klonierung der Gene BRCA1 und BRCA2 hervorgerufen hatten, relativiert, sowohl hinsichtlich der Anzahl von Mutationen, die in den familiären Fällen nachgewiesen werden, als auch hinsichtlich der Bedeutung für die sporadischen Fälle. Somatische Mutationen auf beiden Allelen des BRCA1-Gens werden in sporadischen Tumoren nur selten gefunden. Man muß daher davon ausgehen, daß das BRCA1-Gen bei den nicht familiären Fällen keine Schlüsselrolle spielt, sondern eher einen Faktor innerhalb eines komplexen zum Tumor führenden Geschehens darstellt. Es ist allerdings nicht auszuschließen, daß bereits der Verlust eines BRCA-Allels in sporadischen Fällen zur Tumorinduktion führt.

Die Untersuchung der Gene BRCA1 und BRCA2 ist als „Gentest“ für die allgemeine Bevölkerung ungeeignet. Mit Hilfe einer sinnvollen Vorauswahl ist die Untersuchung dieser Gene für Frauen aus belasteten Familien jedoch eine geeignete Methode, das Erkrankungsrisiko zu bestimmen und Entscheidungen hinsichtlich präventiver Maßnahmen zu treffen.

Literatur

- Chen et al. (1998) BRCA2 germline mutations in Swedish breast cancer families. *Eur. J. Hum. Genet.* 6: 134-139
- Easton et al. and the Breast Cancer Linkage Consortium (1993) Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancer: results from 214 families. *Am. J. Hum. Genet.* 52: 678-701
- Ford et al. (1998) Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. *Am. J. Hum. Genet.* 62: 676-689
- Miki et al. (1994) A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 266: 66-71

6th European Conference on Cytogenetics and Molecular Genetics on Human Solid Tumors

Saarbrücken, 15.–18.10.1998

Preliminary Programme

Thursday, 15.10.98

| | | |
|-----------|-------------------------|---|
| Afternoon | New Cytogenetics | Linda Kearney (Oxford): Telomeric probes Evelyn Schroeck (Bethesda): Multicolor FISH |
|-----------|-------------------------|---|

Friday, 16.10.98

| | | |
|---------|-----------------------------|--|
| Morning | Nuclear Architecture | Thomas Cremer (München): Three dimensional chromosomal structures Roel van Driel (Amsterdam): Chromatin structure and gene expression |
|---------|-----------------------------|--|

| | | |
|-----------|--------------------------------|--|
| Afternoon | Tumour specific lesions | Tony Ganesan (Oxford): Allelic loss in ovarian cancer |
|-----------|--------------------------------|--|

Saturday, 17.10.98

| | | |
|---------|--------------------------------------|---|
| Morning | Morphogenesis and Oncogenesis | Rudi Balling (München-Neuherberg): Pax-genes and organogenesis |
|---------|--------------------------------------|---|

| | | |
|-----------|--------------------------------|--|
| Afternoon | Tumour specific lesions | Hiroko Ohgaki (Lyon): Molecular genetics of gliomas |
|-----------|--------------------------------|--|

Sunday, 18.10.98

| | | |
|---------|-------------------|---|
| Morning | Microarray | Charles Auffray (Paris): cDNA expression libraries Jeffrey Trent (Bethesda): Gene expression pattern in human cancer Hermann van den Berghe (Leuven): Overview lecture |
|---------|-------------------|---|

Parmigiani et al. (1998) Determining carrier probabilities for breast cancer -susceptibility genes BRCA1 and BRCA2. *Am. J. Hum. Genet.* 62: 145-158

Phelan et al. (1996): Mutation analysis of the BRCA2 gene in 49 site-specific breast cancer families. *Nat. Genet.* 13:120-122

Struwing et al. (1997) The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi jews. *N. Engl. J. Med.* 336: 1401-1408

Scully et al. (1997) Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell* 88: 265-275

Sharan et al. (1997) Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking BRCA2. *Nature* 386: 804-810

Szabo und King (1997) Population genetics of BRCA1 and BRCA2. *Am. J. Hum. Genet.* 60: 1013-1020

Wooster et al. (1995) Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* 378: 789-792

Zhang, Tomblin und Weber (1998) BRCA1, BRCA2, and DNA damage response: collision or collusion? *Cell* 92: 433-436

Korrespondenzadresse

Dr. rer. nat. Alfons Meindl
Abteilung Medizinische Genetik
der Kinderpoliklinik, LMU
Goethestr. 29, 80336 München
Tel 089-5160-4067
Fax 089-5160-4780
alfons@pedgen.med.uni-
muenchen.de

General Information

Deadlines

Deadline for submitting abstracts and early registration: 15.6.98
Deadline for poster abstracts: 1.8.98

Information

Wolfram Henn
Institute of Human Genetics, Saarland University
D-66421 Homburg/Saar
Phone: 0049-6841-166614
Fax: 0049-6841-166600
E-mail: hguden@med-rz.uni-sb.de
Internet: http://www.med-rz.uni-sb.de/med-_fakhumangenetik2/conference/

Organizers

Eckart Meese, Klaus D. Zang, Homburg

Local Organizing Committee

Nikolaus Blin, Tübingen, Wolfram Henn, Cornelius Welter, Homburg

Scientific Committee

Charles Buys, Groningen
Sergio Castedo, Portugal
Paolo dal Cin, Leuven
Bernard Dutrillaux, Paris
Ann Hagemeyer, Leuven
Felix Mitelman, Lund
Marco Pierotti, Milano
Claude Turc-Carel, Nice
Wim J.M. van de Ven, Leuven
Brian Young, London