

Aus der  
Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe  
Klinik der Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Sven Mahner

**Die BAP1-Expression und subzelluläre Lokalisation in  
Tumorzellen des hereditären Mammakarzinoms  
korreliert mit dem klinischen Outcome**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Vesela Plamenova Ivanov  
(geb. Docheva)  
aus Gabrovo, Bulgarien

Jahr  
2024

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichtersteller: Prof. Dr. Nina Ditsch

Mitberichtersteller: PD Dr. Dorit di Gioia

Mitbetreuung durch die  
promovierten Mitarbeiter: Dr. Christine Zeder-Göß

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 21.11.2024

# Inhaltsverzeichnis

<b>I. Einleitung und Zielsetzung .....</b>	<b>5</b>
1. Mammakarzinom.....	5
1.1. Epidemiologie .....	5
1.2. Ätiologie und Risikofaktoren.....	5
1.2.1. Alter .....	5
1.2.2. Hormonelle Exposition.....	6
1.2.3 Lifestyle Faktoren.....	7
1.2.4 Genetische Prädisposition.....	7
1.2.4.1. Multigen Panel (Illumina-TruRisk®Panel-v2) .....	8
1.3. Klinik .....	8
1.3.1 Lokale Symptome.....	8
1.3.2 Metastasierung .....	9
1.4. Diagnostik .....	10
1.4.1. Mammographie .....	10
1.4.2. Sonographie .....	11
1.4.3. Spezielle bildgebende Untersuchungen.....	11
1.4.4. Biopsie.....	11
1.5. Pathologie .....	11
1.5.1 Histologische Typen .....	11
1.5.2. TNM-Klassifikation .....	12
1.5.2.1. T-Status .....	12
1.5.2.2. N-Status.....	13
1.5.2.3. M-Status .....	13
1.5.3. Grading.....	13
1.5.4. Hormonrezeptorstatus.....	14
1.5.5. HER2/neu-Status .....	14
1.5.6. Ki-67-Proliferationsindex .....	15
1.5.7. Immunhistochemische molekulare Subtypisierung .....	15
1.6. Therapie .....	16
1.6.1. Operative Therapie .....	16
1.6.1.1. BEO .....	16
1.6.1.2. Mastektomie .....	17
1.6.1.3. SLNB .....	18
1.6.1.4. Axilläre Lymphadenektomie (ALND) .....	18
1.6.1.5. Targeted axillary Dissection (TAD).....	18
1.6.2. Systemische Therapie .....	19
1.6.2.1. Chemotherapie.....	19
1.6.2.2. Antihormontherapie .....	19

1.6.2.3. Zielgerichtete Substanzen .....	20
1.6.2.3.1. CDK4/6-Inhibitoren .....	20
1.6.2.3.2. mTOR- Inhibitor .....	21
1.6.2.3.3. Immuntherapie .....	21
1.6.2.3.4. PARP-Inhibitoren .....	21
1.6.3. Strahlentherapie .....	22
<b>2. BRCA1 und BRCA2 Mutation .....</b>	<b>23</b>
2.1 Assoziierte Karzinome .....	24
2.2. Prävention .....	24
2.2.1 Primäre Prävention .....	24
2.2.1.1 Lebensstil .....	25
2.2.1.2 Prophylaktische Operationen .....	25
2.2.1.3 Chemoprävention .....	26
2.2.2 Sekundäre Prävention.....	26
2.2.2.1 Intensivierte Früherkennung .....	26
2.2.3 Tertiäre Prävention .....	27
2.2.3.1 Operative Therapie (Mastektomie oder BEO) .....	27
2.2.3.2 Systemtherapie .....	28
2.2.3.3 PARP-Inhibitoren .....	28
<b>3. BRCA1- und BRCA2- Proteine .....</b>	<b>29</b>
3.1 Das BRCA1- Protein .....	29
3.2 Das BRCA2- Protein .....	30
<b>4. Das BAP1- Protein.....</b>	<b>30</b>
<b>5. Zielsetzung .....</b>	<b>32</b>
<b>II. Material und Methoden.....</b>	<b>33</b>
<b>1. Patientenkollektiv .....</b>	<b>33</b>
<b>2. Immunhistochemie .....</b>	<b>34</b>
2.1. Fixation, Einbettung und Schneiden am Mikrotom .....	34
2.2. Immunhistochemische Vorbereitung, Detektion durch ZytoChem-Plus HRP Polymer- Methode, DAB-Färbung, Gegenfärbung, Dehydrierung und Eindecken, Positivkontrolle .....	35
<b>3. Immune Reactive Score (IRS).....</b>	<b>36</b>
<b>4. Statistische Auswertung.....</b>	<b>37</b>
<b>III. Ergebnisse.....</b>	<b>38</b>
<b>1. Die nukleäre BAP1- Expression in Tumorzellen von BRCA-Mutationsträgerinnen korreliert positiv mit dem T- Status .....</b>	<b>38</b>

2. Die BAP1- Expression im Zytoplasma in Tumorzellen von BRCA-negativen Patientinnen korreliert mit dem T-Status .....	40
3. Die nukleäre BAP1- Expression in BRCA-Mutation-positiven Patientinnen korreliert negativ mit dem Langzeitüberleben der Patientinnen.....	41
4. Die BAP1- Expression im Zytoplasma in Tumorzellen von BRCA-Mutation- negativen Patientinnen korreliert negativ mit dem Langzeitüberleben.....	43
5. Andere Parameter.....	45
<b>IV. Diskussion .....</b>	<b>47</b>
1. Diskussion Ergebnisse .....	47
2. BAP1- Protein und deren subzelluläre Lokalisation.....	48
3. Interaktion zwischen BAP1 und BRCA1/2 auf subzellulärer Ebene .....	48
4. BAP1 als Tumorsuppressor und Onkogen .....	50
5. Ausblick: Andere Proteine, die mit dem BRCA1/2 Komplex interagieren .....	50
<b>V. Zusammenfassung .....</b>	<b>52</b>
<b>VI. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>54</b>
<b>VII. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>63</b>
<b>VIII. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>65</b>
<b>IX. Anhang .....</b>	<b>70</b>
9.1. Färbungsprotokoll und Reagenzien.....	70
<b>X. Danksagung .....</b>	<b>73</b>
<b>XI. Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>74</b>

# **I. Einleitung und Zielsetzung**

## **1. Mammakarzinom**

### **1.1. Epidemiologie**

Das Mammakarzinom ist nach der WHO mit circa 2 Millionen Neuerkrankungen jährlich die häufigste Neoplasie der Frau weltweit (rund 25% aller Krebserkrankungen). Außerdem ist es die tödlichste bösartige Erkrankung der Frau mit einer Mortalität von circa 600000 Brustkrebs- bezogenen Todesfällen pro Jahr weltweit [1] und die fünfthäufigste Krebstodesursache insgesamt.

In Deutschland hat jede Frau ein Lebenszeitrisiko von etwa 12,2% an Mammakarzinom zu erkranken, wobei das durchschnittliche Erkrankungsalter bei 64 Jahren liegt.

Die Inzidenz liegt bei circa 69900 Neuerkrankungen/Jahr (Stand 2018) und die Mortalität bei 18519/Jahr (Stand 2019) [2]. Etwa 1% aller Neuerkrankungen betrifft Männer [2]. Die relative 10-Jahres-Überlebensrate beträgt 83% [3]. Insgesamt beobachtet man eine rückläufige Tendenz in Inzidenz und Mortalität und eine Verbesserung des Überlebens in Deutschland in den letzten Jahren. Dies ist mutmaßlich eine Folge der deutlichen Fortschritte in der Diagnostik und der Entwicklung neuer Therapieansätze, v.a. im Rahmen der Systemtherapie.

### **1.2. Ätiologie und Risikofaktoren**

Insgesamt ist das Mammakarzinom eine heterogene Erkrankung, beeinflusst durch viele Faktoren, die allein oder in Kombination, das Risiko daran zu erkranken, erhöhen.

#### **1.2.1. Alter**

Wie bei den meisten Krebserkrankungen ist das Alter einer der wichtigsten Risikofaktoren für das Mammakarzinom. Das Risiko steigt mit höherem Alter von

weniger als 50/100000 Neuerkrankungen in Deutschland in der Altersgruppe der 30-35-jährigen bis auf 350/100000 bei den 65-69-jährigen Frauen [3].

### **1.2.2. Hormonelle Exposition**

Lange hormonelle Exposition, insbesondere unter dem Einfluss von Östrogenen erhöht das Risiko für ein Hormonrezeptor- positives Mammakarzinom (circa 2/3 der Mammakarzinome) [4]. Eine frühe Menarche mit daraus resultierender erhöhter Anzahl an Ovulationszyklen und Östrogenexposition ist schon lange als Risikofaktor benannt [5]. Die Parität ist auch ein wichtiger Faktor bei der Entwicklung von Brustkrebs. Fraumeni et al. bewiesen in einer historischen Studie mit Nonnen aus dem Jahre 1969, dass Nullipara ein signifikant gesteigertes Risiko für die Entwicklung eines Mammakarzinoms haben [6]. Andere Studien unterstützten diese Theorie und zeigten, dass frühe Schwangerschaften und eine erhöhte Anzahl an Geburten das Risiko für ein Mammakarzinom reduzieren [7]. Genauer gesagt, reduziert jede Geburt das Risiko für ein Hormonrezeptor-positives Mammakarzinom um 11%. Die Anzahl an Geburten hat aber keinen Einfluss auf das Risiko für die Entstehung eines Hormonrezeptor-negativen Mammakarzinoms [8].

Eine frühe Menopause stellt einen protektiven Faktor dar, prämenopausale Frauen haben ein höheres Risiko für ein Mammakarzinom als postmenopausale Frauen im gleichen Alter [9].

Viele Frauen sind in ihrem Leben Östrogenen und Gestagenen in Form von hormonellen Kontrazeptiva oder Hormonersatztherapie exponiert.

Der Einfluss der hormonellen Kontrazeptiva auf das Mammakarzinomrisiko ist sehr umstritten. Insgesamt scheint das Risiko für die Entwicklung eines triple-negativen Mammakarzinoms bei Frauen, die hormonelle Kontrazeptiva verwenden, erhöht zu sein [10].

Ein signifikanter Risikofaktor an einem Mammakarzinom zu erkranken, ist die Hormonersatztherapie. In der *Million Women Study* aus Großbritannien wurde gezeigt, dass die kombinierte Hormonersatztherapie (Östrogen + Progesteron)

das Erkrankungsrisiko für Brustkrebs bei perimenopausalen oder unmittelbar postmenopausalen Frauen signifikant erhöht. Es steigt mit der Einnahmedauer, gleicht sich jedoch 4 Jahre nach Absetzen wieder dem Erkrankungsrisiko der Nichtanwenderinnen an. Die Östradiol-Monotherapie steigerte zwar ebenfalls das Risiko, jedoch nicht so deutlich wie die Einnahme der kombinierten Hormonersatztherapie [11].

### **1.2.3 Lifestyle Faktoren**

Ein erhöhter BMI, wenig körperliche Aktivität und Alkoholkonsum [12] sind ebenfalls Risikofaktoren für die Mammakarzinomentstehung. Postmenopausale Frauen mit einem BMI>25 haben ein höheres Risiko für ER-positive Tumore als normalgewichtige Frauen [13]. Hingegen haben Frauen, die im Alter von 35 regelmäßig körperliche Aktivität ausüben, ein um 14% niedrigeres Risiko ein Brustkrebs zu entwickeln [14].

Die Strahlenexposition in jungem Alter ist ebenfalls ein Risikofaktor. Travis et al. konnten beweisen, dass Frauen, die im Rahmen eines Hodgkin-Lymphoms eine Bestrahlung des Thorax vor dem 25. Lebensjahr erhielten, ein kumulatives Risiko von 29% haben, an Brustkrebs bis zum 55. Lebensjahr zu erkranken [15].

### **1.2.4 Genetische Prädisposition**

Eine familiäre Häufung von Mammakarzinomen erhöht das Lebenszeitrisiko selbst an Brustkrebs zu erkranken. Obwohl der Großteil der Mammakarzinome (ca. 90 - 95%) sporadisch entsteht und nur circa 5 - 10% der Brustkrebserkrankungen durch eine hereditäre Form – also durch Keimbahnmutationen - verursacht wird, ist es sehr wichtig letztere zu kennen und entsprechend vorzusorgen. Typischerweise sind in diesen Fällen mehrere Familienmitglieder (inkl. Männer) betroffen und die Personen erkranken tendenziell jünger [16] [17]. Anhand einer durch die deutsche Krebsgesellschaft verfassten Checkliste kann erfasst werden, ob eine Risikoberatung in einem



Zentrum für familiären Brust- und Eierstockkrebs (FBREK) indiziert ist. Relevant sind u.a. Alter bei Erstdiagnose, uni- oder bilaterales Mammakarzinom, simultanes Ovarial/Tubenkarzinom und familiäre Anamnese plus Erkrankungsalter der Angehörigen in mütterlicher und väterlicher Linie. [18]

#### *1.2.4.1. Multigen Panel (Illumina-TruRisk®Panel-v2)*

Es gibt mittlerweile einige bekannte Genveränderungen, die mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung von Brustkrebs und auch andere Karzinome assoziiert sind. Sie werden in hoch penetrante-, moderat penetrante- und niedrig penetrante pathogene Variatianten aufgeteilt. Das Deutsche Konsortium für Familiären Brust- und Eierstockkrebs entwickelte ein Multigen Panel (aktuellste Version-Illumina-TruRisk®Panel-v2), das 13 Kerngene enthält (BRCA1, BRCA2, ATM, BARD1, BRIP1, CDH1, CHEK2, PALB2, PTEN, RAD51C, RAD51D, TP53, STK11) [19]. Bei Patientinnen oder Ratsuchenden, auf die eines der o.g. Kriterien zutrifft, werden die verschiedenen Genmutationen des Panels anhand einer EDTA-Blutanalyse getestet. Bei einem positiven Genbefund, d.h. wenn eine pathogene Variante gefunden wurde, werden die Betroffenen einem sogenannten intensivierten Früherkennungsprogramm für Mammakarzinome angeschlossen und über ggf. prophylaktische Operationen aufgeklärt und auch weitere Familienmitglieder getestet. Diese Genveränderungen sind jedoch lediglich für nur circa 35% der hereditären Mammakarzinome verantwortlich. Der Großteil der Brustkrebs- verursachenden Genmutationen ist bislang immer noch unbekannt [20].

### **1.3. Klinik**

#### **1.3.1 Lokale Symptome**

Die lokalen Symptome eines Mammakarzinoms machen sich meist erst in fortgeschrittenen Stadien (typisch ab Tumorgröße >1 cm) bemerkbar. Auffällig können palpatorisch derbe, unscharf begrenzte und nicht verschiebliche axilläre Lymphknoten sein. Außerdem können Asymmetrien der Brust, Vorwölbungen,

Einziehungen der Haut, Hautrötungen, Hautödem, Orangerhaut (Peau d'orange) und Mamillenveränderungen auftreten (Mamillenretraktion, seröse/ blutige Sekretion der Brustwarze).

In sehr fortgeschrittenen Stadien kommt es auch zu Exulzerationen und Verwachsungen mit der Thoraxwand.

Es kann zu Schwellungen der axillären/ supraklavikulären Lymphknoten, die als derb, nicht druckdolent und nicht verschieblich imponieren, kommen.

Die häufigste Lokalisation der Veränderungen ist im oberen äußeren Quadranten der Brust (60%), gefolgt vom oberen inneren Quadranten (15%) und der Mamillenregion (10%). Ein multizentrischer Befall tritt in etwa 5-25% der Fälle auf [21].

### **1.3.2 Metastasierung**

Brustkrebs metastasiert früh lymphogen und hämatogen. Man unterscheidet zwischen lokalen Lymphknotenmetastasen (Level I-III) - N1-3 - und Lymphknoten Fernmetastasen - M1- nicht regionäre Lymphknoten wie z.B. zervikale Lymphknoten oder Lymphknoten der kontralateralen Axilla [22]. Durch die Lymphknotenmetastasen kann es zur Lymphabflussstörung mit einem charakteristischen Lymphödem des Arms kommen.

Die häufigste Lokalisation der hämatogenen Metastasierung sind die Knochen. Hierbei kommt es zu osteolytischen, osteoblastischen oder gemischten Metastasen vor allem im Bereich der Wirbelsäule, des Beckens und der Röhrenknochen. Typische Symptome sind im fortgeschrittenen Stadium Knochenschmerzen, pathologische Frakturen und eine Hyperkalziämie.

Lungenmetastasen und maligne Pleuraergüsse mit Dyspnoe und Husten sind eine weitere typische Manifestation des fortgeschrittenen Mammakarzinoms.

Eine hepato gene Metastasierung mit Ikterus bis zur Leberfunktionsstörung/Leberversagen tritt ebenfalls häufig auf. Eine

Metastasierung ins ZNS kann sich mit lokalen Gehirnmastasen oder disseminiert in Form von Meningeosis carcinomatosa äußern.

Manche Mammakarzinome äußern sich primär in der Form eines CUP (Cancer of Unknown Primary) Syndroms. Dabei werden häufig erst die Metastasen symptomatisch- z.B. maligner Aszites, pathologische Frakturen, Leber- und Lungenläsionen, neurologische Defizite etc., wobei kein Primärtumor in der Brust detektierbar ist [21].

#### **1.4. Diagnostik**

Neben ausführlicher Anamnese und klinischer Untersuchung, spielen vor allem die bildgebenden Verfahren eine primäre Rolle in der frühen Diagnostik des Mammakarzinoms.

##### **1.4.1. Mammographie**

Das Mammographie-Screening-Programm, das alle 2 Jahre für asymptomatische Frauen zwischen 50 und 75 Jahren vorgesehen ist, führt zur Diagnose von Brustkrebs in bereits frühen Stadien und vor allem von präkanzerösen Läsionen wie DCIS und LCIS. Durch die Einführung des Screenings konnte eine Mortalitätsreduktion um 19 - 23% erzielt werden [23, 24].

Frauen mit einem sehr hohen Mammakarzinomrisiko (z.B. nachgewiesene Mutation in einem (Hoch-)risiko-Gen oder Heterozygotenrisiko >20%) wird ein intensiviertes Screening angeboten. Dies beinhaltet Risiko-adaptiert neben der Mammographie die Sono-und Kernspintomographie (MRT) [24].

Bei auffälligem Tastbefund ist die Mammographie der Goldstandard, insbesondere bei postmenopausalen Frauen und geringer Brustdrüsendichte.

### **1.4.2. Sonographie**

Auffälligkeiten bei jüngeren Frauen oder Frauen mit hoher Brustdichte werden durch Mammasonographie abgeklärt. Die Mammasonographie findet zusätzlich Anwendung für gezielte Biopsien oder in Ergänzung zu einem detektieren Befund in der Mammographie.

### **1.4.3. Spezielle bildgebende Untersuchungen**

CT, ggf. PET- CT und Knochenszintigraphie werden im Rahmen vom Staging oder Metastasenabklärung durchgeführt.

### **1.4.4. Biopsie**

Eine prätherapeutische Biopsie - sonographisch gesteuert oder unter stereotaktischer mammographischer Kontrolle - gehört zu den Standards der Mammadiagnostik. Damit wird die Tumorbilogie definiert, was elementar für die Therapieplanung ist [25].

## **1.5. Pathologie**

### **1.5.1 Histologische Typen**

Die aktuellste, 5. Auflage der histopathologischen WHO-Klassifikation der Mammakarzinome unterteilt die Tumore in no special type (NST) und special type-Karzinome (wenn der Tumor mehr als 90% charakteristische Merkmale aufweist) [26].

Das invasive Karzinom NST kommt in 40 - 75% der Fälle vor und ist damit der häufigste Subtyp.

Das invasive lobuläre Karzinom ist mit 5 -15% der häufigste Subtyp von den speziellen Mammakarzinomtypen. Charakteristisch dafür ist ein oft bilateraler Befall, sowie ein typisches Metastasierungsmuster (in Knochen, Meningen und Peritoneum). Lungenmetastasen sind seltener als beim NST- Karzinom.

Andere typische Merkmale sind Hormonrezeptorpositivität und HER2/neu-Negativität. Das invasive lobuläre Karzinom hat ein schlechteres 10-Jahre-Überleben als das NST-Karzinom [27].

Die rein tubulären und rein muzinösen Mammakarzinome kommen in jeweils 2% der Fälle vor. Sie haben eine sehr gute Prognose und sind in der Regel Hormonrezeptor-positiv und HER2/neu negativ [27].

### **1.5.2. TNM-Klassifikation**

Das Tumor-Node-Metastasis (TNM) System der UICC ist ein weltweit akzeptiertes Verfahren für die Beschreibung der anatomischen Ausbreitung und damit Staging von Krebsarten. Als international verbreitete Tumorsprache erleichtert es die Therapieplanung, gibt Auskunft über die Prognose, hilft bei der Evaluation und Vergleich von Therapieergebnissen und erleichtert den Informationsaustausch unter verschiedenen Zentren [28].

Die Einteilung basiert auf der pathologischen und klinischen Ausdehnung der Tumorerkrankung. Mithilfe des TNM-Systems wird das Mammakarzinom in Stadien unterteilt, die mit der Prognose der Erkrankung korrelieren. Die Therapiestrategien werden u.a. entsprechend des UICC-Stadiums gewählt. *(Für die genaue Stadieneinteilung verweisen wir auf TNM Classification of Malignant Tumors 8. Edition [29]).*

#### **1.5.2.1. T-Status**

T steht für die primäre Tumorgröße. Die Tumore werden histopathologisch nach Größe in cm unterteilt. T1 steht für Tumor  $\leq 2$  cm; T2 für Tumor  $> 2$ cm aber  $\leq 5$ cm; T3 für Tumor  $> 5$ cm; T4 für Tumor jeder Größe mit direkter Ausdehnung auf die Brustwand oder Haut. T0 steht für „keinen Anhalt für Primärtumor“ (z.B. beim CUP-Syndrom, oder im Z.n. neoadjuvanter Chemotherapie). TX wird gegeben, wenn der Primärtumor nicht beurteilt werden kann. Tis steht für Carcinoma in situ [29].

#### 1.5.2.2. N-Status

N steht für Nodus; Fehlen oder Vorhandensein von regionären Lymphknotenmetastasen. N1 bezieht sich auf Befall von 1-3 ipsilateralen axillären Lymphknoten (LK) oder von LK entlang der A. mammaria interna. N2- für 4-9 Lymphknotenmetastasen in denselben Gebieten. N3 für Metastasen in mind. 10 LK infraklavikulär oder supraklavikuläre LK-Metastasen.

N0- keine Lymphknotenmetastasen. NX- regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar.

Das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen cervical oder in der kontralateralen Axilla wird als Fernmetastasierung (M1) klassifiziert [29].

#### 1.5.2.3. M-Status

M steht für Metastasen- Nachweis oder Fehlen von Fernmetastasen. M0: keine Fernmetastasen. M1: Fernmetastasen. MX wird verwendet, wenn die Beurteilung des Vorliegen von Fernmetastasen nicht möglich ist [29].

### 1.5.3. Grading

Das Grading ergibt den Differenzierungsgrad des Tumorgewebes- inwiefern das Tumorgewebe vom normalen Gewebe abweicht. Die UICC teilt die neoplastischen Zellen in 4 Grade ein. Die Prognose verschlechtert sich mit steigendem Grad und die Tumoraggressivität steigt mit höherem G-Stadium.

G1- gut differenziert, „low grade“, ähnelt dem Ursprungsgewebe am meisten

G2- mäßig differenzierte Tumorzellen

G3- schlecht differenzierte Tumorzellen

G4- nicht differenziertes malignes Gewebe (anaplastisch). Der Tumor kann nicht oder manchmal nur mithilfe immunhistochemischer Typisierung zugeordnet werden [29].

#### **1.5.4. Hormonrezeptorstatus**

Die Bestimmung des Hormonrezeptorstatus ist von entscheidender Relevanz für die Prognose und Behandlung des Mammakarzinoms. Diese Bestimmung ist obligat für die Primärdiagnostik und wird bereits an der Stanzbiopsie durchgeführt, um eine optimale Therapieplanung (ggf. neoadjuvante Therapie) zu ermöglichen [30].

Immunhistologisch wird der Östrogenrezeptor- (ER) und der Progesteronrezeptorstatus (PR) bestimmt. Nach der Empfehlung der ASCO/CAP-Leitlinien 2010 wird der Hormonrezeptorstatus in 3 Kategorien unterteilt. Ein Mammakarzinom ist ER/PR positiv, wenn >10% der Tumorzellen positiv für ER/PR sind. Wenn 1-9% der Tumorzellen ER/PR positiv sind, wird das Karzinom als gering positiv bezeichnet. Wenn weniger <1% der Tumorzellen ER/PR positiv sind, wird das Karzinom als ER/PR negativ klassifiziert [31].

#### **1.5.5. HER2/neu-Status**

Die Bestimmung von HER2 gehört ebenfalls zur Standarddiagnostik bei Brustkrebs. Der Status ist prädiktiv für eine (neo)adjuvante Behandlung mit einem monoklonalen Antikörper (Trastuzumab/Pertuzumab). Die Bestimmung erfolgt immunhistochemisch (ICH) und/ oder mit Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH).

Der Testalgorithmus ist sehr komplex. Das IHC-Reaktionsmuster teilt sich in 0 (keine Färbereaktion), 1+ (schwache Reaktion), 2+ (gering- bis mittelgradige Reaktion) und 3+ (starke Reaktion). 0 und 1+ gelten als HER2/neu- negativ. 2+ als schwach positiv und 3+ als stark positiv. Bei 2+ wird zusätzlich eine FISH-Bestimmung durchgeführt, die sich in negativ, borderline und positiv aufteilt [32].

HER2/neu-positive Tumore sind in der Regel aggressiver und haben tendenziell eine schlechtere Prognose. Sie profitieren jedoch deutlich von der Antikörper-Therapie mit Trastuzumab/Pertuzumab in Kombination mit einer Chemotherapie, was die Prognose, seit deren Einführung deutlich verbessert hat [33].

### 1.5.6. Ki-67-Proliferationsindex

Das Protein Ki-67 wird als Indexprotein für die Bestimmung der sich teilenden menschlichen Zellen benutzt. Deren immunhistochemisch bestimmter Expressionsgrad dient als Marker der Wachstumsgeschwindigkeit der Malignomzellen. Höhere Ki-67-Expression zeigt ein höheres Proliferationsmuster und ist ein Zeichen für höhere Aggressivität. Neoplasien mit hoher Ki-67-Expression sprechen besser auf zytostatische Therapien an. Aus diesem Grund wird der Ki-67-Status in die Entscheidung für oder gegen eine (neo)adjuvante Chemotherapie miteinbezogen. Ki-67 bewies sich zudem als ein Marker für das endokrine Ansprechen HR-positiver Tumore nach einer präoperativen endokrinen Induktionstherapie. [34] Es zeigt sich auch ein Zusammenhang zwischen Ki-67 und dem Gesamt- und krankheitsfreien Überleben [35] [36].

### 1.5.7. Immunhistochemische molekulare Subtypisierung

Die molekulare Subtypisierung des Mammakarzinoms anhand der Hormonrezeptoren, des HER2/neu- und Ki-67-Status hat sich für die Therapieentscheidung und Prognose des Mammakarzinoms etabliert und ist eine der wichtigsten Bestandteile in der Systemtherapieplanung (Antihormontherapie/Chemotherapie) des frühen Mammakarzinoms. Die 5 verschiedenen Subtypen haben einen sich deutlich unterscheidenden klinischen Verlauf:

- **Luminal A:** ER- und/oder PR positiv und HER2/neu negativ und Ki-67 niedrig
- **Luminal B:**
  - HER2/neu negativ: ER und/oder PR positiv, HER2/neu negativ und Ki-67 hoch
  - HER2/neu positiv: ER und/oder PR positiv, HER2/neu positiv und Ki-67 hoch oder niedrig
- **HER2/neu positiv (nicht luminal):** ER und PR negativ und HER2/neu positiv



- **Basal-like (triple negativ):** ER und PR negativ und HER2/neu negativ [37]

Tumore mit Luminal-A like Biologie werden adjuvant mit alleiniger endokriner Therapie behandelt. Bei den übrigen Subtypen wird in den meisten Fällen eine Chemotherapie empfohlen. Bei den HER2/neu-positiven Mammakarzinomen wird zusätzlich noch eine Anti-HER2-gerichtete Therapie durchgeführt [27].

## **1.6. Therapie**

Die Erkrankung wird multimodal und stadienabhängig behandelt. Im Prinzip beinhaltet die Therapie des frühen Mammakarzinoms mehrere Bausteine: operative Therapie (brusterhaltend versus ablativ), Chemotherapie, Strahlentherapie, Antihormontherapie und Therapie mit zielgerichteten Substanzen. Zusätzlich spielt die supportive Therapie mit z.B. Bisphosphonaten, Analgetika und anderen Medikamenten eine wichtige Rolle.

### **1.6.1. Operative Therapie**

Die operative Therapie des Mammakarzinoms hat als Ziel die absolute tumorfreie Resektion des Tumors im Gesunden (R0). Die R0-Resektion ist ein wichtiger Faktor für das niedrige Lokalrezidivrisiko.

Es gibt zwei Grundverfahren: Die Brusterhaltende Operation (BEO) und die Mastektomie. Zu den Kriterien, die für die Entscheidung zwischen den beiden Verfahren berücksichtigt werden müssen, gehören die Größe, Fokalität und Lokalisation des Karzinoms, die Brustgröße, der Wunsch der Patientin, sowie Kontraindikationen gegen eine BEO oder nachfolgende Strahlentherapie [27].

#### *1.6.1.1. BEO*

Die Brusterhaltende Operation beinhaltet idealerweise die vollständige Entfernung des Tumors inklusive genug tumorfreiem Resektionsabstand. Häufig

erfolgt eine präoperative Markierung mittels Sonographie oder Mammographie. Das Tumorbett wird geclippt und dient nach Entfernung der Raumforderung als Orientierungspunkt für die nachfolgende Bestrahlung.

Die günstige Tumorgroße-Brustvolumen-Relation ist essenziell für schöne plastische Ergebnisse. Bei großen Tumoren, bei denen aber eine BEO noch möglich ist, kommen zusätzlich onkoplastische Methoden für eine bessere Ästhetik zum Einsatz.

Eine Voraussetzung für die BEO ist die nachfolgende lokale Bestrahlung. Eine Kontraindikation gegen eine Radiatio, der explizite Patientenwunsch oder ein inflammatorisches Mammakarzinom stellen Kontraindikationen für die Durchführung einer BEO dar [27] [38].

#### *1.6.1.2. Mastektomie*

Die Mastektomie ist die komplette Entfernung der Brust. Sie wird durchgeführt bei den o.g. Kontraindikationen für eine BEO oder bei inkompletter Tumorentfernung nach BEO und Nachresektion.

Es gibt unterschiedliche Verfahren- die alleinige Entfernung der Brust ohne Rekonstruktion (Ablatio simplex) versus Mastektomie mit simultaner oder späterer Rekonstruktion. Die verschiedenen Optionen müssen intensiv mit der Patientin diskutiert werden.

Die modifizierte radikale Mastektomie (MRM) beinhaltet die Entfernung des Brustgewebes, Pektoralfaszie, Mamillen-Areola-Komplex (MAK) und Haut. In den letzten Jahren wird aber zunehmend die Hautsparende Mastektomie (skin-sparing mastectomy SSM) und/oder MAK-sparende Mastektomie (nipple-sparing mastectomy NSM) durchgeführt. Alle Methoden zeigen vergleichbare Rezidivraten bei R0-Resektion [27] [39].

#### 1.6.1.3. SLNB

Die Sentinel-Lymphknoten Biopsie (SLNB) (Entfernung oder Biopsie von Wächterlymphknoten (2-4)) ist ein Standardverfahren in Kombination mit der BEO. Das Ergebnis ist von Bedeutung für die Planung der nachfolgenden adjuvanten Therapie.

Die SLNB wird durchgeführt, wenn es klinisch und sonographisch keinen Hinweis auf einen Lymphknotenbefall gibt. Damit kann eine Axilladisektion mit der damit verbundenen Morbidität erspart werden. Die Lokalisierung der Wächterlymphknoten erfolgt mittels Gammasonde nach radioaktiver Markierung mittels Technetium [38, 40].

#### 1.6.1.4. Axilläre Lymphadenektomie (ALND)

Die axilläre Lymphadenektomie von mindestens 10 Lymphknoten in Level I und II ist immer noch das Standardverfahren bei klinisch oder sonographisch suspekten Lymphknoten [41, 42].

Diese ist mit einer erhöhten Morbidität durch Schmerzen, Lymphödem, Sensibilitätsstörungen und Bewegungseinschränkungen verbunden.

#### 1.6.1.5. Targeted axillary Dissection (TAD)

Eine andere schonende Therapiemöglichkeit ist die gezielte axilläre Lymphknotenentfernung (TAD). Axilläre LK, die idealerweise histopathologisch abgeklärt wurden vor einer Therapie, werden zum Wiederauffinden nach NACT geclipped bei der entnommenen Stanzbiopsie. Sie können vor der Operation Drahtmarkiert und so gezielt entfernt werden.

Das Verfahren beinhaltet eine SLNE und gezielte Entfernung der clipmarkierten Target Lymphknoten (TLN), meist bis zu 3 [43].

## 1.6.2. Systemische Therapie

Heutzutage wird die systemische Therapie weitestgehend anhand der Tumorbilogie der Biopsie gewählt. Je nach Hormonstatus, HER2/neu-Expression, Grading und Ki-67-Expression bieten sich unterschiedliche Substanzen an, die in der frühen Erhaltungssituation in Kombination, neoadjuvant oder adjuvant angewendet werden.

### 1.6.2.1. Chemotherapie

Eine zytostatische Therapie (Chemotherapie und/oder Anti-HER2-Therapie) ist in verschiedenen Fällen indiziert u.a.:

- Bei triple-negativem Tumor ( $\geq$  pT1b, pN0)
- HER2-positivem Tumor ( $\geq$  pT1b, pN0)
- Luminal-B-Tumor ( $\geq$  pT1c) mit aggressiver Tumorbilogie
- bei  $>3$  befallenen Lymphknoten

Wenn eine Chemotherapie anhand o.g. Faktoren indiziert ist, sollte sie neoadjuvant durchgeführt werden [27, 44].

Das Standardtherapiekonzept beinhaltet eine Kombinationstherapie von Anthrazyklin und Cyclophosphamid, gefolgt von einem Taxan. Patientinnen mit HER2neu-positivem Mammakarzinom erhalten zusätzlich eine (neo-)adjuvante Therapie mit dem monoklonalen Antikörper Trastuzumab, je nach Risiko in Kombination mit Pertuzumab, für insgesamt 1 Jahr [45].

In der metastasierten Situation werden unterschiedliche Zytostatika angewendet. Anthrazykline, Taxane (als Mono- oder Kombitherapie), Platine (z.B. bei TNBC), orales Capecitabin, Methotrexat (z.B. intrathekal bei Meningiosis carcinomatosa). Dabei steht primär die Lebensqualität im Vordergrund [46].

### 1.6.2.2. Antihormontherapie

Eine endokrine Therapie reduziert signifikant das Rezidivrisiko und das Mortalitätsrisiko bei Hormonrezeptor-positiven Tumoren. Sie wird nach

Abschluss der Chemotherapie und ggf. simultan zur Strahlentherapie begonnen. In der Regel ist eine initiale Therapie für mindestens 5 Jahre empfohlen, mit Option zur Verlängerung bei aggressiveren Tumoren mit hohem Rezidivrisiko [27].

Die Substanzwahl ist vom Menopausenstatus der Frau abhängig. Bei prämenopausalen Frauen kann Tamoxifen (selektiver Östrogen-Rezeptor Modulator) für die erste 5 -10 Jahre verwendet werden. Eine Fortführung der Therapie mit Aromataseinhibitoren bei sicher postmenopausal gewordenen Frauen nach initialer Tamoxifentherapie ist bei entsprechender Indikation empfohlen [47].

Jüngere Patientinnen, die eine Chemotherapie erhalten haben und ein hohes Rezidivrisiko haben, profitieren je nach Risiko von einer Kombinationstherapie mit Tamoxifen oder Aromataseinhibitor plus GnRH-Analogon [48].

Bei postmenopausalen Frauen werden Aromataseinhibitoren (AI) (Anastrozol, Letrozol, Exemestan) und ebenfalls Tamoxifen eingesetzt. In der Regel wird mit einem nebenwirkungsreicheren AI begonnen, bei schlechter Verträglichkeit kann ggf. nach 2-3 Jahren auf Tamoxifen umgestellt werden [49].

Die Antihormontherapie wird auch in der metastasierten Situation und oft in Kombination mit anderen Medikamenten (z.B. CDK4/6-Inhibitoren, mTOR-Inhibitoren) angewendet [50].

### *1.6.2.3. Zielgerichtete Substanzen*

#### *1.6.2.3.1. CDK4/6-Inhibitoren*

Die CDK 4/6-Inhibitoren sind zielgerichtete Präparate, die die cyclinabhängigen Kinasen (Übergang von G1- in S-Phase bei der Zellteilung) blockieren. Diese oralen Medikamente (Palbociclib, Ribociclib, Abemaciclib) - in Kombination mit einer Antihormontherapie haben sich seit einigen Jahren als gut verträgliche Erstlinientherapie beim HR+, HER2-negativen lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Mammakarzinom etabliert (PALOMA-Studien, MONALEESA-Studien, MonarchE-Studie) [51].

#### 1.6.2.3.2. mTOR- Inhibitor

Everolimus ist ein orales Medikament, das das mTOR-Protein (wichtiger Regulator der Zellproliferation) blockiert. Die Kombination von Everolimus und Exemestan wird beim HR-positiven, HER2-negativen fortgeschrittenen Mammakarzinom bei postmenopausalen Patientinnen angewendet [51].

#### 1.6.2.3.3. Immuntherapie

Zu den bekanntesten Immuntherapie-Substanzen gehören die sog. Check-point-Inhibitoren. Diese monoklonalen Antikörper blockieren bestimmte Proteine (PD-L1, PD-1), die am programmierten Zelltod beteiligt sind und ermöglichen dadurch eine verstärkte Immunantwort gegen die Krebszellen [52].

Atezolizumab wird beim fortgeschrittenen und metastasierten, PD-L1 positiven, TNBC entweder als Monotherapie oder in Kombination mit Chemotherapie (z.B. nab-Paclitaxel) eingesetzt. Diese Therapie ermöglicht eine Verlängerung des Gesamtüberlebens um circa 7 Monate.

Pembrolizumab wird zusätzlich beim triple negativen frühen Mammakarzinom in Kombination mit Chemotherapie angewendet, was eine deutlich erhöhte Komplettremissionrate bewirkt [53].

#### 1.6.2.3.4. PARP-Inhibitoren

Die PARP-Inhibitoren sind Substanzen, die den Enzymkomplex PARP (Poly-ADP-ribose-Polymerase) blockieren und damit die Apoptose von Zellen stimulieren. Tumorzellen bei Patientinnen mit BRCA-Mutation sind besonders empfindlich gegenüber PARP-Inhibitoren [54, 55].

Olaparib als bekanntester PARP-Inhibitor ist in Deutschland zugelassen für die Therapie von Patientinnen mit BRCA-Mutation beim frühen HER2-neu negativen Mammakarzinom mit hohem Rezidivrisiko oder non-pCR (pathological complete response) nach Operation und (neo) - adjuvanter Chemotherapie mit einem 3-

Jahre-invasiven-Krankheits-freien Überleben von 85,9% vs. 77,1% in der Placebogruppe (OlympiA Studie). [56]

Olaparib wird auch bei Patientinnen mit einem fortgeschrittenen metastasierten HER2-neu-negativen Mammakarzinom nach max. 2 Therapielinien verabreicht. Es zeigt eine Ansprechrate von 55% und einen Vorteil im progressionsfreien Überleben ((PFS)-Vorteil) [54, 57] .

### **1.6.3. Strahlentherapie**

Die adjuvante Bestrahlung nach brusterhaltender Therapie hat sich als obligatorischer Teil der Therapie des frühen Mammakarzinoms etabliert. Die Radiatio beinhaltet eine Ganzbrustbestrahlung in mehreren Einzeldosen. Damit kann das Risiko für ein Lokalrezidiv nach 10 Jahren von 25,1% auf 7,7% reduziert werden [58]. Die Bestrahlung der regionären Lymphabflusswege hat sich für bestimmte Fälle - z.B. bei bestimmten Konstellationen aus Tumorlokalisierung, Alter, Grading, Hormonrezeptorstatus und je nach axillärem Befall und operativer Therapie - als positiv erwiesen.

Die Radiatio wird auch bei Mammakarzinommetastasen zur Schmerzlinderung angewendet. Knochenmetastasen sprechen in der Regel sehr gut auf eine Bestrahlung an, was zu einer Schmerz,- und Frakturdektion führt [59].

Die Strahlentherapie wird auch im Rahmen von Hirnmetastasen angewendet. Bei singulären Hirnmetastasen wird sie in Form von stereotaktischer Strahlentherapie oder als Radiochirurgie durchgeführt. Bei multiplen Hirnmetastasen wird eine Ganzhirnbestrahlung durchgeführt. In 60-70% der Fälle kann dadurch eine Verbesserung des neurologischen Status erreicht werden [59].

Zusätzlich findet die Strahlentherapie Anwendung im Rahmen von singulären Lungenmetastasen und bei Haut-/Weichteilmetastasen [59].

Bei der Indikationsstellung für eine Strahlentherapie müssen aber immer die akuten (Hautschäden, Epitheliolysen) und späten (Fibrose, kardiale Schädigung,

Zweitmalignome) Nebenwirkungen betrachtet werden. Mit der Entwicklung moderner Bestrahlungsmethoden können diese Nebenwirkungen jedoch auf ein Minimum reduziert werden [60].

## **2. BRCA1 und BRCA2 Mutation**

Die BRCA1- und BRCA2 - Gene sind Tumorsuppressor-Gene. Eine Mutation in diesem Bereich führt zur genomischen Instabilität und DNA-Reparatur-Fehlern, was die Entstehung von Neoplasien begünstigt. Mutationen im BRCA1 - und BRCA 2 - Gen werden autosomal-dominant vererbt. Die Mutationen können heterozygot in der Keimbahn vorliegen oder als somatische Mutationen neu entstehen. Bei heterozygoten Keimbahnmutationen ist ein Allel gesund und das andere mutiert. Kommt es zu einer zusätzlichen somatischen Mutation im gesunden Allel, verliert die Zelle einen wichtigen Teil ihres DNA-Reparaturmechanismus, was die Karzinogenese begünstigt [61].

Die Prävalenz für eine BRCA1- oder BRCA2-Mutation liegt zwischen 1/300 und 1/500 je nach Ethnizität.

Das Vorliegen einer BRCA-Mutation erhöht das Risiko ein Mamma- oder Ovarialkarzinom zu entwickeln gegenüber der Normalbevölkerung deutlich.

BRCA1-Mutationsträger haben ein bis zu 70%-iges Risiko vor dem 70. Lebensjahr an einem Mammakarzinom zu erkranken. Im Vergleich dazu, beträgt dieses Risiko bei Non-Carriers 16%.

Zudem erkranken Mutationsträger deutlich früher an einem Mammakarzinom im Vergleich zur Normalbevölkerung (mittleres Erkrankungsalter 44 Jahre bei BRCA1 und 47,5 Jahre bei BRCA2) und haben ein erhöhtes Risiko für ein kontralaterales Karzinom (44% bei BRCA1 und bis 25% bei BRCA2-Mutation verglichen mit 3,6% bei Non-Carriers nach 10 Jahren).

Zusätzlich haben BRCA-Mutationsträgerinnen auch ein erheblich gesteigertes Risiko für die Entstehung eines Ovarialkarzinoms, bei BRCA1-Mutationsträgerinnen bis 44% und bei BRCA2-Mutationsträgerinnen bis 18%.



Das Lebenszeit-Erkrankungsrisiko bei der Allgemeinbevölkerung liegt bei 1,2% [61, 62].

BRCA-mutierte Mammakarzinome weisen charakteristische Merkmale auf. So haben BRCA1-positive Tumoren typischerweise einen „basalen epithelialen Phänotyp“ [62, 63], sind schlecht differenziert (meist G3) und haben ein größeres Tumolvolumen (>2cm). Auch sind die meisten BRCA1-positiven Mammakarzinome triple-negativ, was sie zwar aggressiver, aber auch sensibler gegenüber einer (neo)adjuvanten Chemotherapie macht [64-66].

Im Gegensatz dazu sind die BRCA2-Mammakarzinome meist ähnlich den sporadischen Tumoren. Am häufigsten liegt ein Luminal-B-like Karzinom vor, etwa 35% sind vom Luminal-A-Typ und nur 17% sind triple-negativ [61].

Unter Voraussetzung bestimmter Risikokriterien können diese Patientinnen mit einem PARP-Inhibitor (z.B. Olaparib) therapiert werden.

## **2.1 Assoziierte Karzinome**

Neben dem erhöhten Risiko für Mamma- und Ovarialkarzinom ist eine BRCA1/2-Mutation auch mit anderen Tumorerkrankungen assoziiert. Für BRCA1 konnte bisher kein eindeutiger Zusammenhang mit anderen Karzinomtypen identifiziert werden [67], BRCA2-Mutationsträger haben jedoch ein erhöhtes Risiko an Kolon,- Prostata,- und Pankreaskarzinom zu erkranken. Die Patienten mit einem BRCA2-mutierten Prostatakarzinom erkranken typischerweise in jüngerem Alter und haben eine schlechtere Prognose als die Non-Carriers [68].

## **2.2. Prävention**

### **2.2.1 Primäre Prävention**

Die primäre Prävention konzentriert sich darauf die Entstehung der Krankheit zu verhindern.

### *2.2.1.1 Lebensstil*

Auch bei Hochrisikogruppen wie die BRCA-Mutationsträgerinnen hat sich eine Lebensstilveränderung als risikoreduzierende Maßnahme als positiv erwiesen. Im Vordergrund steht die Vermeidung von Übergewicht. Gesunde fettarme Ernährung und Ausdauersport zeigen eine signifikante Erkrankungsrisikoreduktion [69], wobei Alkoholkonsum und fettreiche Ernährung als risikoerhöhend gelten.

Sportliche Aktivität zeigte sich zudem auch als prognoseverbessernder Faktor bei bereits erkrankten Patientinnen [70, 71] .

Zusätzlich wurde Stillen bei BRCA1-Mutationsträgerinnen ebenfalls als protektiver Faktor identifiziert [72, 73].

### *2.2.1.2 Prophylaktische Operationen*

Prophylaktische Operationen bieten den maximal möglichen Schutz vor einer Erkrankung [74-76].

Zu den präventiven operativen Eingriffen gehören die bilaterale risikoreduzierende Mastektomie und die risikoreduzierende bilaterale Salpingo-Oophorektomie.

Die prophylaktische Mastektomie führt zu einer Risikoreduktion von ca. 95% für das Mammakarzinom [77]. Das ideale Alter ist nicht genau definiert und hängt auch von dem Ersterkrankungsalter in der Familie ab. Meist wird eine Mastektomie zwischen 30 und 40 Jahren bei BRCA1-Mutationsträgerinnen und zwischen 40 und 50 Jahren bei BRCA2-Mutationsträgerinnen durchgeführt [78].

Die prophylaktische Salpingo-Oophorektomie reduziert das Risiko für ein Ovarialkarzinom bis zu 96% und ist den BRCA-Mutationsträgerinnen bislang noch alternativlos ab dem 40. Lebensjahr zu empfehlen [79] .

Ob dadurch jedoch auch das Risiko an einem Mammakarzinom zu erkranken reduziert werden kann, kann nicht eindeutig belegt werden [79, 80].

### *2.2.1.3 Chemoprävention*

Die medikamentöse Prävention zeigt einen Effekt zur Risikoreduktion, hat sich aber aufgrund des starken Nebenwirkungsprofils und der damit verbundenen niedrigen Compliance in Deutschland nicht etabliert.

Tamoxifen reduziert das Risiko an Hormonrezeptor-positiven Brustkrebs zu erkranken bis zu 45% [81, 82] und Exemestan sogar bis zu 65% [83]. Dieser Effekt konnte für das Ovarialkarzinom leider nicht belegt werden. Auf der anderen Seite erhöht Tamoxifen das Risiko für Thrombembolien, einen Katarakt und am Endometriumkarzinom zu erkranken [81].

Aus diesem Grund werden in Deutschland die SERMs und Aromatase-Inhibitoren als primär präventive Maßnahmen deutlich seltener angewendet als in den USA [81].

## **2.2.2 Sekundäre Prävention**

Die sekundäre Prävention beinhaltet die Früherkennung der Erkrankung.

### *2.2.2.1 Intensivierte Früherkennung*

In Deutschland wurde ein strukturiertes intensiviertes Früherkennungsprogramm etabliert mit dem Ziel, das Mammakarzinom in einem sehr frühen Stadium zu diagnostizieren und damit das metastasenfremie Gesamtüberleben zu steigern und die Mortalität zu reduzieren. An diesem Programm können Frauen mit Mutationen in den Hochrisiko-Genen und Frauen mit rechnerisch erhöhtem Risiko ohne Nachweis einer pathogenen Mutation teilnehmen. Für BRCA-Mutationsträgerinnen beginnt die Früherkennung mit 25 Jahren (oder 5 Jahre vor dem frühesten Erkrankungsalter in der Familie) und endet mit 70 Jahren. Für Frauen mit Risiken ohne Mutation vom 30. bis 50. Lebensjahr. Ab 50 Jahren geht dann die intensivierte Früherkennung in die allgemeine Routine-Mammographie über [84].

Die MRT hat sich als Goldstandard der intensivierten Früherkennung etabliert. Sie wird jährlich bei BRCA-Mutationsträgerinnen durchgeführt. Mit ihrer großen Sensitivität besonders bei dichtem Parenchym bei jungen Frauen und fehlender Strahlenbelastung hat diese Untersuchungsmodalität in der Früherkennung einen großen Stellenwert. Über 90% aller erkannten Mammakarzinome sind in der MRT sichtbar. Eine Kontroll-MRT wird auch 6 Monate nach prophylaktischer bilateraler Mastektomie zur Beurteilung des Restbrustdrüsengewebes durchgeführt [85] [86, 87].

Die Sonographie dient vor allem als ergänzende Früherkennungsmethode zur MRT und Mammographie. Mit ihrer höheren Sensitivität vor allem bei dichtem Parenchym erhöht die Sonographie die Detektionsrate. Sie wird standardmäßig zur Spezifitätserhöhung im Anschluss an die MRT durchgeführt. Die aktuelle Empfehlung für BRCA-Mutationsträgerinnen ist eine Sonographie ab 25 Jahren halbjährlich und nach jeder MRT-Untersuchung durchzuführen [88, 89].

Die Mammographie hat eine untergeordnete Rolle im Rahmen der intensivierten Früherkennung. Der Grund dafür ist die verminderte Sensitivität bei höherer Parenchymdichte bei zusätzlich vermeidbarer Strahlenbelastung. Daher wird die Mammographie bei BRCA-Mutationsträgerinnen erst ab dem Alter von 40 Jahren alle 1-2 Jahren empfohlen [90].

### **2.2.3 Tertiäre Prävention**

Die tertiäre Prävention dient der Begrenzung der Erkrankungsfolgen und Vermeidung von Rezidiven. Hinsichtlich der Therapie gibt es keinen Unterschied zwischen dem hereditären Mammakarzinom und dem vom sporadischen Typ.

#### *2.2.3.1 Operative Therapie (Mastektomie oder BEO)*

Zahlreiche Studien haben keinen signifikanten Unterschied zwischen der brusterhaltenden Operation mit nachfolgender Bestrahlung und der Mastektomie bei Mutationsträgerinnen gezeigt [91, 92]. Es ist jedoch wichtig zu bemerken,

dass je jünger eine Patientin erkrankt, desto höher ist auch das Risiko für ein Lokalrezidiv. Das Gesamtüberleben wird durch dieses Risiko nicht negativ beeinflusst [93].

BRCA-Mutationsträgerinnen haben ein signifikant höheres Risiko für die Entwicklung eines Brustkrebses der kontralateralen Seite. Dies muss im Rahmen der Therapieaufklärung berücksichtigt werden, da viele Frauen sich somit für eine Mastektomie der erkrankten Seite und eine prophylaktische Mastektomie der kontralateralen Seite entscheiden [92, 94-97] .

#### *2.2.3.2 Systemtherapie*

Die Therapie der BRCA-mutierten Mammakarzinome ist gleich der Therapie der sporadischen Formen. Im Fall des triple-negativen Brustkrebses (häufig BRCA-mutiert) wird eine Anthrazyklin-Taxan-basierte neoadjuvante Chemotherapie durchgeführt. Die neuesten Studien zeigen einen Vorteil der Hinzunahme eines Platin-Derivates (z.B. Carboplatin) bei triple-negativen Mammakarzinomen, sowie von dem Check-point-Inhibitor Pembrolizumab [98-101].

#### *2.3.3.3 PARP-Inhibitoren*

Die PARP-Inhibitoren haben sich mit ihrem relativ niedrigen Nebenwirkungsprofil, der einfachen oralen Anwendung und großen Wirksamkeit in der Therapie des Mamma- und Ovarialkarzinoms durchgesetzt. Bei BRCA-Mutationsträgerinnen ist Olaparib bei fortgeschrittenem, HER2-neu-negativen Brustkrebs nach max. 2 Linien Chemotherapie (eine davon Anthrazyklin/Taxane-basiert, sowie ggf. nach endokriner Therapie) seit 2019 zugelassen. Seit 2022 wurde Olaparib auch für die Therapie von frühen, HER2-neu negativen Mammakarzinomen mit hohem Rezidivrisiko bei BRCA-Mutationsträgerinnen im Anschluss an die Operation und (neo)adjuvante Chemotherapie und ggf. endokrine Therapie zugelassen [56].

Zahlreiche Studien untersuchen aktuell die Effektivität verschiedener PARP-Inhibitoren beim Mammakarzinom (z.B. Embraca (Talazoparib), OlympiAD (Olaparib), VELIA (Veliparib) etc.) [102, 103].

### **3. BRCA1- und BRCA2- Proteine**

#### **3.1 Das BRCA1- Protein**

BRCA1 ist ein Schlüsselprotein der Zellfunktion und wird von dem BRCA1- Gen gebildet, das auf Chromosom 17q21 liegt. Das Gen beinhaltet 22 Exons und kodiert das aus 1863 Aminosäuren bestehende BRCA1- Protein [104].

Dieses bildet Komplexe und interagiert mit anderen Proteinen, um seine Funktion in der homologen Rekombination - die Reparatur von Doppelstrangbrüchen in der DNA - zu erfüllen. Zusätzlich ist es an Transkription, Apoptose, Chromatinremodelierung und Zentrosomenduplikation im Zellzyklus beteiligt [105].

Eine wichtige Funktion des BRCA1-Proteins ist auch seine Ubiquitin E3-Ligase-Aktivität. Das Ubiquitin-System beinhaltet drei wichtige Enzyme: E1- Ubiquitin-Aktivierungsenzym, E2- Ubiquitin- Konjugierungsenzym und E3- Ubiquitin-Ligase. Das E3 dient als Katalysator für die Formierung von Polyubiquitinketten durch die Verwendung von Ubiquitinen, die bereits durch E1 und E2 aktiviert wurden. Das E3 überträgt sie auf spezifische Substrate mithilfe von isopeptiden Bindungen [106, 107].

Mit dem Protein BARD1 bildet BRCA1 ein RING-Heterodimer, welches die Struktur von BRCA1 stabilisiert und seine E3-Ligase-Aktivität verstärkt [108]. Dieser Prozess ist ein Schlüsselmoment der Tumorsuppression, weil die Ubiquitinierung eine wichtige Rolle für die Rekrutierung von BRCA1 zu einer beschädigten DNA-Stelle spielt [109] .

Es existiert eine sog. Mammakarzinom-assoziierte RING-Finger-Mutation, die den BRCA1-BARD1 Komplex inaktiviert. Diese Entdeckung weist auf die

Bedeutung der Ligasenaktivität von BRCA1 in der Verhinderung der Mammakarzinomentstehung hin [110] [111].

### **3.2 Das BRCA2- Protein**

Das BRCA2- Gen befindet sich auf Chromosom 13q13 und beinhaltet 26 Exons. Das BRCA2- Protein ist ein Riesenprotein bestehend aus 3416 Aminosäuren. Über 70% des BRCA2- Proteins sind nicht erforscht. Die limitierten Daten, die wir haben, zeigen, dass das BRCA2- Protein eine essentielle Rolle in der Genomstabilität spielt. Seine verschiedenen Funktionen beinhalten u.a. Beteiligung an der homologen Rekombination, G2-Ckeckpoint-Kontrolle, Schutz der Replikationsgabeln und Unterstützung des zellulären Widerstands gegen DNA-Schädigung [112].

Es wird vermutet, dass BRCA2 seine Funktion als Tumorsuppressor auch durch Beteiligung an der Doppelstrang-DNA-Reparatur erfüllt. Dies findet durch die Regulation der Funktion und Lokalisation von RAD51 (ein wichtiger Katalysator in der homologen Rekombination) statt [113, 114]. Ein anderer Schlüsselpartner von BRCA2 in der homologen Rekombination ist PALB2. PALB2 reguliert die intranukleäre Lokalisation von BRCA2 und bildet zusammen mit BRCA1 und BRCA2 einen Kernkomplex für die homologe Rekombination [114].

### **4. Das BAP1- Protein**

Das BRCA1-assoziierte Protein-1 (BAP1) ist eine Carboxy-terminale Hydrolase aus der Familie der deubiquitinierenden Enzyme (DUBs), die im Zellkern zu finden ist. Das Protein bindet an die Wildtyp BRCA1-RING-Finger- Domäne und verstärkt so ihre Tumorsuppressor- Eigenschaften. BAP1 kann jedoch nicht an den mutierten RING- Finger von BRCA1 binden [115].

Zudem interagiert BAP1 mit BARD1 und mit dem BRCA1/BARD1- Heterodimer. Dies weist auf eine Kooperation im Prozess der Ubiquitinierung als Teil des DNA-Reparatur-Prozesses und des Zellzyklus hin. BAP1 spielt auch eine

entscheidende Rolle in der Funktion des BRCA1/BARD1-Komplexes in der S-Phase des Zellzyklus [116]. Die BAP1-Hemmung führt zu einer S-Phasen-Retardierung. Diese bewirkt, dass die Zelle spontane DNA-Schädigungen, die in dieser Phase passieren, nicht mehr reparieren kann. Zusätzlich entwickelt die Zelle eine Hypersensitivität gegen ionisierende Strahlung [117].

Die exakte Funktion von BAP1 im BRCA1/BARD1- Heterodimer bleibt jedoch unklar, da es gleichzeitig die Ligase-Aktivität des Heterodimers durch Trennung des BRCA1/BARD1- Komplexes hemmt [117].

Die duale Rolle von BAP1 als Tumorsuppressor und Onkogen wurde in der letzten Zeit bei unterschiedlichen Karzinomen nachgewiesen. Beispielsweise ist im Mesotheliom, einigen melanozytischen Tumoren, beim Nierenzellkarzinom, und auch Lungenkarzinom das BAP1- Gen mutiert, was die Tumorsuppressor-Funktion von BAP1 bestätigt. Bei Mammakarzinomen ist dies jedoch nur selten der Fall [118-120]. Es gibt aber erste Hinweise, dass durch Deubiquitinierung und Stabilisierung des Transkriptionsfaktor Krüppel-like-Faktor-5-Protein (KLF5), BAP1 selbst die Karzinogenese in der Brust und die Metastasierung stimuliert [121].

Es gibt wenige Studien, die die Funktion von BAP1 als Onkogen beim Mammakarzinom untersuchen. Es existieren allerdings ausschließlich Daten zu sporadischen Mammakarzinomen. Die einzigen Studien zu hereditären Formen beziehen sich auf die Funktion im Sinne der Tumorsuppression [120, 122]. Sie ziehen jedoch nicht die Möglichkeit einer Tumorproliferation- induzierenden Funktion von BAP1 im Sinne einer onkogenen Funktion beim hereditären Mammakarzinom in Betracht.



## 5. Zielsetzung

Die neuesten wissenschaftlichen Entwicklungen geben Hinweise, dass BAP1 nicht nur als Tumorsuppressor, sondern auch als Onkogen wirken könnte und so die Karzinogenese in der Brust fördern könnte.

Zurzeit gibt es sehr wenige wissenschaftliche Arbeiten, die diese BAP1-Onkogen-Theorie untersuchen; noch weniger gibt es Arbeiten, die dessen onkogene Wirkung beim hereditären Mammakarzinom betrachten.

In dieser Arbeit untersuchten wir die BAP1-Expression im Zellkern und Zytoplasma an Mammakarzinomgewebe von Patientinnen mit erhöhtem familiärem Risiko. Es wurden zwei Gruppen unterschieden: Tumore von Patientinnen mit getesteter BRCA1/2-Mutation versus solche von Patientinnen, die für eine BRCA1/2-Mutation negativ getestet wurden.

Unsere Hypothese ist, dass eine Korrelation zwischen Expressionsgrad und subzellulärer Lokalisation von BAP1 und der Schwere der Mammakarzinomerkrankung besteht.

Diese wurde untersucht durch Korrelierung des BAP1-Expressionsgrads mit verschiedenen klinischen Parametern wie Tumorgroße (T-Stadium), Lymphknotenbefall (N-Stadium), Rezeptorstatur (Östrogen,- und Progesteronrezeptor), HER2-Status, sowie Gesamtüberleben.

## **II. Material und Methoden**

### **1. Patientenkollektiv**

Wir untersuchten Mammakarzinomgewebe von 90 Patientinnen mit erhöhtem Risiko für hereditären Brustkrebs. Die Patientinnen wurden entweder am Zentrum für Familiären Brust- und Eierstockkrebs des Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München/ Poliklinik der LMU oder dem Universitätsklinikum Ulm zwischen 1990 und 2003 beraten und/oder therapiert.

Das getestete Gewebe wurde routinemäßig für histopathologische Untersuchung im Rahmen von Biopsien oder Operationen gewonnen. Alle medizinisch relevanten diagnostischen Untersuchungen wurden vor Beginn unserer Studie abgeschlossen. Der histologische Typ, Tumor-Grad (gemäß der TNM-Klassifikationssystem), Hormonrezeptorstatus ([ER] und [PR]) und HER2-Status wurden von den Instituten für Pathologie der LMU München und der Universität Ulm bestimmt.

Die Follow-up- und klinischen Daten (inklusive Langzeitüberleben) der Kohorte wurden mittels Patientenakten, dem Tumorregister München und persönlichen Telefonkontakten gewonnen. Um die Überlebenszeit zu definieren wurde die Zeit zwischen Erstdiagnose des Mammakarzinoms und entweder Tod oder letzter aktueller Follow-up-Kontakt mit der Patientin genutzt. Aufgrund des langen Follow-ups konnten nicht alle Patientinnen mehr erreicht werden (lost to follow-up).

Dadurch, dass die Therapie/Beratung der Patientinnen zwischen 1990 und 2003 erfolgte, verfügten wir in manchen Fällen nicht über alle klinischen Parameter (z.B. 1990-2000 wurde in Deutschland kein HER2-Status bestimmt), was die zum Teil kleine Fallzahl in den Subanalysen erklärt.

Eine schriftliche Einverständniserklärung war von jeder Patientin vor Studienbeginn vorhanden.

## **2. Immunhistochemie**

Die Immunhistochemie (IHC) dient der spezifischen Erkennung und Darstellung von Antigenen im Gewebe. Die Gewebepräparate werden gegen Antikörper exponiert, die bestimmte Ansatzpunkte (Epitope) im Gewebe detektieren und binden. Das Epitop wird mikroskopisch sichtbar gemacht mittels eines Markers, der an dem Antikörper sitzt [123].

Die immunhistochemische Färbung der Proben für diese Studie erfolgte im Forschungslabor der Frauenklinik der LMU, Campus Innenstadt und gemäß deren Standards.

### **2.1. Fixation, Einbettung und Schneiden am Mikrotom**

Die Fixation des Gewebes in Formalin wurde sofort nach Gewebeentnahme durchgeführt, um eine Autolyse zu verhindern. Dafür wurde 4%iges neutralgepuffertes Formalin (eine wässrige Lösung des Formaldehyds) verwendet. Die Formalinmoleküle binden 1:1 an Proteinmoleküle, bilden damit Protein-Aldehydvernetzungen und verhindern so die Proteindenaturierung im Gewebe. Die Fixationszeit hängt von der Gewebegröße ab und kann von 24 bis 48 Stunden dauern. Danach wurde das Formalin mit Leitungswasser abgewaschen, um die Gewebeproben für die nachfolgende Einbettung vorzubereiten.

Zur Einbettung des Gewebes wurde Paraffin benutzt. Paraffin lagert sich überall ab, wo sich im Gewebe Wasser befindet. Das Paraffin verfestigt sich im Verlauf.

Um die Proben zu entwässern, wurden Ethanole (70%iges und mehrere absoluten Ethanole) verwendet. Xylol dient als Intermedium um letzte Ethanolreste abzuwaschen. Danach wurde die Gewebeprobe aus der Kapsel entnommen und mit auf 60°C erhitztem flüssigen Paraffin begossen, das ins Gewebe eindringt. So entstand ein Gewebeblock, der anschließend im Eisfach gekühlt wurde.

Die Zuschneidung der Gewebeschnitte aus dem Block erfolgte mittels Schlittenmikrotom. Es wurden 2-3 µm dicke Schnitte hergestellt und auf einen

„Superfrost Plus“-Objektträger aufgezogen. Zusätzlich wurden die Schnitte über Nacht im Brutschrank bei 56-58°C getrocknet.

## **2.2. Immunhistochemische Vorbereitung, Detektion durch ZytoChem-Plus HRP Polymer-Methode, DAB-Färbung, Gegenfärbung, Dehydrierung und Eindecken, Positivkontrolle**

Zu Beginn erfolgte die Entparaffinierung des Gewebes mit Xylol. Das Xylol wird mittels Ethanol in absteigender Konzentrationsreihe entfernt. Zunächst wurde 100% Ethanol verwendet. Um die sich im Gewebe befindlichen endogenen Peroxidasen zu inaktivieren und damit falsch positive Reaktionen zu verhindern, wurde eine 3%ige Wasserstoffperoxid-Methanol-Lösung („Peroxid-Block“) benutzt. Darauf erfolgte erneutes Abgießen mit 100%es Ethanol, gefolgt von 70%igem und 50%igem Ethanol. Zum Abschluss wurden die Ethanolreste mit destilliertem Wasser eliminiert.

Durch Gewebefixierung mit Formalin entstehen Protein-Aldehydvernetzungen, die bestimmte Epitope maskieren können. Durch eine Antigendemaskierung können diese Epitope wieder für die Antikörper erkennbar gemacht werden. Diese Demaskierung erfolgte durch Erhitzen der Proben in einer Citratpufferlösung.

Die immunhistochemische Färbung wurde in einer feuchten Kammer ausgeführt, um ein Austrocknen der Proben zu verhindern. Zunächst wurden unspezifische Bindungen des Primär-Antikörpers blockiert. Spezifische Blockiermedien („Blocking Solutions“) verhindern durch Absättigung elektronischer Ladungen im Gewebe, dass sich Antikörper durch hydrophobe Bindung unspezifisch an Membranen oder Fettgewebe binden.

Der Primärantikörper in unserer Studie war ein Anti-BAP1 monoklonaler Maus-IgG1, hergestellt durch die Firma LSBio. Die Inkubation der Schnitte mit den Anti-BAP1-Antikörpern erfolgte 16 Stunden über Nacht bei 4°C.

Um die an den BAP1-Proteinen gebundenen Antikörper im Gewebe zu detektieren, wurde die ZytoChem-Plus-HRP-Polymer-Methode benutzt. Nach Abwaschen mit Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) wurde ein Verstärkungsreagenz („Post Block“) aufgetragen. Danach erfolgte ein erneutes Abwaschen mit PBS und das Auftragen des HRP-Polymers. Nach Entfernung des überschüssigen HRP-Polymers wurde die Chromogenlösung (3,3 Diaminobenzidin) eingegeben. Durch eine enzymatische Reaktion mit dem Katalysator (Peroxidase) entsteht am Ort der Bindung des Primärantikörpers zum Substrat ein braunes Farbprodukt, welches im Lichtmikroskop sichtbar gemacht werden konnte.

Zur Gegenfärbung der Präparate wurde saures Hämalaun nach Mayer benutzt, ein basischer Farbstoff in saurer Lösung (pH 4,5). Die positiv-geladenen basischen Farbstoffe lagern sich an die negativ- geladene DNA-Phosphatgruppe im Kern an und färben sie intensiv blau. Das Zytoplasma wird zartblau gefärbt.

Die Präparate wurden in Leitungswasser in alkalischem Milieu ausgewaschen.

Als nächstes erfolgte die Dehydrierung der Proben in aufsteigender Alkoholreihe mit 70%igem, 96%igem und absolutem Ethanol. Die Aufhellung erfolgte mit Xylol.

Zum luftdichten Verschließen wurde „Eukitt“ benutzt, was den gleichen Brechungsindex wie Glas besitzt und so die Färbung nicht beeinflusst.

Als Positivkontrollen dienten Nieren- und Tonsillengewebe.

*Für das genaue Färbungsprotokoll vgl. Anhang.*

### **3. Immune Reactive Score (IRS)**

Die Proben wurden mittels eines Leitz Photomikroskops (Wetzlar, Deutschland) untersucht. Die immunhistochemische Analyse wurde mittels Bewertung der Intensität- und Verteilungsmuster der BAP1-positiven Zellen durchgeführt. Um dies zu quantifizieren, wurde der bereits bestehende semi-quantitative Immune Reactive Score (IRS) benutzt. Der IRS vergibt ein Minimum von 0 und ein Maximum von 12 Punkten.

Die Werte für den Score ergeben sich nach Auswertung und Zählung der gefärbten Zellen multipliziert mit dem Anteil positiver Zellen (Färbeintensität 0= negativ, 1= schwach, 2= mäßig, 3= stark; positive Zellen: 0= 0%, 1= 1-10%, 2= 11-50%, 3 = 51-80%, 4= >80%). In unserer Studie betrachteten wir einen IRS von 0-1 als „negativ“ und über 2 als „positiv“, wobei 2-4 als „moderate“ und 6-12 als „hohe“ Expression bezeichnet wurde.

Die BAP1-Expression in jeder Zelle wurde jeweils separat im Zytoplasma und im Kern untersucht und mittels IRS ausgewertet.

#### **4. Statistische Auswertung**

Die Daten wurden mittels SPSS 25 (PASW Statistic, SPSS Inc., IBM, IL, USA) analysiert. Eine Vergleichsanalyse der BAP1-Expression in BRCA1/2-mutierten versus BRCA1/2-nicht-mutierten Proben in den unterschiedlichen klinischen und pathologischen Subgruppen wurde mittels des nonparametrischen Kruskal-Wallis-Tests und des Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt. Die Überlebensanalyse wurde mit einer Kaplan-Meier-Kurve und dem Logrank-Test durchgeführt. Die ROC-Kurve wurde benutzt, um die genauesten Cut-Off-Werte zu identifizieren.

P-Werte  $\leq 0.05$  wurden als statistisch signifikant bezeichnet.

Die Tabellen und Diagrammen wurden mit Hilfe von SPSS25, Microsoft PowerPoint und Microsoft Word erstellt.

### **III. Ergebnisse**

#### **1. Die nukleäre BAP1- Expression in Tumorzellen von BRCA-Mutationsträgerinnen korreliert positiv mit dem T- Status**

Wir korrelierten die Expressionsrate von BAP1 in den Zellkernen von Mammakarzinomgewebe bei BRCA-Mutationsträgerinnen zum T-Status (pT1, pT2, pT3, pT4) der Tumore in 36 Proben.

In unseren Ergebnissen konnten wir eine starke positive Korrelation zwischen der BAP1- Expression im Tumorzellkern und dem T-Status in der Gruppe der BRCA-Mutationsträgerinnen beobachten ( $p=0.005$ ).

Je höher der T-Status, desto höher war die BAP1- Expression. Aus allen getesteten Proben waren 26 (73%) negativ für BAP1 (IRS zwischen 0 und 1), 10 (27%) waren positiv (IRS 2-12). Tumore im Stadium pT1 ( $n=21$ ) zeigten eine negative bis schwache Expression für BAP1 (IRS 0-2), während Tumore im Stadium pT2 oder höher ( $n=15$ ) eine höhere nukleäre BAP1- Expression (IRS>2) aufwiesen.

## BRCA1/2 positive

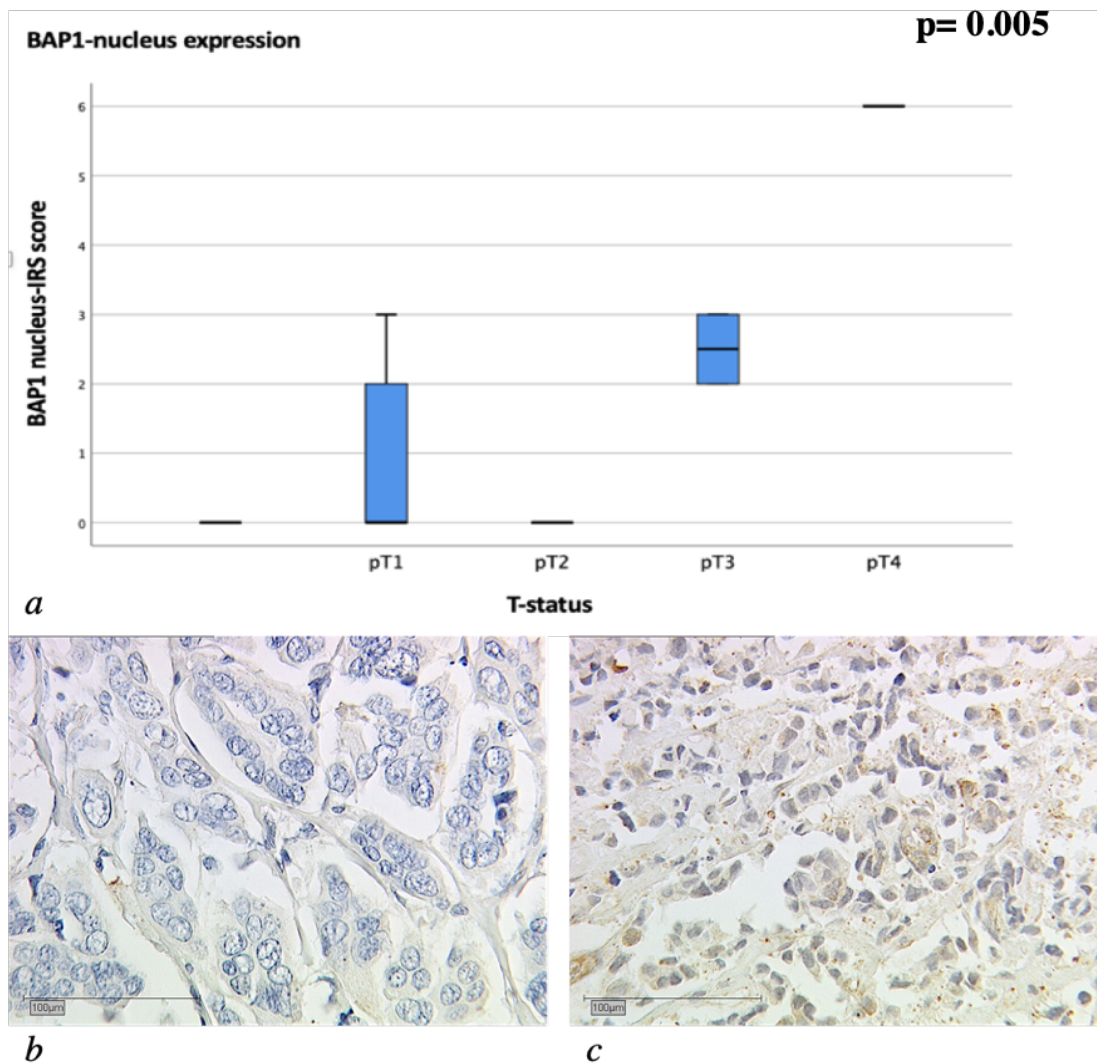


Abbildung 1: (a): positive Korrelation zwischen T-Status und BAP1-Expression im Kern von BRCA1/2-Mutation-positiven Tumoren; (b): negative BAP1-Expression im Kern (IRS 0), Mutation: BRCA1, pT1 (25-fache Vergrößerung); (c): positive BAP1- Expression im Kern (IRS 2), Mutation: BRCA2, pT3 (25-fache Vergrößerung)

Die gleiche Analyse wurde auch mit den BRCA-negativen Proben durchgeführt. Es gab keine Unterschiede in der Expression von BRCA-negativen und BRCA-positiven Patientinnen ( $p=0.551$ ).



## **2. Die BAP1- Expression im Zytoplasma in Tumorzellen von BRCA-negativen Patientinnen korreliert mit dem T-Status**

Wir beobachteten eine signifikante Korrelation zwischen der zytoplasmatischen BAP1-Expression und dem T-Status der Tumore von BRCA-negativen Patientinnen (n=47). Die Mehrheit der Tumore exprimierten BAP1 moderat (IRS zwischen 2-4). Die pT2-Tumoren (n=9) zeigten jedoch eine leicht erhöhte und statistisch signifikante BAP1-Konzentration im Zytoplasma (IRS-Median=4) (p=0.016). Im Vergleich dazu wiesen die pT1- Tumore (n=32) ein Median IRS von 3 auf. Zudem gab es mehr pT1-Tumore mit einer negativen Expression (n=7; 21,8%) als pT2-4- Tumore (n=2, 13%). Tumore mit höherem T- Status (pT3 (n=2) und pT4 (n=4)) zeigten die niedrigste BAP1- Konzentration mit einem IRS-Median von 2,5.

Die BAP1- Expression im Zytoplasma von BRCA- positiven Tumorzellen wies keine statistisch signifikante Korrelation zum T- Status auf (p=0.506).

## BRCA1/2 wild-type

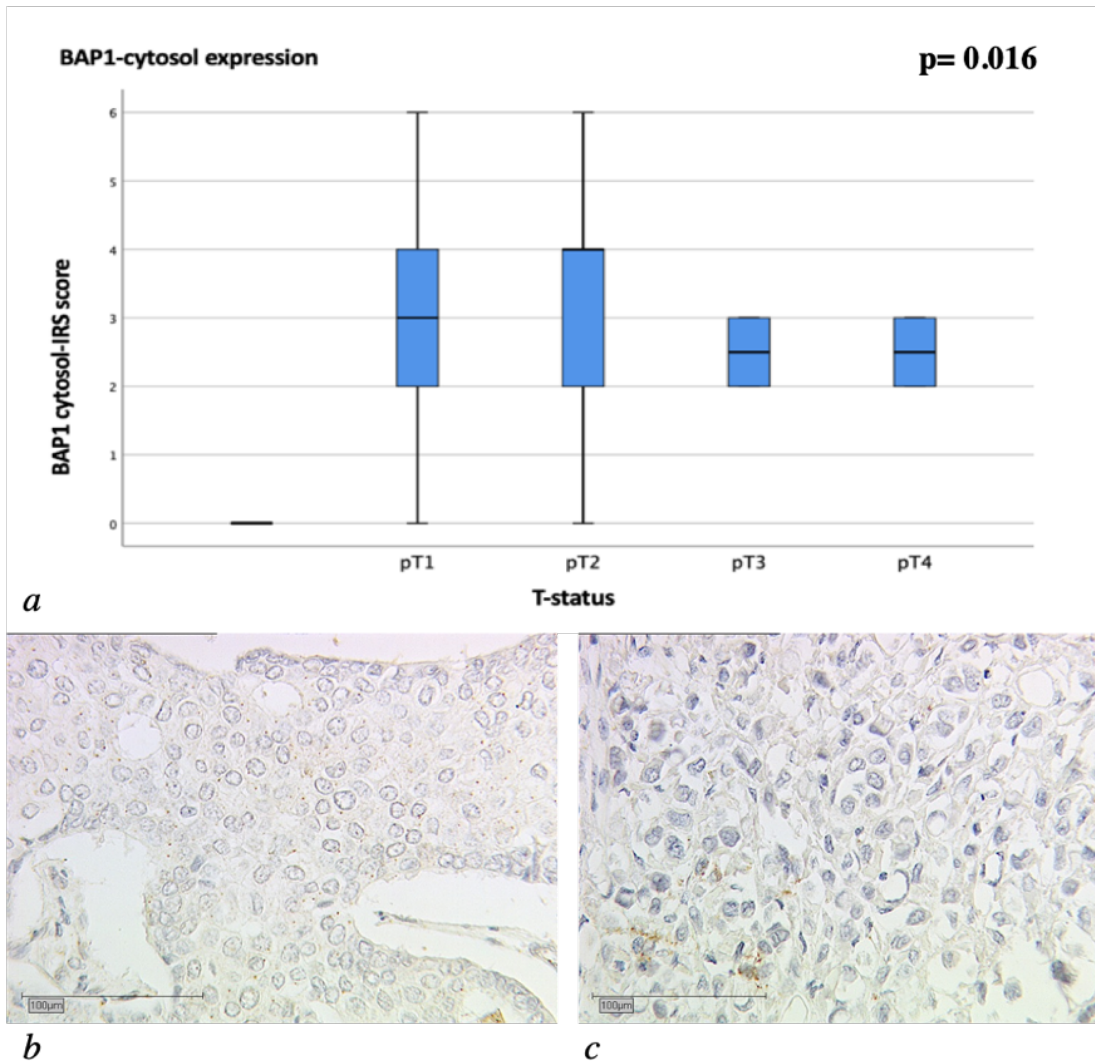


Abbildung 2: (a): Korrelation zwischen T-Status und BAP1-Expression im Zytoplasma in BRCA1/2-negativen Tumoren; (b): BAP1-Zytoplasma-Expression (IRS 4), BRCA1/2 negativ, pT2 (25-fache Vergrößerung); (c): BAP1-Zytoplasma-Expression (IRS 3), BRCA1/2 negativ, pT4 (25-fache Vergrößerung)

### 3. Die nukleäre BAP1- Expression in BRCA-Mutation-positiven Patientinnen korreliert negativ mit dem Langzeitüberleben der Patientinnen

Um den Einfluss der nukleären BAP1- Expression in BRCA- Mutation-positiven Tumorzellen auf das Langzeitüberleben zu evaluieren, führten wir eine Überlebensanalyse mittels Logrank-Test und Kaplan-Meier-Kurve durch.

Langzeitüberleben war definiert als 10-Jahres- Überleben (in Monaten) nach Erstdiagnose des Mammakarzinoms. Um eine genauere Beurteilung der Daten zu erhalten, stratifizierten wir die Proben mittels einer ROC- Kurvenanalyse. Dazu teilten wir die Proben (n=28) in zwei Gruppen ein, BAP1-IRS größer oder kleiner 0.5. Proben mit IRS < 0.5 wurden als negativ und Proben mit IRS > 0.5 wurden als positiv für BAP1 bezeichnet.

Wir konnten eine negative Korrelation zwischen der nukleären BAP1-Expression und dem Langzeitüberleben sowohl im Logrank Test als auch in der Kaplan-Meier-Überlebenskurve nachweisen. Die Proben der Patientinnen mit einer positiven BAP1- Expression im Zellkern (IRS > 0.5) zeigten insgesamt ein schlechteres Überleben mit einer durchschnittlichen Überlebenszeit von 169,71 Monaten. Wohingegen die Proben von Patientinnen mit der negativen BAP1-Expression (IRS < 0,5; n=20) eine bessere Langzeitüberlebensprognose im Logrank Test ( $p=0.004$ ) mit einer durchschnittlichen Überlebenszeit von 233,33 Monaten aufwiesen (s. *Abbildung 3a*).

Weder in der Kaplan-Meier-Kurve noch im Logrank-Test, konnte eine signifikante Korrelation in den BRCA-negativen Proben zwischen der nukleären BAP1-Expression und dem Langzeitüberlebens nachgewiesen werden ( $p=0.937$ ) (s. *Abbildung 3b*).

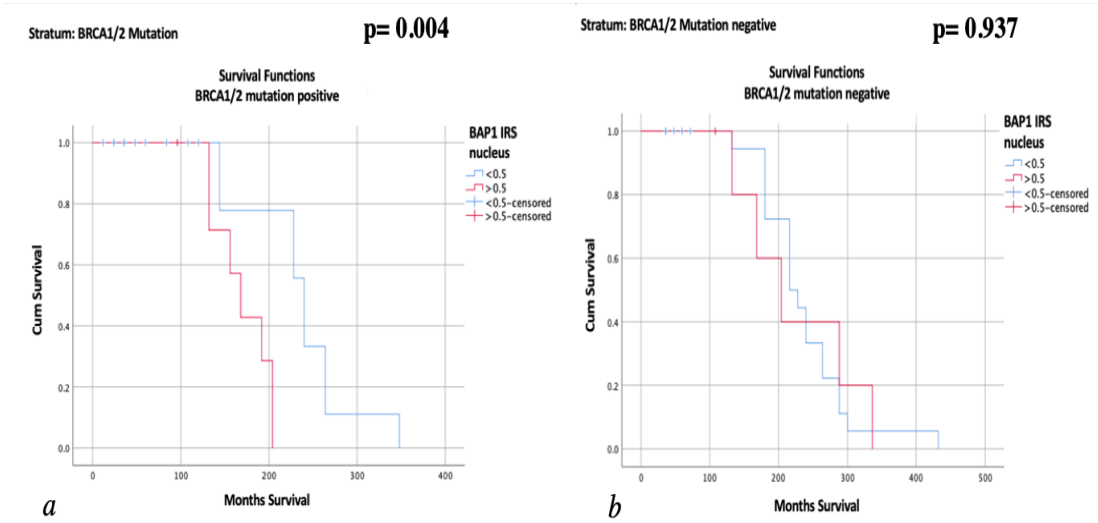


Abbildung 3: Kaplan-Meier-Überlebenskurven; (a): signifikant besseres Überleben bei Patientinnen mit einer negativen BAP1-Kern-Expression (IRS<0.5) verglichen mit Patientinnen mit einer positiven BAP1-Kern-Expression (IRS>0.5) in der Gruppe der BRCA1/2-positiven Fälle; (b): kein signifikanter Unterschied im Langzeitüberleben zwischen Patientinnen mit einer negativen BAP1-Kern Expression (IRS<0.5) und Patientinnen mit einer positiven BAP1-Kern-Expression (IRS>0.5) in den BRCA1/2-negativen Fällen

#### 4. Die BAP1- Expression im Zytoplasma in Tumorzellen von BRCA-Mutation- negativen Patientinnen korreliert negativ mit dem Langzeitüberleben

Zur Durchführung einer Überlebensanalyse der BRCA1/2-Mutation-negativen Patientinnen mittels ROC – Kurve, teilten wir die Proben nach deren BAP1-Expression im Zytoplasma ein. Wir analysierten alle Proben mithilfe des Logrank-Tests und der Kaplan-Meier-Überlebenskurve.

Zuerst teilten wir die BRCA-negativen Proben in zwei Gruppen ein: Die eine mit einem BAP1 IRS kleiner 0,5 (n=6) (= BAP1 negativ); die andere mit einem BAP1 IRS größer 0,5 (n=24) (= BAP1 positiv).

Trotz der Tatsache, dass im Logrank-Test keine signifikante Korrelation zwischen der BAP1- Expression im Zytoplasma und dem Langzeitüberleben bewiesen werden konnte ( $p=0,128$ ), zeigte die Kaplan-Meier-Kurve eine sichtbare Differenz in den Überlebenskurven beider Gruppen. Patientinnen mit Tumoren mit negativer BAP1-Expression im Zytoplasma (IRS<0,5) hatten eine durchschnittliche Überlebenszeit von 294,00 Monaten, während Patientinnen mit

Tumoren mit positiver BAP1-Expression im Zytoplasma ( $IRS > 0,5$ ) nur eine durchschnittliche Überlebenszeit von 221,68 Monaten hatten (s. *Abbildung 4a*).

Diese Tendenz konnte in dem zweiten Teil unserer Analyse in Proben mit insgesamt höherer BAP1- Expression ebenfalls bestätigt werden. Dafür teilten wir die Proben in Gruppen mit BAP1-Zytoplasma-Expression größer ( $n=3$ ) und kleiner ( $n=27$ ) einem IRS von 7 ein. Der Logrank-Test zeigte eine signifikante negative Korrelation zwischen der BAP1- Expression im Zytoplasma und dem Langzeitüberleben ( $p=0,039$ ). Diese wurde auch graphisch durch die Kaplan-Meier-Kurve verdeutlicht. Je höher die BAP1-Zytoplasma-Expression in den BRCA-negativen Tumoren, desto kürzer war das Langzeitüberleben. Patientinnen mit Karzinomen mit einem  $IRS < 7$  überlebten länger (durchschnittliche Überlebenszeit von 243,00 Monaten) als Patienten mit Malignomen mit einem  $IRS > 7$  (durchschnittliche Überlebenszeit von 176,00 Monaten) (s. *Abbildung 4c*).

Unsere Ergebnisse konnten keine signifikante Korrelation zwischen der BAP1-Zytoplasma-Expression und dem Langzeitüberleben bei BRCA-Mutation-positiven Patientinnen beweisen. Weder der Logrank-Test noch die Kaplan-Meier-Kurve zeigten eine signifikant positive oder negative Korrelation bei den getesteten Gruppen ( $p=0,728$  für  $BAP1\ IRS > / < 0,5$ ;  $p=0,118$  für  $BAP1\ IRS > / < 7$ ) (s. *Abbildung 4b und d*).

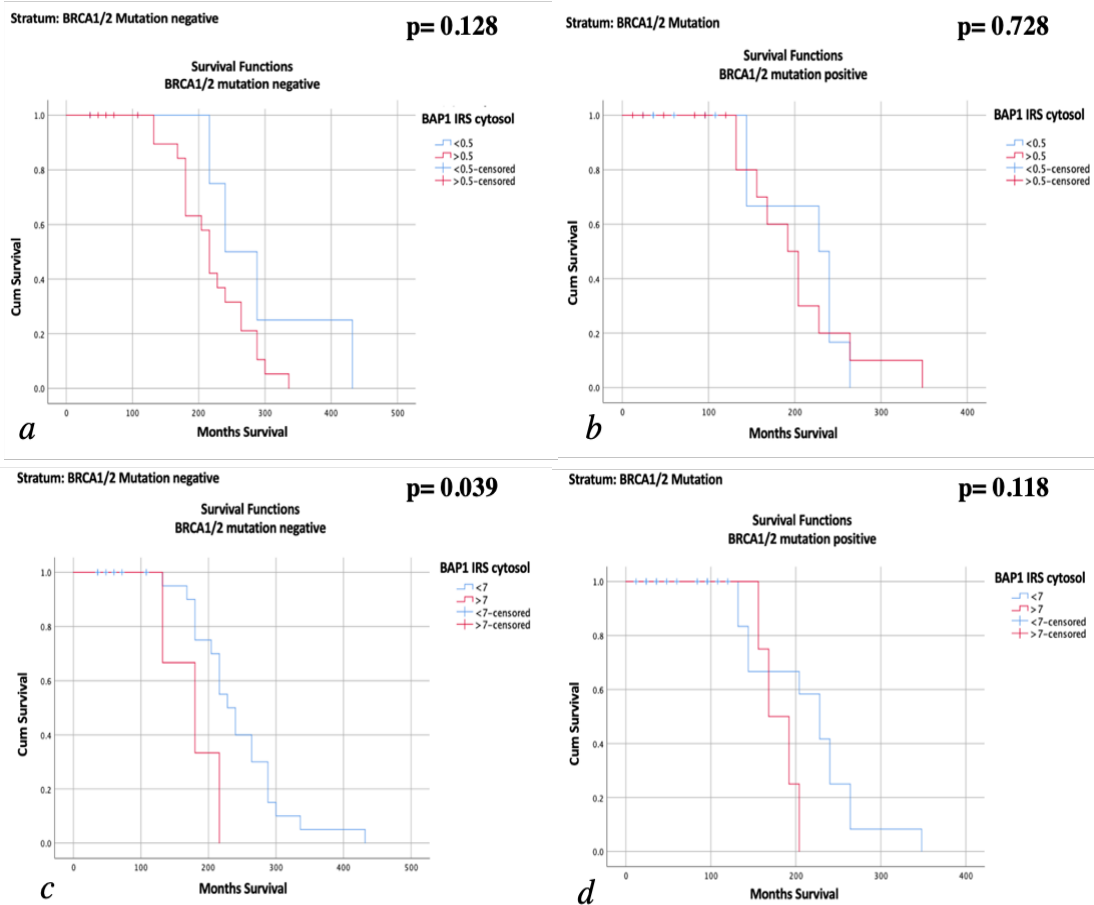


Abbildung 4: Kaplan-Meier-Überlebenskurven; (a): BRCA1/2 Mutation-negativ: trotz des negativen Logrank-Tests zeigt sich ein signifikant besseres Überleben bei Fällen mit einer negativen BAP1-Expression im Zytoplasma ( $IRS < 0.5$ ) verglichen mit Fällen mit einer positiven BAP1-Expression im Zytoplasma ( $IRS > 0.5$ ); (b): BRCA1/2 Mutation- positiv: kein signifikanter Unterschied im Langzeitüberleben bei Fällen mit negativer BAP1-Expression im Zytoplasma ( $IRS < 0.5$ ) und Fällen mit positiver BAP1-Expression im Zytoplasma ( $IRS > 0.5$ ); (c): BRCA1/2 Mutation-negativ: signifikant besseres Überleben bei Fällen mit einer niedrigen BAP- Expression in Zytoplasma ( $IRS < 7$ ) verglichen mit Fällen mit einer hohen BAP1-Expression im Zytoplasma ( $IRS > 7$ ); (d): BRCA1/Zytoplasma Mutation-positiv: kein Unterschied im Langzeitüberleben zwischen Fällen mit einer niedrigen BAP1- Expression im Zytoplasma ( $IRS < 7$ ) und einer hohen -Expression im Zytoplasma ( $IRS > 7$ )

## 5. Andere Parameter

Zum Schluss wurde die Korrelation zwischen klinisch-pathologischen Parameter wie Nodalstatus (N), Hormonrezeptorstatus (ER und PR), HER2-Status, histologischer Typ (invasiv-duktales und invasiv-lobuläres Karzinom), Fernmetastasen (M), Lokalrezidiv-Status (R) und Grading (G) und der BAP1-Expression untersucht. Bei den N-, ER-, PR- und HER2-Status konnten wir zwar in einzelnen Fällen signifikante Ergebnisse nachweisen, jedoch ohne

zielführende klinische Korrelation. Bei den anderen Parametern konnten wir keine signifikante Korrelation mit der BAP1-Expression weder bei BRCA-Mutation-positiven noch bei BRCA-Mutation-negativen Patientinnen nachweisen.

Tabelle 1: Zusammenfassung aller untersuchten klinischen Merkmale und deren Korrelation zur BAP1-Expression im Kern/Zytoplasma bei BRCA-Mutationsträgerinnen und BRCA-Non-Carriers

Klinisches Merkmal	BRCA1/2 mutiert		BRCA1/2 nicht mutiert	
	BAP1 im Kern	BAP1 im Zytoplasma	BAP1 im Kern	BAP1 im Zytoplasma
pT	<b>p=0.005</b>	n.s.	n.s.	<b>p=0.016</b>
pN	n.s.	n.s.	n.s.	<b>p=0.036</b>
M	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
R	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
G	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
ER	n.s.	n.s.	n.s.	<b>p=0.045</b>
PR	n.s.	<b>p=0.006</b>	n.s.	n.s.
HER2	n.s.	n.s.	n.s.	<b>p=0.007</b>
histologischer Subtyp	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

*n.s.= nicht signifikant*

## **IV. Diskussion**

### **1. Diskussion Ergebnisse**

In der hier vorgestellten Arbeit wurde die Korrelation zwischen der BAP1-Expression in zwei unterschiedlichen zellulären Kompartimenten - Kern und Zytoplasma - und den klinisch relevanten prognostischen Parametern bei familiärem Mammakarzinom untersucht.

Wir konnten eine positive Korrelation zwischen der BAP1- Expression im Zellkern und der Tumorgöße bei BRCA-positiven (also mit Nachweis einer pathogenen Variante in BRCA1 oder 2) Patientinnen nachweisen.

Neben diesen Ergebnissen zeigte sich eine ebenfalls positive Korrelation im Zytoplasma von eher kleinen Karzinomen (pT1 und pT2) und Patientinnen ohne eine pathogene Variante in BRCA1 oder 2.

Bezüglich des Langzeitüberlebens wurde mit der Analyse der nukleären Expression von BAP1 bei BRCA-Mutation-positiven Proben eine negative Korrelation mit der BAP1- Expression gefunden. Patientinnen mit einer negativen BAP1-Kern-Expression überleben länger als diejenigen mit einer positiven BAP1-Kern-Expression und haben auch kleinere Karzinome, was mit den Daten aus der Literatur übereinstimmt, die kleinere Tumoren mit einer günstigeren Prognose assoziieren [124].

Auf der anderen Seite ist es zu erwarten bei Patientinnen mit BRCA-Mutation und einer hohen BAP1-Kernexpression, dass deren Tumore größer sind und mit einem schlechteren Überleben assoziiert sind.

Die BAP1-Zytoplasma-Expression bei BRCA-negativen-Proben korreliert negativ mit dem Langzeitüberleben. Patientinnen mit Tumoren ohne eine BAP1-Expression im Zytoplasma tendieren länger zu überleben als solche mit positiver BAP1-Expression.

Zusammenfassend weisen unsere Ergebnisse darauf hin, dass dem Transit von BAP1 zwischen Zytoplasma und Zellkern eine entscheidende Bedeutung zukommen könnte.



## **2. BAP1- Protein und deren subzelluläre Lokalisation**

BAP1 ist ein Deubiquitinierungsenzym, das im Zellkern lokalisiert ist [115]. In Verbindung mit multiplen anderen Proteinen formiert BAP1 Komplexe, die an der Zellzyklusregulation beteiligt sind. Unter anderem schließt sich BAP1 mit BRCA1 in die DNA-Doppelstrangreparatur zusammen und funktioniert als Tumorsuppressor. Eine Schlüsselvoraussetzung für diese Funktion als Tumorsuppressor ist die Lokalisation von BAP1 im Kern [125]. Somatische oder Keimbahnmutationen in BAP1 mit Verlust der Kernlokalisation sind bekannt dafür, dass sie das Risiko für die Entwicklung von Neoplasien erhöhen. Einige Beispiele dafür sind das Melanom (kutan, uveal, orales mukosales Melanom), das Mesotheliom, die Spitz-Nävi und das klarzellige Nierenkarzinom [126-129]. Ein BAP1-Übergang von Zellkern zu Zytoplasma konnte in einigen wissenschaftlichen Untersuchungen mithilfe von Immunhistochemie bei unterschiedlichen Tumoren beobachtet werden [130]. N. Farquhar *et al.* beschreiben ein unterschiedliches Muster der zytoplasmatischen BAP1-Expression in Uvealmelanomzellen abhängig davon, ob BAP1 mutiert ist oder nicht [127]. Gleichzeitig beweisen Hakiri *et al.*, dass im malignen Mesotheliom das mutierte BAP1 primär im Zytoplasma lokalisiert ist, wobei BAP1-Wildtyp im Zellkern zu finden ist. Zudem beschreiben sie, dass die Phosphorylierung des mutierten BAP1 die Sekretion von BAP1 aus dem Zellkern ins Zytoplasma induziert [131].

## **3. Interaktion zwischen BAP1 und BRCA1/2 auf subzellulärer Ebene**

Weiter beschreiben Hakiri *et al.* etwas genauer die subzelluläre Interaktion zwischen BAP1 und BRCA1. BAP1 scheint BRCA1 zu stabilisieren, dafür müssen sich aber beide Proteine im Zellkern befinden.

Hakiri *et al.* zeigen, dass das mutierte BAP1 im Zytoplasma lokalisiert ist, währenddessen das BRCA1-Protein im Zellkern bleibt [131]. Das könnte bedeuten, dass das mutierte, im Zytoplasma-gebundene BAP1 nicht mit dem im Zellkern lokalisierten BRCA1 interagieren kann. Folglich kann das BAP1 BRCA1

nicht stabilisieren, und damit nimmt die Funktion von BRCA1 an dem Doppelstrangreparaturkomplex ab. Durch diese BAP1 Mutation verliert BAP1 seine Tumorsuppressor-Funktion.

Bisher gibt es leider keine weiteren Studien, die untersuchen, ob eine BRCA1/2-Mutation die subzelluläre Lokalisation von BAP1 beeinflusst.

In unserer Arbeit beschreiben wir ein schlechteres Langzeitüberleben von BRCA-Mutation-negativen Patientinnen mit höherer zytoplasmatischer BAP1-Expression. Außerdem beobachteten wir eine höhere BAP1-Expression im Zytoplasma von pT2-Tumoren als von pT1-Tumoren.

Die oben beschriebene vermutete BAP1-Mutation als Grund für die Extraktion von BAP1 ins Zytoplasma könnte die hohe zytoplasmatische BAP1-Expression in Tumoren mit schlechterer Prognose erklären.

Ob diese Translokation tatsächlich aufgrund von einer Mutation in BAP1 entstanden ist, bleibt unbekannt und erfordert weitere Forschung.

Es gibt einige Studien zu BAP1-Mutation in Hochrisiko-, jedoch BRCA-negativen-Brustkrebs-Famillien. Obwohl keine Studie eine pathogene BAP1-Keimmutation identifizieren konnte, konnten sie einige BAP1-Varianten beobachten, die in Mammakarzinomzellen auftreten [120, 122]. Diese zwei erwähnten Studien fokussierten sich auf französische und französisch-kanadische Mammakarzinom-Hochrisikofamillien. Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob eine mögliche BAP1-Mutation für das hereditäre Mammakarzinom wirklich relevant ist, sind mehr Studien mit einem größeren Patientenkollektiv erforderlich.

Wie oben beschrieben, ist eine der zahlreichen Funktionen von BAP1 die Stabilisierung von BRCA1, um damit zu seiner Tumorsuppressorrolle beizutragen. BAP1 bindet jedoch nicht an die Ringfingerdomain des mutierten BRCA1 und kann somit den Proteinkomplex nicht mehr stabilisieren [115, 117]. Dies könnte zur Akkumulation von freiem ungebundenen BAP1 im Zellkern in BRCA-mutierten Zellen führen. In unserer Arbeit zeigten wir, dass eine höhere BAP1-Kernexpression in BRCA- mutierten Zellen mit einer höheren Tumorgroße sowie mit einem schlechteren Langzeitüberleben korreliert. Dies könnte die

Bedeutung von BAP1 als essentiellen Teil des an der Doppelstrangreparatur beteiligten BRCA1- assoziierten Komplex bestätigen. Die Akkumulation von freiem, nicht funktionierendem BAP1 im Kern der BRCA- mutierten Mammakarzinomzellen könnte auf eine schlechtere Karzinomprognose hinweisen.

#### **4. BAP1 als Tumorsuppressor und Onkogen**

Es müssen aber auch die vielseitigen und sogar konträren Funktionen von BAP1 berücksichtigt werden. Außer bei der DNA-Schadensantwort, ist es auch an verschiedenen anderen regulatorischen Prozessen wie Zellkommunikation, Gentranskription und Zellzyklusprogression beteiligt. Wenn diese Prozesse nicht richtig funktionieren besteht ebenfalls das Risiko zur Karzinomentwicklung [132]. Die Mehrheit dieser Funktionen sind BRCA1 unabhängig, was darauf hinweist, dass die BAP1- subzelluläre Lokalisation und Verbindung zur Neoplasieentwicklung multifaktoriell ist. Obwohl es viele Studien über die subzelluläre Lokalisation von mutiertem BAP1 gibt, untersuchen wenige die Lokalisation von BAP1 abhängig vom BRCA-Mutationsstatus. Solche Studien sind jedoch für ein besseres Verständnis der komplizierten Interaktion dieser Proteine und deren klinischen Bedeutung für die unterschiedlichen Patientensubgruppen notwendig.

#### **5. Ausblick: Andere Proteine, die mit dem BRCA1/2 Komplex interagieren**

In deren Funktion als Teil des Proteinkomplexes, der an der DNA-Schadensantwort beteiligt ist, interagieren BRCA1 und BRCA2 mit multiplen Proteinen. Jedes davon präsentiert einen interessanten Forschungspunkt und ein potentiell therapeutisches Ziel. Außer der BAP1- Expression im hereditären Mammakarzinom, ist die zelluläre Expression von anderen Proteinen, die Teil der BRCA1/2-Komplex-Familie sind wie FANCD1, CtIP, BAP1 und HSPC142 [133-135] von besonderem Interesse. Studien zu diesen Proteinen werden hoffentlich

mehr Informationen über die komplexen Interaktionen zwischen den Doppelstrangreparatur-Proteinen, insbesondere im Bezug auf das hereditäre Mammakarzinom, liefern.

## V. Zusammenfassung

Das Mammakarzinom als die häufigste Karzinomerkrankung der Frau erfordert ständig neue Forschungsarbeiten und - Ansätze, um die Diagnostik und Therapie der Krankheit stetig zu verbessern. Ein Teil der Erkrankungen ist hereditär und mit einer Mutation im BRCA1- oder BRCA2- Gen assoziiert.

Das BRCA1- assoziierte Protein 1 (BAP1) hat eine wesentliche Funktion in der Unterstützung der Tumorsuppressor-Funktion von BRCA1. Kürzlich veröffentlichte Studien beschreiben die duale Funktion von BAP1 zwar als Tumorsuppressor, aber auch als Onkogen in der Brustkarzinogenese. Aufgrund der Interaktion zwischen BAP1 und BRCA1 im Rahmen der DNA-Doppelstrangreparatur, wollten wir in unserer Arbeit die Expression und das prognostische Potential von BAP1 bei BRCA-Mutation-positiven- und BRCA-Wild-Typ-Karzinomen eruieren.

Hierfür verwendeten wir Mammakarzinomgewebe von 90 Patientinnen mit erhöhtem Risiko für hereditären Brustkrebs, die an den Universitätskliniken der LMU München und Ulm therapiert wurden. Die BAP1- Expression in den Proben wurde mithilfe immunhistochemischer Spezialfärbungen bestimmt. Die BAP1- Expression wurde separat im Zellkern und Zytoplasma via der semiquantitativen IR-Scores analysiert.

Unsere Daten zeigten eine signifikante Korrelation zwischen der BAP1- Expression und dem T-Status, sowie Langzeitüberleben abhängig von BRCA-Mutation und der zellulären Lokalisation von BAP1.

Diese Ergebnisse deuten u.a. auf eine höhere BAP1-Kern-Expression bei Tumorzellen von BRCA-Mutation-positiven Fällen mit höherem T-Status und schlechterem Langzeitüberleben hin. Gleichzeitig zeigte sich in der Gruppe der BRCA-Non-Carrier ein schlechteres Überleben bei höherer BAP1- Expression im Zytoplasma. Diese Daten deuten zusätzlich auf einer unterschiedlichen subzellulären Lokalisation von BAP1 in BRCA mutierten und nicht mutierten Fällen hin.

Abschließend, auch wenn die exakte Rolle von BAP1 in Bezug auf die Karzinogenese aus der Literatur nicht eindeutig ist, zeigte unsere Studie, dass deren Transit zwischen Zellkern und Zytoplasma eine mögliche Assoziation mit der Prognose von Mammakarzinompatientinnen abhängig von BRCA-Mutationsstatus haben könnte.

Momentan fehlen ausreichende Studien, die sich mit der Thematik der BAP1-Lokalisation in der Mammakarzinomzelle und deren Bezug zur BRCA-Mutation beschäftigen. Dies ist jedoch ein spannendes Forschungsgebiet für zukünftige Projekte.

## VI. Literaturverzeichnis

1. The Global Cancer Observatory, W.H.O., *Breast Fact Sheet*, 20-Breast-Fact-Sheet, Editor. 2019, The Global Cancer Observatory, World Health Organization: <http://today/data/factsheets/cancers/20-Breast-fact-sheet.pdf>.
2. Kraywinkel, K. *Krebsarten*. 2019; Available from: [https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/krebsarten\\_no\\_de.html](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/krebsarten_no_de.html).
3. Robert Koch-Institut, G.d.e.K.i.D.e.V.G. *Krebs in Deutschland 2017/2018*. 2017; 11. Ausgabe:[Available from: [https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs in Deutschland/kid\\_2021/kid\\_2021\\_c50\\_brust.pdf](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2021/kid_2021_c50_brust.pdf)Available from: jsessionid=467A18C2C371B686B7F5435C24ACD5F6.internet101?\_\_blob=publicationFile].
4. ROJAS, K. and A. STUCKEY, *Breast Cancer Epidemiology and Risk Factors*. Clinical Obstetrics and Gynecology, 2016. **59**(4): p. 651-672.
5. Titus-Ernstoff, L., et al., *Menstrual factors in relation to breast cancer risk*. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 1998. **7**(9): p. 783-789.
6. Fraumeni, J.F., Jr., et al., *Cancer mortality among nuns: role of marital status in etiology of neoplastic disease in women*. J Natl Cancer Inst, 1969. **42**(3): p. 455-68.
7. Clavel-Chapelon, F. and M. Gerber, *Reproductive factors and breast cancer risk. Do they differ according to age at diagnosis?* Breast Cancer Res Treat, 2002. **72**(2): p. 107-15.
8. Ma, H., et al., *Reproductive factors and breast cancer risk according to joint estrogen and progesterone receptor status: a meta-analysis of epidemiological studies*. Breast Cancer Res, 2006. **8**(4): p. R43.
9. Cancer, C.G.o.H.F.i.B., *Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies*. Lancet Oncol, 2012. **13**(11): p. 1141-51.
10. Li, L., et al., *Association between oral contraceptive use as a risk factor and triple-negative breast cancer: A systematic review and meta-analysis*. Mol Clin Oncol, 2017. **7**(1): p. 76-80.
11. Reeves, G.K., et al., *Hormonal therapy for menopause and breast-cancer risk by histological type: a cohort study and meta-analysis*. Lancet Oncol, 2006. **7**(11): p. 910-8.
12. Hamajima, N., et al., *Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease*. Br J Cancer, 2002. **87**(11): p. 1234-45.
13. Biglia, N., et al., *Body mass index (BMI) and breast cancer: impact on tumor histopathologic features, cancer subtypes and recurrence rate in pre and postmenopausal women*. Gynecol Endocrinol, 2013. **29**(3): p. 263-7.
14. McTiernan, A., Kooperberg, C. , White, E. , Wilcox, S. , Coates, R. , Adams-Campbell, L. L. , Woods, N. & Ockene, J., *Recreational Physical Activity and the Risk of Breast Cancer in Postmenopausal Women*. JAMA: The Journal of the American Medical Association, 2003. **290**(10): p. 1331-1336.

15. Travis, L.B., et al., *Cumulative absolute breast cancer risk for young women treated for Hodgkin lymphoma*. J Natl Cancer Inst, 2005. **97**(19): p. 1428-37.
16. Apostolou, P. and F. Fostira, *Hereditary breast cancer: the era of new susceptibility genes*. Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 747318.
17. Group, A.B.C.S., *Prevalence and penetrance of BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of breast cancer cases*. Anglian Breast Cancer Study Group. Br J Cancer, 2000. **83**(10): p. 1301-8.
18. Deutsche Krebsgesellschaft, D.G.f.r.S., DeutschesKonsortiumfürErblichenBrust-und Eierstockkrebs, *Checkliste zur Erfassung einer möglichen erblichen Belastung für Brust- und/oder Eierstockkrebs*, C.z.E.e.B.v.P.i.G. Zentren, Editor. 2023.
19. e.V., A.e.V.i.d.D.e.V.s.i.d.D., *Empfehlungen gynäkologische Onkologie Kommission Mamma*, G.u.P. Diagnostik und Therapie früher und fortgeschrittener Mammakarzinome. Brustkrebsrisiko, Editor. 2024: <https://www.ago-online.de/leitlinien-empfehlungen/leitlinien-empfehlungen/kommission-mamma>.
20. A. Meindl, S.G., S. Keim, C. Zeder-Goess, N. Ditsch, A. Quante, *Das hereditäre Mammakarzinom*, in *Manual Mammakarzinome*. 2019, Tumorzentrum München und Zuckschwerdt Verlag: München. p. 159-160.
21. Solbach C., G.R., Eberle C., Scholz C., Lübke M., Muschel K., Kissler S., Siedentopf F., Weißenbacher T., Debus G., Schuhmacher I., Lato K., Sänger N., *Maligne Mammatumoren*, in *Kurzlehrbuch Gynäkologie und Geburtshilfe*. 2015, Georg Thieme Verlag KG.
22. Giuliano, A.E., et al., *Breast Cancer-Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual*. CA Cancer J Clin, 2017. **67**(4): p. 290-303.
23. *The benefits and harms of breast cancer screening: an independent review*. Lancet, 2012. **380**(9855): p. 1778-86.
24. Hellerhoff K., d.W.J.C., Difliff C., Perlet C., *Bildgebende und interventionelle Diagnostik*, in *Manua Mammakarzinome*. 2019, Tumorzentrum Muenchen, Zuckschwerdt Verlag. p. 40-82.
25. Solbach C., G.R., Eberle C., Scholz C., Lübke M., Muschel K., Kissler S., Siedentopf F., Weißenbacher T., Debus G., Schuhmacher I., Lato K., Sänger N., *Brustdrüse (Mamma), Diagnostik*, in *Kurzlehrbuch Gynäkologie und Geburtshilfe*. 2015, Georg Thieme Verlag KV. p. 256-266.
26. Lebeau, A., *[Updated WHO classification of tumors of the breast]*. Pathologe, 2021. **42**(Suppl 2): p. 155-159.
27. Wissenschaftlichen, L.O.d.A.d. and Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF). *Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms*. 2021; Available from: [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/032-045OLI\\_S3\\_Mammakarzinom\\_2021-07.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-045OLI_S3_Mammakarzinom_2021-07.pdf).
28. Cserni, G., et al., *The new TNM-based staging of breast cancer*. Virchows Arch, 2018. **472**(5): p. 697-703.



29. Brierley JD, G.M., Wittekind C (eds) *TNM classification of malignant tumours*. 8. Edition ed. 2017: Union for International Cancer Control (UICC).
30. Regan, M.M., et al., *Re-evaluating adjuvant breast cancer trials: assessing hormone receptor status by immunohistochemical versus extraction assays*. J Natl Cancer Inst, 2006. **98**(21): p. 1571-81.
31. Hammond, M.E., et al., *American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer*. J Clin Oncol, 2010. **28**(16): p. 2784-95.
32. Wolff, A.C., et al., *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update*. J Clin Oncol, 2018. **36**(20): p. 2105-2122.
33. Mitchell, M.S. and M.F. Press, *The role of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization for HER2/neu in assessing the prognosis of breast cancer*. Semin Oncol, 1999. **26**(4 Suppl 12): p. 108-16.
34. Nitz, U.A., et al., *Endocrine Therapy Response and 21-Gene Expression Assay for Therapy Guidance in HR+/HER2- Early Breast Cancer*. J Clin Oncol, 2022. **40**(23): p. 2557-2567.
35. de Azambuja, E., et al., *Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients*. Br J Cancer, 2007. **96**(10): p. 1504-13.
36. Petrelli, F., et al., *Prognostic value of different cut-off levels of Ki-67 in breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 64,196 patients*. Breast Cancer Res Treat, 2015. **153**(3): p. 477-91.
37. Goldhirsch, A., et al., *Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011*. Ann Oncol, 2011. **22**(8): p. 1736-47.
38. Dian D., A.C., Ankel C., Baier B., Bauerfeind I., Ditsch N., Ebner F., Geiger P., Hamann M., Hims I., Höß C., Kern C., Kolben M., Kurz D., Niemeyer-Plattner B., Perabo M., Luczak C., Löhrs B., Schenck T., Schwoere M., von Spiegel F., Weiß E., Wolf C, *Operative Therapie und Rekonstruktionsverfahren bei primärem Mammakarzinom*, in *Manual Mammakarzinome*. 2019, Tumorzentrum München und Zuckschwerdt Verlag, München. p. 189-208.
39. Lanitis, S., et al., *Comparison of skin-sparing mastectomy versus non-skin-sparing mastectomy for breast cancer: a meta-analysis of observational studies*. Ann Surg, 2010. **251**(4): p. 632-9.
40. Galimberti, V., et al., *Axillary dissection versus no axillary dissection in patients with sentinel-node micrometastases (IBCSG 23-01): a phase 3 randomised controlled trial*. Lancet Oncol, 2013. **14**(4): p. 297-305.
41. Hennigs, A., et al., *Which patients with sentinel node-positive breast cancer after breast conservation still receive completion axillary lymph node dissection in routine clinical practice?* Breast Cancer Res Treat, 2019. **173**(2): p. 429-438.
42. Straver, M.E., et al., *Role of axillary clearance after a tumor-positive sentinel node in the administration of adjuvant therapy in early breast cancer*. J Clin Oncol, 2010. **28**(5): p. 731-7.
43. Caudle, A.S., et al., *Improved Axillary Evaluation Following Neoadjuvant Therapy for Patients With Node-Positive Breast Cancer Using Selective Evaluation of Clipped*

- Nodes: Implementation of Targeted Axillary Dissection.* J Clin Oncol, 2016. **34**(10): p. 1072-8.
44. NZGG. *Management of Early Breast Cancer - Evidence-based Best Practice Guideline.* 2009 [cited 2009; Available from: <https://www.health.govt.nz/system/files/documents/publications/mgmt-of-early-breast-cancer-aug09.pdf>].
  45. Cameron, D., et al., *11 years' follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive early breast cancer: final analysis of the HERceptin Adjuvant (HERA) trial.* Lancet, 2017. **389**(10075): p. 1195-1205.
  46. Ettl J., A.-F.V., Harbeck N., König A., Krämer A.K., Michl G., Stötzer G.O., Würstlein R., *Zytostatische Therapie*, in *Manual Mammakarzinome*, d.G.D. Bauerfeind I., Harbeck N., Pigorsch S., Salat C., Editor. 2019, Zuckschwerdt Verlag München GmbH: Munich, Germany. p. 439-442.
  47. Goss, P.E., et al., *A randomized trial of letrozole in postmenopausal women after five years of tamoxifen therapy for early-stage breast cancer.* N Engl J Med, 2003. **349**(19): p. 1793-802.
  48. Pagani, O., et al., *Adjuvant exemestane with ovarian suppression in premenopausal breast cancer.* N Engl J Med, 2014. **371**(2): p. 107-18.
  49. Viale, G., et al., *Which patients benefit most from adjuvant aromatase inhibitors? Results using a composite measure of prognostic risk in the BIG 1-98 randomized trial.* Ann Oncol, 2011. **22**(10): p. 2201-7.
  50. Ettl J., A.-F.V., Harbeck N., König A., Krämer A.K., Michl G., Stötzer G.O., Würstlein R., *Anti-endokrin wirksame Medikamente*, in *Manual Mammakarzinome*, d.G.D. Bauerfeind I., Harbeck N., Pigorsch S., Salat C., Editor. 2019, Zuckschwerdt Verlag München GmbH: München. p. 420-421.
  51. Ettl J., A.-F.V., Harbeck N., König A., Krämer A.K., Michl G., Stötzer G.O., Würstlein R., *Zielgerichtete Kombinationspartner*, in *Manual Mammakarzinome*, d.G.D. Bauerfeind I., Harbeck N., Pigorsch S., Salat C., Editor. 2019, Zuckschwerdt Verlag München GmbH: München. p. 421-425.
  52. al., E.e., *A Review of Cancer Immunotherapy*, in *Current Oncology*. April 2020. p. Supp. 2, 87-97.
  53. O., G., *Zielgerichtete Substanzen in der Therapie des fernmetastasierten tripelnegativen Mammakarzinoms*, in *Colloquium Senologie*, M. Untsch, Harbeck N., Thomssen C., Lüftner D., Editor. 2022, LUKON Verlagsgesellschaft mbH. p. 429-430.
  54. Ettl J., A.-F.V., Harbeck N., König A., Krämer A.K., Michl G., Stötzer G.O., Würstlein R., *PARP-Inhibitoren beim BRCA-positiven metastasierten Mammakarzinom*, in *Manual Mammakarzinome*, d.G.D. Bauerfeind I., Harbeck N., Pigorsch S., Salat C., Editor. 2019, Zuckschwerdt Verlag München GmbH. p. 444-445.
  55. Meindl A., G.S., Keim S., Zeder-Goess C., Ditsch N., Quante A., *PARP-Inhibitoren*, in *Manual Mammakarzinome*, d.G.D. Bauerfeind I., Harbeck N., Pigorsch S., Salat C., Editor. 2019, Zuckschwerdt Verlag München, GmbH. p. 180-181.
  56. Tutt, A.N.J., et al., *Adjuvant Olaparib for Patients with BRCA1- or BRCA2-Mutated Breast Cancer.* N Engl J Med, 2021. **384**(25): p. 2394-2405.
  57. O., G., *PARP-Inhibitoren*, in *Colloquium Senologie*, M. Untsch, Harbeck N., Thomssen C., Lüftner D., Editor. 2022, LUKON Verlagsgesellschaft mbH. p. 431-432.

58. Pigorsch S.U., B.K.J., Combs S.E., Sommer H., Höß C., Lindner H., Riepl M., Lueck A., Rosskopf B.R., Schaffer P., Wypior H.J., *Strahlentherapie nach brusterhaltender Operation*, in *Manual Mammakarzinome*, d.G.D. Bauerfeind I., Harbeck N., Pigorsch S., Salat C., Editor. 2019, Zuckschwerdt Verlag München, GmbH. p. 209-218.
59. Luczak C., A.C., Baier B., Kolben Th., Schaffer P., Sommer H., *Lokoregionäre Therapieoptionen bei Fernmetastasen*, in *Manual Mammakarzinome*, d.G.D. Bauerfeind I., Harbeck N., Pigorsch S., Salat C., Editor. 2019, Zuckschwerdt Verlag München, GmbH. p. 402-411.
60. Pigorsch S.U., B.K.J., Combs S.E., Sommer H., Höß C., Lindner H., Riepl M., Lueck A., Rosskopf B.R., Schaffer P., Wypior H.J., *Akut- und Spätnebenwirkungen der Strahlentherapie*, in *Manual Mammakarzinome*, d.G.D. Bauerfeind I., Harbeck N., Pigorsch S., Salat C., Editor. 2019, Zuckschwerdt Verlag München, GmbH. p. 225-227.
61. Ditsch, N., Köpke, M., Mau, C., *Pathogene Mutationen und deren klinische Bedeutung*, in *Colloquium Senologie*. 2022, LUKON Verlagsgesellschaft mbH. p. 74-81.
62. Meindl A., G.S., Keim S., Zeder-Goess C., Ditsch N., Quante A, *BRCA-Struktur und Funktion*, in *Manual Mammakarzinome*, d.G.D. Bauerfeind I., Harbeck N., Pigorsch S., Salat C., Editor. 2019, Zuckschwerdt Verlag, München, GmbH. p. 163-165.
63. Foulkes, W.D., et al., *Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer*. J Natl Cancer Inst, 2003. **95**(19): p. 1482-5.
64. Mavaddat, N., et al., *Pathology of breast and ovarian cancers among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from the Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2 (CIMBA)*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2012. **21**(1): p. 134-47.
65. Kassam, F., et al., *Survival outcomes for patients with metastatic triple-negative breast cancer: implications for clinical practice and trial design*. Clin Breast Cancer, 2009. **9**(1): p. 29-33.
66. Uhm, J.E., et al., *Treatment outcomes and clinicopathologic characteristics of triple-negative breast cancer patients who received platinum-containing chemotherapy*. Int J Cancer, 2009. **124**(6): p. 1457-62.
67. Hubert, A., et al., *The Jewish Ashkenazi founder mutations in the BRCA1/BRCA2 genes are not found at an increased frequency in Ashkenazi patients with prostate cancer*. Am J Hum Genet, 1999. **65**(3): p. 921-4.
68. Thorne, H., et al., *Decreased prostate cancer-specific survival of men with BRCA2 mutations from multiple breast cancer families*. Cancer Prev Res (Phila), 2011. **4**(7): p. 1002-10.
69. Ghadirian, P., et al., *Breast cancer risk in relation to the joint effect of BRCA mutations and diet diversity*. Breast Cancer Res Treat, 2009. **117**(2): p. 417-22.
70. Peel, J.B., et al., *A prospective study of cardiorespiratory fitness and breast cancer mortality*. Med Sci Sports Exerc, 2009. **41**(4): p. 742-8.
71. White, S.M., et al., *Translating physical activity interventions for breast cancer survivors into practice: an evaluation of randomized controlled trials*. Ann Behav Med, 2009. **37**(1): p. 10-9.
72. Kotsopoulos, J., et al., *Breastfeeding and the risk of breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers*. Breast Cancer Res, 2012. **14**(2): p. R42.
73. Meindl A., G.S., Keim S., Zeder-Goess C., Ditsch N., Quante A, *Prävention bei familiärem Mammakarzinom*, in *Manual Mammakarzinome*, d.G.D. Bauerfeind I.,

- Harbeck N., Pigorsch S., Salat C., Editor. 2019, Zuckschwerdt Verlag München, GmbH. p. 172-182.
74. Metcalfe, K.A., et al., *Predictors of contralateral prophylactic mastectomy in women with a BRCA1 or BRCA2 mutation: the Hereditary Breast Cancer Clinical Study Group*. J Clin Oncol, 2008. **26**(7): p. 1093-7.
  75. Metcalfe, K.A., et al., *International variation in rates of uptake of preventive options in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers*. Int J Cancer, 2008. **122**(9): p. 2017-22.
  76. Metcalfe, K.A., et al., *Family history as a predictor of uptake of cancer preventive procedures by women with a BRCA1 or BRCA2 mutation*. Clin Genet, 2008. **73**(5): p. 474-9.
  77. Isern, A.E., et al., *Aesthetic outcome, patient satisfaction, and health-related quality of life in women at high risk undergoing prophylactic mastectomy and immediate breast reconstruction*. J Plast Reconstr Aesthet Surg, 2008. **61**(10): p. 1177-87.
  78. Ditsch, N., Köpke, M., Mau, C., *Primäre Prävention bei gesunden Mutationsträgerinnen*, in *Colloquium Senologie*. 2022/2023, LUKON Verlagsgesellschaft mbH. p. 87-94.
  79. Meindl A., G.S., Keim S., Zeder-Goess C., Ditsch N., Quante A, *Prophylaktische Operationen, Primäre Prävention*, in *Manual Mammakarzinome*. 2019, Zuckschwerdtverlag GmbH: München. p. 173-174.
  80. Ditsch, N., et al., *AGO Recommendations for the Diagnosis and Treatment of Patients with Early Breast Cancer: Update 2019*. Breast Care (Basel), 2019. **14**(4): p. 224-245.
  81. Meindl A., G.S., Keim S., Zeder-Goess C., Ditsch N., Quante A, *Chemoprävention, Primäre Prävention*, in *Manual Mammakarzinome*. 2019, Zuckschwerdtverlag GmbH: München. p. 174.
  82. Kotsopoulos, J., et al., *Infertility, treatment of infertility, and the risk of breast cancer among women with BRCA1 and BRCA2 mutations: a case-control study*. Cancer Causes Control, 2008. **19**(10): p. 1111-9.
  83. Goss, P.E., et al., *Exemestane for breast-cancer prevention in postmenopausal women*. N Engl J Med, 2011. **364**(25): p. 2381-91.
  84. Meindl A., G.S., Keim S., Zeder-Goess C., Ditsch N., Quante A., *Sekundäre Prävention-Empfehlung des Deutschen Konsortiums*, in *Manual Mammakarzinome*. 2019, Zuckschwerdtverlag GmbH: München. p. 175-176.
  85. Ditsch, N., Köpke, M., Mau, C., *Sekundäre Prävention*, in *Colloquium Senologie*. 2022/2023, LUKON Verlagsgesellschaft mbH. p. 94-96.
  86. Bick, U., et al., *High-risk breast cancer surveillance with MRI: 10-year experience from the German consortium for hereditary breast and ovarian cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2019. **175**(1): p. 217-228.
  87. Meindl A., G.S., Keim S., Zeder-Goess C., Ditsch N., Quante A, *Kernstintomografie, Sekundäre Prävention*, in *Manual Mammakarzinome*. 2019, Zuckschwerdtverlag GmbH: München. p. 177.
  88. Sim, L.S., et al., *US correlation for MRI-detected breast lesions in women with familial risk of breast cancer*. Clin Radiol, 2005. **60**(7): p. 801-6.
  89. Meindl A., G.S., Keim S., Zeder-Goess C., Ditsch N., Quante A, *Sonografie, Sekundäre Prävention*, in *Manual Mammakarzinome*. 2019, Zuckschwerdtverlag GmbH. p. 177.

90. Meindl A., G.S., Keim S., Zeder-Goess C., Ditsch N., Quante A., *Mammografie, Sekundäre Prävention*, in *Manual Mammakarzinome*. 2019, Zuckschwerdtverlag GmbH. p. 176.
91. Pierce, L.J., et al., *Ten-year multi-institutional results of breast-conserving surgery and radiotherapy in BRCA1/2-associated stage I/II breast cancer*. J Clin Oncol, 2006. **24**(16): p. 2437-43.
92. Meindl, A., Grill S., Keim S., Zeder-Göß, C., Ditsch, N., Quante, A., *Operative Therapie des BRCA-positiven Mammakarzinoms*, in *Manual Mammakarzinome*. 2019, Zuckschwerdt Verlag GmbH. p. 178-179.
93. Ditsch, N., Köpke, M., Mau, C., *Lokale Therapie. Mastektomie oder brusterhaltende Therapie bei erkrankten Mutationsträgerinnen*, in *Colloquium Senologie*. 2022/2023, LUKON Verlagsgesellschaft mbH. p. 99-100.
94. Metcalfe, K., et al., *Contralateral breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers*. J Clin Oncol, 2004. **22**(12): p. 2328-35.
95. Graeser, M.K., et al., *Contralateral breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers*. J Clin Oncol, 2009. **27**(35): p. 5887-92.
96. Kirova, Y.M., et al., *Risk of breast cancer recurrence and contralateral breast cancer in relation to BRCA1 and BRCA2 mutation status following breast-conserving surgery and radiotherapy*. Eur J Cancer, 2005. **41**(15): p. 2304-11.
97. Mavaddat, N., et al., *Cancer risks for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from prospective analysis of EMBRACE*. J Natl Cancer Inst, 2013. **105**(11): p. 812-22.
98. Byrski, T., et al., *Pathologic complete response rates in young women with BRCA1-positive breast cancers after neoadjuvant chemotherapy*. J Clin Oncol, 2010. **28**(3): p. 375-9.
99. von Minckwitz, G., et al., *Neoadjuvant carboplatin in patients with triple-negative and HER2-positive early breast cancer (GeparSixto; GBG 66): a randomised phase 2 trial*. Lancet Oncol, 2014. **15**(7): p. 747-56.
100. Sikov, W.M., et al., *Impact of the addition of carboplatin and/or bevacizumab to neoadjuvant once-per-week paclitaxel followed by dose-dense doxorubicin and cyclophosphamide on pathologic complete response rates in stage II to III triple-negative breast cancer: CALGB 40603 (Alliance)*. J Clin Oncol, 2015. **33**(1): p. 13-21.
101. Meindl A., G.S., Keim S., Zeder-Goess C., Ditsch N., Quante A., *Systemtherapie, Tertiäre Prävention*, in *Manual Mammakarzinome*. 2019, Zuckschwerdtverlag GmbH: München. p. 179-180.
102. Tutt, A., et al., *Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial*. Lancet, 2010. **376**(9737): p. 235-44.
103. Hester, A., Ditsch, N., Grill, S., Keim, S., *PARP-Inhibitoren (Tertiäre Prävention)*, in *Manual Mammakarzinome*. 2021, Zuckschwerdtverlag. p. 205-206.
104. Miki, Y., et al., *A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1*. Science, 1994. **266**(5182): p. 66-71.
105. Venkitaraman, A.R., *Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2*. Cell, 2002. **108**(2): p. 171-82.
106. Pickart, C.M. and M.J. Eddins, *Ubiquitin: structures, functions, mechanisms*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1695**(1-3): p. 55-72.

107. Geyer, C.E., Jr., et al., *Overall survival in the OlympiA phase III trial of adjuvant olaparib in patients with germline pathogenic variants in BRCA1/2 and high-risk, early breast cancer*. *Ann Oncol*, 2022. **33**(12): p. 1250-1268.
108. Greenberg, R.A., et al., *Multifactorial contributions to an acute DNA damage response by BRCA1/BARD1-containing complexes*. *Genes Dev*, 2006. **20**(1): p. 34-46.
109. Wang, B., et al., *Abraxas and RAP80 form a BRCA1 protein complex required for the DNA damage response*. *Science*, 2007. **316**(5828): p. 1194-8.
110. Hashizume, R., et al., *The RING heterodimer BRCA1-BARD1 is a ubiquitin ligase inactivated by a breast cancer-derived mutation*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(18): p. 14537-40.
111. Wu, W., et al., *The ubiquitin E3 ligase activity of BRCA1 and its biological functions*. *Cell Div*, 2008. **3**: p. 1.
112. Andreassen, P.R., et al., *Understanding BRCA2 Function as a Tumor Suppressor Based on Domain-Specific Activities in DNA Damage Responses*. *Genes (Basel)*, 2021. **12**(7).
113. Patel, K.J., et al., *Involvement of Brca2 in DNA repair*. *Mol Cell*, 1998. **1**(3): p. 347-57.
114. Buisson, R., et al., *Cooperation of breast cancer proteins PALB2 and piccolo BRCA2 in stimulating homologous recombination*. *Nat Struct Mol Biol*, 2010. **17**(10): p. 1247-54.
115. Jensen, D.E., et al., *BAP1: a novel ubiquitin hydrolase which binds to the BRCA1 RING finger and enhances BRCA1-mediated cell growth suppression*. *Oncogene*, 1998. **16**(9): p. 1097-112.
116. Louie, B.H. and R. Kurzrock, *BAP1: Not just a BRCA1-associated protein*. *Cancer Treat Rev*, 2020. **90**: p. 102091.
117. Nishikawa, H., et al., *BRCA1-associated protein 1 interferes with BRCA1/BARD1 RING heterodimer activity*. *Cancer Res*, 2009. **69**(1): p. 111-9.
118. Yan, L., et al., *MiR-125a-5p functions as a tumour suppressor in breast cancer by downregulating BAP1*. *J Cell Biochem*, 2018. **119**(11): p. 8773-8783.
119. Goldstein, A.M., *Germline BAP1 mutations and tumor susceptibility*. *Nat Genet*, 2011. **43**(10): p. 925-6.
120. Coupier, I., et al., *BAP1 and breast cancer risk*. *Fam Cancer*, 2005. **4**(4): p. 273-7.
121. Qin, J., et al., *BAP1 promotes breast cancer cell proliferation and metastasis by deubiquitinating KLF5*. *Nat Commun*, 2015. **6**: p. 8471.
122. Guenard, F., et al., *Genetic sequence variations of BRCA1-interacting genes AURKA, BAP1, BARD1 and DHX9 in French Canadian families with high risk of breast cancer*. *J Hum Genet*, 2009. **54**(3): p. 152-61.
123. Ramos-Vara, J.A., *Principles and Methods of Immunohistochemistry*. *Methods Mol Biol*, 2017. **1641**: p. 115-128.
124. Soerjomataram, I., et al., *An overview of prognostic factors for long-term survivors of breast cancer*. *Breast Cancer Res Treat*, 2008. **107**(3): p. 309-30.
125. Ventii, K.H., et al., *BRCA1-associated protein-1 is a tumor suppressor that requires deubiquitinating activity and nuclear localization*. *Cancer Res*, 2008. **68**(17): p. 6953-62.
126. Murali, R., T. Wiesner, and R.A. Scolyer, *Tumours associated with BAP1 mutations*. *Pathology*, 2013. **45**(2): p. 116-26.

127. Farquhar, N., et al., *Patterns of BAP1 protein expression provide insights into prognostic significance and the biology of uveal melanoma*. J Pathol Clin Res, 2018. **4**(1): p. 26-38.
128. Abdel-Rahman, M.H., et al., *Germline BAP1 mutation predisposes to uveal melanoma, lung adenocarcinoma, meningioma, and other cancers*. J Med Genet, 2011. **48**(12): p. 856-9.
129. Song, H., et al., *Loss of nuclear BAP1 expression is associated with poor prognosis in oral mucosal melanoma*. Oncotarget, 2017. **8**(17): p. 29080-29090.
130. Mashtalir, N., et al., *Autodeubiquitination protects the tumor suppressor BAP1 from cytoplasmic sequestration mediated by the atypical ubiquitin ligase UBE2O*. Mol Cell, 2014. **54**(3): p. 392-406.
131. Hakiri, S., et al., *Functional differences between wild-type and mutant-type BRCA1-associated protein 1 tumor suppressor against malignant mesothelioma cells*. Cancer Sci, 2015. **106**(8): p. 990-9.
132. Carbone, M., et al., *BAP1 and cancer*. Nat Rev Cancer, 2013. **13**(3): p. 153-9.
133. Nath, S. and G. Nagaraju, *FANCD1 helicase promotes DNA end resection by facilitating CtIP recruitment to DNA double-strand breaks*. PLoS Genet, 2020. **16**(4): p. e1008701.
134. Low, L.H., et al., *Nedd4 family interacting protein 1 (Ndfip1) is required for ubiquitination and nuclear trafficking of BRCA1-associated ATM activator 1 (BRAT1) during the DNA damage response*. J Biol Chem, 2015. **290**(11): p. 7141-50.
135. Jiang, Q., et al., *MERIT40 cooperates with BRCA2 to resolve DNA interstrand cross-links*. Genes Dev, 2015. **29**(18): p. 1955-68.
136. Wittekind, C., Meyer, H-J., , in *TNM Klassifikation maligner Tumoren*. 2010, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, KGaA. p. 174-178.

## VII. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

**Abbildung 1:** (a): positive Korrelation zwischen T-Status und BAP1-Expression im Kern von BRCA1/2-Mutation-positiven Tumore; (b): negative BAP1-Expression im Kern (IRS:0), Mutation: BRCA1, pT1, (25 X Vergrößerung); (c): positive BAP1- Expression im Kern (IRS:2), Mutation: BRCA2, pT3, (25 X Vergrößerung) ..... 40

**Abbildung 2:** a): Korrelation zwischen T-Status und BAP1-Expression im Zytoplasma in BRCA1/2-Mutation-negativen Tumore; (b): BAP1 Zytoplasma Expression (IRS:4), BRCA1/2 negativ, pT2, (25 X Vergrößerung); (c): BAP1 Zytoplasma Expression (IRS:3), BRCA1/2 negativ, pT4, (25 X Vergrößerung) ..... 42

**Abbildung 3:** Kaplan Meier Überlebenskurven; (a): signifikant besseres Überleben in Patientinnen mit einer negativen BAP1 Kern Expression (IRS<0.5) verglichen zu Patientinnen mit einer positiven BAP1 Kern Expression (IRS>0.5) in der Gruppe der BRCA1/2 positiven Fällen; (b): kein signifikanter Unterschied im Langzeitüberleben zwischen Patientinnen mit einer negative BAP1-Kern Expression (IRS<0.5) und Patientinnen mit einer positiven BAP1-Kern Expression (IRS>0.5) in den BRCA1/2-negativen Fälle ..... 44

**Abbildung 4:** Kaplan Meier Überlebenskurven; (a): BRCA1/2 Mutation-negativ: trotz des negativen Logrank Tests zeigt sich ein signifikant besseres Überleben in Fälle mit einer negativen BAP1-Expression im Zytoplasma (IRS<0.5) verglichen zu Fälle mit einer positiven BAP1-Expression im Zytoplasma (IRS>0.5); (b): BRCA1/2 Mutation- positiv: kein signifikanter Unterschied im Langzeitüberleben zwischen Fälle mit negativer BAP1-Expression in Zytoplasma (IRS<0.5) und Fälle mit positiver BAP1-Expression in Zytoplasma (IRS>0.5); (c): BRCA1/2 Mutation-negativ: signifikant besseres Überleben in Fälle mit einer niedrigen BAP1 Expression in Zytoplasma (IRS<7), verglichen zu Fälle mit einer hohen BAP1-Expression in Zytoplasma (IRS>7); (d): BRCA1/2 Mutation-positiv: kein Unterschied im Langzeitüberleben zwischen Fälle mit



einer niedrigen BAP1- Expression in Zytoplasma (IRS<7) und einer hohen Expression in Zytoplasma (IRS>7) ..... 46

**Tabelle 1:** Zusammenfassung aller untersuchten klinischen Merkmale und deren Korrelation zur BAP1-Expression im Kern/ Zytoplasma in BRCA1/2 mutierten- und nicht mutierten Patientinnen ..... 47

**Tabelle 2:** Antikörperreagenz ..... 71

**Tabelle 3:** Färbungsprotokoll ICH BAP1 nach Forschungslabor der Frauenklinik LMU, Campus Innenstadt (Christina Kuhn) ..... 71

## VIII. Abkürzungsverzeichnis

geb.	geboren
%	Prozent
v.a.	vor allem
ca.	circa
u.a.	unter anderem
z.B.	zum Beispiel
o.g.	oben genannt
etc.	et cetera- und so weiter
Z.n.	Zustand nach
BMI	Body Mass Index
HR	Hormonrezeptor
ER	Östrogenrezeptor
PR	Progesteronrezeptor
HER2/neu	Humaner epidermaler Wachstumsfaktor- Rezeptor Typ 2
Et al.	und andere
DNA	Desoxyribonukleinsäure
BRCA1/2	Breast Cancer Gene 1/2
PALB2	Partner and Localizer of BRCA2
TP53	Tumor protein 53

PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
STK11	Serine/Threonine Kinase 11
CDH1	Cadherin 1
ATM	Ataxia-Telangiectasia Mutated
CHEK2	Checkpoint Kinase 2
BARD1	BRCA associated Ring Domain 1
ZNS	Zentrale Nervensystem
CUP	Cancer of Unknown Primary
DCIS	Duktales Carcinoma in situ
LCIS	Lobuläres Carcinoma in situ
MRT	Magnetresonanztomographie
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
CT	Computertomographie
NST	No special type
WHO	World Health Organisation
TNM	Tumor-Node-Metastasis
UICC	Union for International Cancer Control
T	Primäre Tumorgroße
Tis	Carcinoma in situ
N	Nodus
LK	Lymphknoten

M	Metastasen
G	Grading
ASCO	American Society of Clinical Oncology
ICH	Immunhistochemie
FISH	Fluoreszenz-Insitu-Hybridisierung
FBREK	Familiärer Brust- und Eierstockkrebs
BET	Brusterhaltende Therapie
MRM	Modifizierte Radikale Mastektomie
MAK	Mamillen-Areola-Komplex
SSM	Skin Sparing Mastektomie
NSM	Nipple Sparing Mastektomie
SLNB	Sentinel-Lymphknoten Biopsie
ALND	Axilläre-Lymphadenektomie
TAD	Targeted axillary Dissection
NACT	Neoadjuvante Chemotherapie
TLN	Target Lymphknoten
TNBC	Triple Negative Breast Cancer
SERM	Selektiver Östrogenrezeptor Modulator
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone
AI	Aromatase Inhibitor
CDK4/6	Cyclin-Dependent Kinases 4/6

mTOR	Mammalian target of rapamycin
PDL1	Programmed Cell Death Ligase 1
PD1	Programmed Cell Death Protein 1
PARP	Poly-ADP Ribose Polymerase
PFS	Progressionsfreies Überleben
Gy	Gray
RING	Really Interesting New Gene
KLF5	Krüppel-like Faktor 5 Protein
sog.	sogennant
DUB	deubiquitinierenden Enzyme
LMU	Ludwig Maximilian-Universität
°C	Grad Celsius
l	liter
ml	milliliter
µm	mikrometer
IgG1	Immunoglobulin G1
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
HRP-Polymer	Horseradish peroxidase Polymer
DAB	3,3 Diaminobenzidin
H2O2	Wasserstoffperoxid
IRS	Immune Reactive Score

ROC Kurve	Receiver Operating Characteristic Kurve
n	Number (Anzahl)
FDA	Food and Drug Administration
n.s.	nicht signifikant

## IX. Anhang

### 9.1. Färbungsprotokoll und Reagenzien

#### Primärantikörper

Anti-BAP1 mouse IgG1 monoklonal; Klon 1G8

Konzentration 1,0 mg/ml; Lot: 53428

Firma LSBio

Bestellnummer LS-B4874

**Detektionssystem** ZytoChem Plus HRP Polymer System  
(Mouse/Rabbit); Zytomed Nr. POLHRP-100

Chromogen+Substrat- Lösung Liquid DAB+Substrate Chromogen System (Dako;  
Bestellnummer K3468)

Tabelle 2 Antikörperreagenz

#### Färbungsprotokoll

1. Entparaffinieren in Xylol für 20 Minuten
2. In 100%em Ethanol schwenken
3. Blockierung der endogenen Peroxydase durch:  
20 Minuten in 6%igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- Methanollösung für Paraffinschnitte (= 6ml  
30%iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 97ml Methanol)
4. In 100%em Ethanol schwenken
5. Nacheinander in 70%em und 50%igem Ethanol schwenken
6. Destiliertes Wasser
7. Demaskierung durch Hitzevorbehandlung im Schnellkochtopf mit Na-  
Citratpuffer pH 6,0:

Lösung A: 21,01g 0,1M Citronensäure (Merck Nr. 244) + 1l destilliertes Wasser

Lösung B: 29,41g 0,1M Na-Citrat (Merck Nr. 6448) + 1l destilliertes Wasser

Gebrauchslösung: 18ml Lösung A + 82ml Lösung B+ 900ml destilliertes Wasser

Durchführung: Dampfkochtopf mit Puffer füllen, Platte auf Stufe 12; nach 6 Minuten beginnt der Puffer zu kochen. Schnitte einstellen, Deckel verschließen und Wecker auf 5 Minuten stellen; Sobald der 2. Ring des Ventils sichtbar ist, Hitze auf Stufe 0 reduzieren. Nach den 5 Minuten Topf in einem Wasserbecken abkühlen lassen, Deckel öffnen und vorsichtig Leitungswasser zum Puffer hinzufügen.

8. In destilliertes Wasser spülen
9. 2x 2 Minuten in PBS waschen
10. 5 Minuten Blocking Solution (Reagent 1)
11. Primärantikörper (Anti-BAP1) 16 Stunden über Nacht bei 4°C inkubieren: Verdünnung Anti-BAP1 zu PBS= 1:300.
12. 2x 2 Minuten in PBS waschen
13. 20 Minuten Post Block (Reagent 2)
14. 2x 2 Minuten in PBS waschen
15. 30 Minuten in HRP-Polymer (Reagent 3)
16. 2x 2 Minuten in PBS waschen
17. 1 Minute Substratfärbung mit DAB: 1 ml Substratpuffer + 1 Tropfen DAB-Chromogen



18. 2x 2 Minuten in destilliertes Wasser, um die Farbreaktion zu unterbrechen
19. 1 Minute Gegenfärbung mit saurem Hämalaun nach Mayer
20. 5 Minuten in Leitungswasser
21. aufsteigende Alkoholreihe- 70%es Ethanol, 96%es Ethanol, 100%es Ethanol, Xylol
22. Eindecken mit „Eukitt“

Tabelle 3 Färbungsprotokoll ICH BAP1 nach Forschungslabor der Frauenklinik LMU, (Christina Kuhn)

## **X. Danksagung**

Ich möchte mich sehr herzlich bei Frau Prof. Dr. med. Nina Ditsch für ihre umfassende und fachliche Unterstützung während der Forschung und beim Verfassen der Arbeit bedanken.

Besonderer Dank gilt Frau Dr. med. Christine Zeder-Göß, die 2016 an mich geglaubt hat. Sie hat mich nicht nur als Betreuerin in meiner wissenschaftlichen Arbeit unterstützt, sondern ist auch zu meiner Mentorin für meine berufliche Laufbahn geworden. Sie ist nicht nur eine hervorragende Ärztin und Betreuerin, sondern auch ein wunderbarer Mensch und Freund!

Ein großes Dankeschön geht auch an Frau Dr. Christina Kuhn für ihre immense Unterstützung im Labor und ihre fröhliche, optimistische Persönlichkeit, die immer ein Lächeln auf die Gesichter zaubert.

Vielen Dank an Prof. Dr. Udo Jeschke für die exzellente wissenschaftliche Unterstützung.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Ehemann, Herrn Dr. med. Georgi Ivanov, der mich stets ermutigt, herausfordert und aufgebaut hat. Ohne ihn wäre ich heute nicht hier!

Abschließend danke ich meiner Familie – meinen Eltern, Frau Evelina Penkova und Herrn Dr. Plamen Dotchev, M.D., die mich stets gefördert und mir dieses Studium ermöglicht haben, sowie meiner Schwester, Frau Dr. Nikolina Docheva, M.D., die immer ein herausragendes persönliches und berufliches Vorbild für mich ist.

## **XI. Eidesstattliche Versicherung**

Eidesstattliche Versicherung Stand 21.11.2024

**Ivanov, Vesela Plamenova**

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

**Die BAP1-Expression und subzelluläre Lokalisation in Tumorzellen des hereditären Mammakarzinoms korreliert mit dem klinischen Outcome**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 21.11.2024

Vesela Plamenova Ivanov

Ort, Datum

Unterschrift Doktorand