

Aus dem Zentrum Familiärer Brust- und Eierstockkrebs  
der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln  
Direktor: Universitätsprofessor Dr. Alexander Volk

**Genetische Prädisposition des männlichen  
Mammakarzinoms: Mutigenpanel-Analysen in  
männlichen Brustkrebspatienten des Deutschen  
Konsortiums Familiärer Brust- und  
Eierstockkrebs**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
Muriel Rolfes  
aus Berlin

promoviert am 20. März 2026

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

2026

Dekan:                    Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink  
1. Gutachter:        Privatdozent Dr. rer. nat. E. Hahnen  
2. Gutachterin:     Privatdozentin Dr. med. B. Schömig-Markiefka

## Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Die vorliegende Dissertation wurde im Rahmen des Promotionsverfahrens an der medizinischen Fakultät der Universität zu Köln als kumulative Dissertation eingereicht.

Sie basiert auf folgender wissenschaftlicher Veröffentlichung mit dem Titel:  
"Prevalence of Cancer Predisposition Germline Variants in Male Breast Cancer Patients: Results of the German Consortium for Hereditary Breast and Ovarian Cancer"

Rolfes M, Borde J, Möllenhoff K, Kayali M, Ernst C, Gehrig A, Sutter C, Ramser J, Niederacher D, Horváth J, Arnold N, Meindl A, Auber B, Rump A, Wang-Gohrke S, Ritter J, Hentschel J, Thiele H, Altmüller J, Nürnberg P, Rhiem K, Engel C, Wappenschmidt B, Schmutzler RK, Hahnen E, Hauke J. Prevalence of Cancer Predisposition Germline Variants in Male Breast Cancer Patients: Results of the German Consortium for Hereditary Breast and Ovarian Cancer. *Cancers* (Basel). 2022 Jul 5;14(13):3292. doi: 10.3390/cancers14133292. PMID: 35805063; PMCID: PMC9265404.

Ich habe die dieser Publikation zugrunde liegende wissenschaftliche Arbeit überwiegend eigenständig konzipiert, experimentell durchgeführt und ausgewertet, sowie den Manuskriptentwurf im Wesentlichen selbst verfasst. Die KoautorInnen waren beratend oder unterstützend tätig bei der methodischen Ausarbeitung und Korrektur des Manuskripts. Die jeweiligen Anteile der KoautorInnen sind transparent und nachvollziehbar im Manuskript bzw. im methodischen Anhang dokumentiert.

Ich bestätige, dass mein Eigenanteil an der wissenschaftlichen Arbeit so wesentlich ist, dass die Publikation eine eigenständige wissenschaftliche Leistung darstellt und die Anforderungen an eine kumulative Dissertation gemäß der gültigen Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln erfüllt werden.

Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

### Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen und Institutionen meinen herzlichen Dank aussprechen, die mich während der Entstehung dieser Dissertation unterstützt und begleitet haben.

Mein besonderer Dank gilt meinen Doktorvätern Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Jan Hauke und Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Eric Hahnen, die mir die Bearbeitung des Themas ermöglicht haben und mich mit fachlicher Expertise, großem Engagement, wertvollen Anregungen und stetiger Geduld durch alle Phasen der Arbeit geführt haben.

Ich danke meinen Kollegen und Kolleginnen des Zentrums für Familiären Brust- und Eierstockkrebs der medizinischen Fakultät der Universität zu Köln, sowie allen beteiligten Zentren, Laboren und Instituten für ihre maßgebliche fachliche Unterstützung und produktive Zusammenarbeit. Ihre Hilfsbereitschaft und ihr Engagement haben wesentlich zum Gelingen der praktischen Arbeiten beigetragen.

Ebenso danke ich allen KoautorInnen der zugrunde liegenden Publikation herzlich für die angenehme Zusammenarbeit, die konstruktiven Beiträge und die kritische Durchsicht der Manuskriptfassungen.

Ich danke der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln für die Förderung im Rahmen des Köln Fortune Programms, die mir die Durchführung der Forschungsarbeit maßgeblich erleichtert hat.

Nicht zuletzt gilt ein besonderer Dank meiner Familie und meinen FreundInnen für ihre bedingungslose Unterstützung und beständigen Rückhalt während meiner gesamten Studien- und Promotionszeit. Ohne ihre Ermutigung und ihr Vertrauen wäre die Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.

In loving memory of my sister

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>7</b>
<b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>8</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>10</b>
2.1 Epidemiologie	10
2.2 Versorgung und aktueller Kenntnisstand zum männlichen Mammakarzinom	10
2.3 Pathophysiologie und nicht-genetische Risikofaktoren	12
2.4 Das erblich bedingte Mammakarzinom	13
2.5 Genetische Prädisposition: Brustkrebs-Risikogene	15
2.5.1. <i>BRCA2</i> und <i>BRCA1</i>	16
2.5.2. <i>PALB2</i>	18
2.5.3. <i>CHEK2</i>	19
2.5.4. <i>ATM</i>	21
2.6 Grundlagen der Karzinogenese und Zellzykluskontrolle	22
2.6.1. Doppelstrangbrüche und DNA-Reparaturmechanismen	23
2.6.2. Fehlerhafte homologe Rekombinationsreparatur und klinische Konsequenzen	25
2.7 Multigen-Panel Testungen bei männlichen Brustkrebspatienten	26
2.8 Deutsches Konsortium Familiärer Brust- und Eierstockkrebs	28
2.9 Ziele der Arbeit	30
<b>3. PUBLIKATION</b>	<b>30</b>
<b>4. DISKUSSION</b>	<b>44</b>
<b>5. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>55</b>
<b>6. ANHANG</b>	<b>66</b>
6.1 Ethikvotum	66

<b>6.2</b>	<b>Methodik</b>	<b>69</b>
<b>6.2.1</b>	<b>Genauswahl</b>	<b>69</b>
<b>6.2.2</b>	<b>DNA-Konzentrationsbestimmung und Verdünnung</b>	<b>70</b>
<b>6.2.3</b>	<b>Next-Generation-Sequenzierungen (NGS)</b>	<b>71</b>
<b>6.2.4</b>	<b>Bewertung der Varianten – Datenbanken und Software</b>	<b>72</b>
<b>6.2.5</b>	<b>Validierung der Kandidatengene</b>	<b>73</b>
<b>6.2.6</b>	<b>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</b>	<b>74</b>
<b>6.2.7</b>	<b>Enzymatische Aufreinigung der PCR-Produkte</b>	<b>75</b>
<b>6.2.8</b>	<b>Sequenzanalyse nach der Sanger Kettenabbruch-Methode</b>	<b>75</b>
<b>6.2.9</b>	<b>Copy Number Variation (CNV)-Detektion und Multiplex Ligation Probe Amplification (MLPA)</b>	<b>76</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ACMG	American College of Medical Genetics
AGO	Arbeitsgemeinschaft gynäkologische Onkologie
AI	Aromatase Inhibitoren
BER	Basenexzisionsreparatur
CDK	Zyklinabhängige Kinasen
CI	Confidence Interval
CIMBA	Consortium of Investigators of Modifiers of <i>BRCA1/2</i>
DK FBREK	Deutsches Konsortium familiärer Brust- und Eierstockkrebs
DKG	Deutsche Krebsgesellschaft
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSB	Doppelstrangbrüche
ENIGMA	Evidence-based Network for Interpretation of Germline Mutant Alleles
ER	Östrogenrezeptor
ExAC	Exome Aggregation Consortium
GWAS	Genomweite Assoziationsstudien
HBOC	Hereditäres Brust- und Eierstockkrebssyndrom
HER2	Humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2
HNPCC	Hereditäres nicht polypöses Kolonkarzinom
HR	Homologe Reparatur
HRR	Homologe Rekombination Reparatur
KI	Konfidenzintervall
LOH	Loss-of-Heterozygosity
MGPT	Multigenpaneltestungen
MMR	Mismatch-Reparatur
NGS	Next-Generation-Sequenzierungen
NHEJ	Non-Homologous End Joining
OR	Odds Ratio
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PR	Progesteronrezeptor
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismen
UICC	Union international contre le cancer
VUS	Varianten unklarer Signifikanz

## 1. Zusammenfassung

Das männliche Mammakarzinom ist eine seltene Erkrankung und umfasst weniger als 1% der Krebserkrankungen bei Männern und weniger als 1% aller Brustkrebserkrankungen. Während Brustkrebs bei Frauen mit jährlich etwa 69.000 neu diagnostizierten Patientinnen die häufigste Tumorentität darstellt, erkranken in Deutschland jedes Jahr etwa 600-750 Männer an Brustkrebs. Aufgrund der relativen Seltenheit der Erkrankung und der entsprechend begrenzten Studienlage orientieren sich Versorgungskonzepte und Behandlungsempfehlungen weiterhin vordergründig an wissenschaftlichen Erkenntnissen zum Brustkrebs bei Frauen, obwohl Hinweise auf wesentliche molekulare Unterschiede eine geschlechtsspezifischere Auseinandersetzung erfordern. Sowohl bei Männern als auch bei Frauen spielt die genetische Prädisposition eine entscheidende Rolle in der Entstehung von Brustkrebs. Während bei Frauen vordergründig pathogene *BRCA1* Varianten mit einem erhöhten Risiko für Brustkrebs assoziiert sind, ist das männliche Mammakarzinom mit einer hohen Prävalenz pathogener Varianten im *BRCA2*-Gen assoziiert. Darüber hinaus sind die Daten zu Varianten in weiteren potenziellen Risikogenen mit niedriger bis mittlerer Penetranz, die das männliche Brustkrebsrisiko beeinflussen wie *PALB2*, *CHEK2* und *ATM* bislang unzureichend diskutiert. In dieser retrospektiven multizentrischen Studie wurde die Prävalenz von pathogenen Varianten in *BRCA1/2*- und 23 Nicht-*BRCA1/2*-Genen untersucht. Die Studie umfasst eine Stichprobe von 614 männlichen Mammakarzinom Patienten, die zwischen 1965 und 2018 mit uni- oder bilateralem Brustkrebs diagnostiziert und über die Zentren des Deutschen Konsortiums für familiären Brust- und Eierstockkrebs rekrutiert wurden. Die Ergebnisse zeigten, dass ein erheblicher Anteil der männlichen Brustkrebspatienten pathogene Varianten im *BRCA2*-Gen (23,0%, 142/614) und im *BRCA1*-Gen (4,6%, 28/614) aufwiesen. Insgesamt betrug die Prävalenz von pathogenen Varianten in *BRCA1/2* bei Patienten ohne familiäre Vorgeschichte von Brust- und/ oder Eierstockkrebs 11,0% (16/146). Dabei zeigten Träger pathogener Veränderungen in *BRCA1/2* im Vergleich zu Brustkrebspatienten ohne entsprechende genetische Veränderungen keinen früheren Krankheitsbeginn. Die häufigsten klinischen Tumorphänotypen waren östrogenrezeptorpositiv (ER+), progesteronrezeptorpositiv (PR+) und HER2-negativ (77,7%). Darüber hinaus zeigten sich 10,2% der untersuchten Tumore dreifach positiv (ER+, PR+, HER2+) und 1,2% triple negativ (ER-, PR-, HER2-). Es wurde kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem ER/PR/ HER2-Status und dem Auftreten von pathogenen Varianten in *BRCA1/2* festgestellt. Ein Vergleich der Prävalenz von proteintrunkierenden Varianten (PTVs) zwischen männlichen Brustkrebspatienten und Kontrolldaten (ExaC, n = 27.173) ergab signifikante Assoziationen von PTVs in *BRCA1* und *BRCA2* mit dem männlichen Mammakarzinom (*BRCA1*: OR = 17,04, 95% CI = 10,54-26,82,

$p < 10^{-5}$ ; *BRCA2*: OR = 77,71, 95% CI = 58,71-102,33,  $p < 10^{-5}$ ). Weitere Fall-Kontroll-Analysen der 23 nicht-*BRCA1/2* Gene bei 340 *BRCA1/2* negativen Patienten und ExAc-Kontrollen zeigten signifikante Assoziationen von PTVs in *CHEK2*, *PALB2* und *ATM* mit männlichem Brustkrebs (*CHEK2*: OR = 3,78, 95 % CI = 1,59–7,71,  $p = 0,002$ ; *PALB2*: OR = 14,77, 95 % CI = 5,02–36,02,  $p < 10^{-5}$ ; *ATM*: OR = 3,36, 95 % CI = 0,89–8,96,  $p = 0,04$ ). Insgesamt unterstützen die präsentierten Ergebnisse den Nutzen von Multigenpanalysen bei männlichen Brustkrebspatienten unabhängig von ihrer jeweiligen familiären Vorgeschichte, dem Erstdiagnosealter und dem Tumorphänotyp. Das singuläre männliche Mammakarzinom konnte basierend auf den vorliegenden Forschungsergebnissen im Rahmen der Wissensgenerierenden Versorgung des Deutschen Konsortiums für familiären Brust- und Eierstockkrebs (DK-FBREK) erfolgreich als neues Einschlusskriterium in der genetischen Testung validiert werden und setzt damit ein starkes Beispiel für die erfolgreiche Translation von Forschung in die klinische Versorgung. Auch wenn weitere Forschung auf diesem Gebiet mittels umfassender internationaler Bemühungen erforderlich ist, um die klinische Relevanz der pathogenen Risikogenvarianten abschließend zu verstehen, deuten die bisherigen Erkenntnisse darauf hin, dass sie individuelle geschlechtsspezifische Betrachtung der genetischen Prädisposition des männlichen Mammakarzinoms ein bedeutender Schritt zur Verbesserung der personalisierten Risikobewertung und zukünftigen Therapieentscheidung darstellt.

## **2. Einleitung**

### **2.1 Epidemiologie**

Das Mammakarzinom des Mannes ist eine seltene maligne Tumorerkrankungen und repräsentiert weniger als 1% der männlichen Tumoren. In Deutschland erkranken jährlich etwa 750 Männer an Brustkrebs und stellen damit lediglich 1% der gesamten Brustkrebsfälle dar. Diese Zahl steht im Kontrast zur prädominierenden epidemiologischen Bedeutung des weiblichen Mammakarzinoms als häufigste Krebserkrankung bei Frau mit rund 69.000 Neuerkrankungen jährlich.<sup>1</sup> Während eine von acht Frauen im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs erkrankt, liegt das Lebenszeitrisiko ein Mammakarzinom zu entwickeln bei Männern bei gerade einmal 1:1000<sup>2</sup>, doch die Inzidenz zeigt weltweit eine steigende Tendenz.<sup>3,4</sup> Daten des SEER-Programms (Surveillance, Epidemiology and End Results) demonstrieren, dass die altersadjustierte 5-Jahres-Inzidenz von männlichem Brustkrebs über alle Ethnien hinweg zwischen 1975 und 2015 von 0,85 pro 100.000 Personen auf 1,19 pro 100.000 Personen stetig gestiegen ist.<sup>5</sup>

Das mediane Erkrankungsalter liegt in Deutschland bei Männern bei 72 Jahren und liegt damit deutlich über dem mittleren Erstmanifestationsalters von 64 Jahren bei Frauen.<sup>1</sup> Die Erkrankung weist zudem eine unimodale Altershäufigkeitsverteilung auf, wobei die Inzidenz mit zunehmendem Alter kontinuierlich ansteigt und im siebten Lebensjahrzehnt ihren Höhepunkt erreicht. Ebenso verdichten sich die Hinweise auf eine erhöhte Gesamtmortalität bei männlichen Brustkrebspatienten.<sup>6</sup> Epidemiologische Studien zeigen, dass sozioökonomische Faktoren, das Krebsstadium, Tumoreigenschaften wie Größe und Grad signifikant zur erhöhten Sterblichkeit in dieser Patientengruppe beitragen.<sup>7,8</sup> Aktuellen Studienergebnissen zufolge weisen männliche Patienten innerhalb von fünf Jahren nach Diagnose eine 19% höhere Gesamtsterblichkeit als Frauen auf<sup>9</sup> und die Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei Männer mit Brustkrebs möglicherweise schlechtere Behandlungsergebnisse erzielt werden und somit ein höheres Risiko für eine ungünstige Prognose haben.<sup>7</sup>

Histopathologisch präsentieren sich männliche Mammakarzinome überwiegend als invasiv duktales Karzinome (>90%)<sup>10</sup> und weisen verglichen mit dem Auftreten unter Frauen erhöhte Positivitätsraten an Östrogen- und Progesteron-Rezeptorexpressionen auf (90-97%).<sup>11,12,13,14,15</sup>

### **2.2 Versorgung und aktueller Kenntnisstand zum männlichen Mammakarzinom**

Aufgrund der relativen Seltenheit des männlichen Mammakarzinoms und der bislang unzureichenden geschlechtsspezifischen Untersuchung, orientieren sich aktuelle

Versorgungskonzepte und Behandlungsempfehlungen weiterhin vordergründig an entsprechenden klinischen Daten und Empfehlungen für postmenopausale Brustkrebspatientinnen. Trotz weitreichender tumorbiologischer Überschneidungen und Ähnlichkeiten zum Mammakarzinom bei Frauen, gilt dieser Ansatz der einfachen Modellübertragung zunehmend als revisionsbedürftig. Zahlreiche Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Erkrankung bei Männern abweichende (molekular)biologische Merkmale aufweist und eine eigene Tumorentität mit spezifischen Charakteristika darstellt, die in der Patientenversorgung berücksichtigt werden sollten.<sup>16</sup> Weitere Evidenz aus randomisierten Studien zu spezifischer Diagnostik, Therapie und biologischen Parametern ist jedoch notwendig, um die bestehenden Unsicherheiten im Umgang mit männlichen Brustkrebspatienten zu reduzieren und angepasste Behandlungsstandards festzulegen. In Deutschland orientiert sich die Diagnostik und Therapie an der aktuellen S3 Leitlinie Mammakarzinom sowie der jährlich aktualisierten AGO-Empfehlung der Arbeitsgemeinschaft gynäkologische Onkologie ([www.ago-online.de](http://www.ago-online.de)).

Dem interdisziplinären onkologischen S3-Leitlinienprogramm für Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms folgend, werden derzeit für Männer keine speziellen Screeningverfahren, sowie Früherkennungsmaßnahmen empfohlen. Den Betroffenen wird bislang dazu geraten, Veränderungen im Brustbereich zu beobachten und sich gegebenenfalls ärztlich untersuchen zu lassen. Die meisten Brustkrebsfälle werden im Verlauf von den Patienten selbst entdeckt und bei über 40% der Fälle in bereits fortgeschrittenen Stadien UICC III und IV diagnostiziert.<sup>11</sup> Dies lässt sich am ehesten auf ein mangelndes Bewusstsein in der Brustkrebsvorsorge bei Männern und der damit einhergehenden verzögerten ärztlichen Vorstellung zurückführen.<sup>7</sup> Jeder Verdacht auf einen malignen Befund sollte abgeklärt werden und zunächst eine allgemeine Anamnese unter Berücksichtigung potenziell zugrundeliegende Risikofaktoren erfolgen. Die Basisdiagnostik beinhaltet weiterhin die körperliche Untersuchung, Mammografie, sowie Ultraschalldiagnostik der Brust und der Lymphabflussregionen. Ebenso soll die weiterführende Diagnostik, sowie Staging- und Ausbreitungsdiagnostik entsprechend der Empfehlungen für Frauen erfolgen.

Die Therapie des lokalisierten invasiven männlichen Mammakarzinoms orientiert sich weitgehend an den Behandlungsprinzipien, die auch bei weiblichem Brustkrebs angewendet werden. Aufgrund des häufig bereits fortgeschrittenen Krankheitsstadiums und einhergehenden ungünstigeren Prognose gestaltet sich die therapeutische Herangehensweise bei männlichen Patienten tendenziell jedoch häufig radikaler als bei weiblichen Tumorpatientinnen. Diese umfasst in der Regel die chirurgische Behandlung mittels Mastektomie, Strahlentherapie, sowie systemischen Behandlungen wie Hormon- oder Chemotherapien, sowie PARP-Inhibitoren für fortgeschrittene Stadien.<sup>17</sup>

Histopathologisch präsentieren sich männliche Mammakarzinome überwiegend als Luminal-like Tumore mit positiver Östrogen(ER)- und Progesteron(PR)-Expression (99,3%), während lediglich 0,3% der Tumoren triple negativ sind (ER-, PR- und HER2-negativ).<sup>14</sup> Dementsprechend stützt sich die systemische Therapie des männlichen Brustkrebses vorwiegend auf eine endokrine Therapieoption mittels des standardmäßigen Einsatzes von Tamoxifen. Erstaunlicherweise ließ sich die Evidenz, mit der Aromatase Inhibitoren (AI) gegenüber Tamoxifen in der Behandlung postmenopausaler Frauen effektivere Endpunkte aufzeigten nicht auf das Therapie-Modell bei Männern übertragen. Weiterführende Untersuchungen deuten auf eine geringere Wirksamkeit von AI und ein wesentlich erhöhtes Gesamtüberleben bei männlichen Brustkrebspatienten nach adjuvanter Behandlung mit Tamoxifen verglichen mit einem AI hin und betonen damit die Notwendigkeit der geschlechtsspezifischen Auseinandersetzung im Hinblick auf therapeutische Ansätze.<sup>18</sup> Das vereinfachte Modell, nachdem Männer in der Regel endokrin empfindliche Tumore aufzeigen, die sich wie die postmenopausaler Frauen verhalten scheint nicht mehr gänzlich den Ansprüchen zielgerichteter Behandlungsansätze zu entsprechen.

Ebenso auffällig präsentieren sich die Unterschiede in der Ätiologie und insbesondere in der molekularbiologischen Betrachtung des männlichen und weiblichen Mammakarzinoms. Mutationen in den bekannten Tumorsuppressorgenen *BRCA1* und vor allem in *BRCA2* werden mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko in Verbindung gebracht. Im Gegensatz zum weiblichen Mammakarzinom ist das *BRCA2*-Gen bei männlichen Patienten wesentlich häufiger verändert als *BRCA1*. Trotz der rasant voranschreitenden Erforschung genetischer Prädisposition des familiären Brustkrebses bei Frauen, beschäftigten sich Studien bislang wenig mit der geschlechtsspezifischen Aufarbeitung prädisponierender Keimbahnmutationen des männlichen Pendant.

Mittlerweile besteht allgemeiner Konsens darüber, allen an Brustkrebs erkrankten Männern unabhängig ihrer jeweiligen familiären Vorbelastung, eine genetische Beratung und Testung auf Keimbahnkrebsprädisposition anzubieten.<sup>2,19,20</sup> Inwiefern diese Keimbahnanalysen jedoch zielgerecht eingesetzt werden können und in welchem Umfang potenzielle Gene über die Hochrisikogene *BRCA1/2* hinaus abgedeckt werden sollten ist weiterhin fraglich.

### **2.3 Pathophysiologie und nicht-genetische Risikofaktoren**

Bei der klinischen Bewertung des männlichen Mammakarzinoms sollten insbesondere die prädisponierenden Risikofaktoren berücksichtigt werden. Aufgrund der relativen Seltenheit der Erkrankung bei Männern und der oftmals geringen Stichprobengröße der Studien lassen sich Kausalitätsrückschlüsse nur erschwert und unter Vorbehalt ziehen. Dennoch konnten neben zugrundeliegender Keimbahnmutationen einige weitere nicht-genetische prädisponierende Faktoren entschlüsselt werden. Ebenso wie bei Frauen steigt die

Brustkrebsinzidenz bei Männern mit dem Alter stetig an. Neben dem fortgeschrittenen Alter zählt auch eine familiäre Brustkrebsvorbelastung zu den seither gesicherten geschlechtsneutralen Risikofaktoren.<sup>21</sup> Eine SEER-basierte Analyse aus den Jahren 2010 bis 2016 von Fang et al. zeigte darüber hinaus, dass männliche Brustkrebspatienten häufiger der schwarzen Bevölkerungsgruppe angehörten.<sup>6</sup> Weiterhin stehen endokrine Ursachen mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung des männlichen Mammakarzinoms in Verbindung. Das Klinefelter-Syndrom, eine seltene genetische Erkrankung, die durch den XXY-Genotyp gekennzeichnet ist und mit Gynäkomastie, Hodendysgenese und einem veränderten Gleichgewicht von Androgenen und Östrogenen einhergeht erhöht das Risiko, an Brustkrebs zu erkranken im Vergleich zu nicht betroffenen Männern um das 20 bis zu 50-fache.<sup>10,22</sup> Weitere Erkrankungen, die ein hormonelles Ungleichgewicht fördern sind beispielsweise Adipositas, Hodenerkrankungen wie Mumps-Orchitis, Hodenhochstand, Orchidektomie oder auch Leberfunktionsstörungen.<sup>23,22,24</sup> Auch eine übermäßige Hormonbelastung wie etwa durch die Hormontherapie bei Transsexuellen oder die hormonelle Behandlung des Prostatakarzinoms tragen zur Entstehung von Brustkrebs bei Männern bei.<sup>10</sup> Die aufgeführten endokrinen Risikobedingungen lassen jedoch lediglich Rückschlüsse auf die mögliche Ätiologie einer kleinen Teilgruppe der männlichen Brustkrebsfälle zu. Zusätzlich bislang uneinheitlich diskutierte Risikofaktoren stellen einerseits Lifestylefaktoren wie mangelnde Bewegung und exzessiver Alkoholkonsum dar, andererseits gelten übermäßige Strahlenexposition, sowie berufliche Exposition gegenüber elektromagnetischen Feldern, Hitze und polyzyklischen Kohlenwasserstoffen als mögliche Risikofaktoren für männlichen Brustkrebs.<sup>21,25</sup>

## **2.4 Das erblich bedingte Mammakarzinom**

Bösartige Tumorerkrankungen der Brust sind weltweit weit verbreitet und gehören in Deutschland weiterhin zu den häufigsten Todesursachen. Trotz der anhaltend großen Anzahl neu diagnostizierter Brustkrebserkrankungen gelten die meisten dieser Fälle als sporadisch, das heißt sie entwickeln sich infolge einer zufälligen Genschädigung durch die Kombination von Umwelt- und Lebensstilfaktoren und natürlichen Alterungsprozessen. Erblich bedingter Brustkrebs betrifft hingegen lediglich 5-10% aller Mammakarzinome bei Frauen und zeichnet sich durch die Weitergabe von einzelnen hochpenetranten Keimbahnmutationen innerhalb einer Familie aus.<sup>26,27</sup> Bei erblich bedingten Krebserkrankungen kommt es entlang des Stammbaums zu einem gehäuften Auftreten von Tumoren, die Diagnose wird häufig früher gestellt und für einige Familienmitglieder besteht ein deutlich höheres Risiko die jeweilige Tumorerkrankung auszuprägen.<sup>28</sup> Zu den verbreitetsten erblichen Krebsyndromen, die ein erhöhtes Risiko für Brustkrebs aufweisen, zählen neben dem hereditären Brust- und Eierstockkrebssyndrom (HBOC), das Li-Fraumeni-Syndrom, das Cowden-Syndrom, das

Peutz-Jeghers-Syndrom und der erbliche diffuse Magenkrebs.<sup>29</sup> Das Li-Fraumeni-Syndrom beschreibt eine komplexe erbliche Krebsprädisposition, die vorwiegend durch Keimbahnmutationen in dem für das p53-Protein codierende Tumorsuppressorgen *TP53* hervorgerufen wird und mit dem frühen Auftreten multipler Tumore einhergeht. Die betroffenen Patienten entwickeln dabei insbesondere Weichteilsarkome, Leukämien, Hirntumore, Tumore der Nebenniere, Knochensarkome und Brustkrebs<sup>30,31</sup> Mit einer geschätzten Prävalenz von 1:200.000 in der Bevölkerung stellt das Cowden-Syndrom aus der Gruppe der hamartomatösen Syndromen ein weiteres sehr seltenes Prädispositionssyndrom dar.<sup>32</sup> Hauptsächlich für die Entwicklung der Multisystemerkrankung sind hierbei pathogene Keimbahnmutationen in *PTEN*, die für unterschiedliche maligne Erkrankungen der Brust, Schilddrüse und des Endometriums prädisponieren, sowie gutartige hamartomatöse Gewebeveränderungen in mehreren Organsystemen auslösen.<sup>33</sup> Das Peutz-Jeghers-Syndrom hingegen wird durch pathogene Varianten im *STK11*-Gen (Serin/Threonin-Kinase-11) vererbt und ist durch die Kombination von mukokutaner Hyperpigmentierung, gastrointestinaler Polyposis und einem erhöhten Risiko für Mamma-, Ovarial-, Pankreas und kolorektale Karzinome gekennzeichnet.<sup>34</sup> Letztlich lässt sich das hereditäre diffuse Magenkarzinom auf pathogene Keimbahnvarianten in dem Tumorsuppressorgen *CDH1* zurückführen. Bei Mutationsträgern besteht neben einem erhöhten Risiko für diffusen Magenkrebs, auch eine deutlich gesteigerte Prädisposition gegenüber lobulären Mammakarzinomen.<sup>35</sup>

Die Vererbung der jeweilig prädisponierenden Risikogene folgt bei allen genannten erblichen Krebsyndromen übereinstimmend dem autosomal-dominanten Vererbungsmuster, bei dem das betroffene Allel auf einem der beiden paarig angelegten Autosomen für die Manifestation der Erkrankung ausreicht. Unabhängig vom Geschlecht besteht, dem Vererbungsmuster folgend, für erstgradig verwandte Nachkommen ein 50%iges Risiko, das veränderte Allel zu erben und ebenfalls Merkmalsträger zu sein. Sowohl Frauen als auch Männer können also entsprechende Keimbahnveränderungen erben und ebenso an ihre Nachkommen weitergeben.<sup>36</sup> In erster Linie wird das HBOC dabei durch pathogene Keimbahnvarianten in den autosomal-dominant vererbten DNA-Reparaturgenen *BRCA1* und *BRCA2* verursacht aber auch eine Vielzahl weiterer Gene sind darüber hinaus neuesten wissenschaftlichen Erkenntnissen zufolge in den pathogenetischen Prozess eingebunden. Ähnlich wie bei anderen erblichen Krebsyndromen weist das HBOC eine unvollständige Penetranz auf, nach der nicht jede pathogene Variante in einem Risikogen unmittelbar zur phänotypischen Ausprägung der Krebserkrankung bei seinem Träger führt. Es lassen sich in diesem Zusammenhang allgemein drei Kategorien von Keimbahnvarianten unterscheiden, die das Brustkrebsrisiko in unterschiedlichem Maße modifizieren können. Dementsprechend werden zunächst Gene mit hoher Penetranz als Hochrisikogene definiert, die mit einem relativen

Krebsrisiko von mehr als 5 assoziiert werden. Die Kommission Mamma der Arbeitsgemeinschaft gynäkologische Onkologie (AGO) fasst in dieser Rubrik die drei Risikogene *BRCA1/2* und *PALB2* mit einem hohen kumulativen Erkrankungsrisiko für Brustkrebs bei Frauen zusammen. Bei seltenen genetischen Risikovarianten mit moderater Penetranz liegt das relative Brustkrebsrisiko generell zwischen 2 und 5, während häufige Varianten mit geringer Penetranz als Niedrigrisikovarianten das Erkrankungsrisiko nur unwesentlich erhöhen und in der Regel ein relatives Risiko  $< 2$  aufweisen.<sup>37</sup> Aufgrund der gegenwärtig umstrittenen klinischen Bedeutung weiterer Risikogene, empfiehlt die AGO aktuell eine Untersuchung moderat penetranter Gene und Niedrigrisikovarianten nur im Rahmen von prospektiven Kohortenstudien wie der des DK FBREK Segregationsanalysen führen außerdem zu der Vermutung, dass ein Großteil der Erkrankungen auf einem oligo- oder polygenen Entstehungsmodell mit Mutationen in mehreren moderaten und niedrig penetranten Prädispositionsgenen beruht, die in Kombination ein deutlich größeres Risiko für die Bevölkerung darstellen.<sup>38</sup> Diese Hypothese wurde bislang sowohl für weiblichen, als auch für männlichen Brustkrebs durch internationale multizentrische Kooperationen im Rahmen von genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) bestätigt.<sup>39,40</sup>

## **2.5 Genetische Prädisposition: Brustkrebs-Risikogene**

Nicht zuletzt perspektivisch im Hinblick auf eventuelle Fortschritte in der Entwicklung von Früherkennungs- und Vorsorgeprogrammen sowie zielgerichteter Therapieoptionen, ist die Entschlüsselung zugrunde liegender Keimbahnmutationen von enormer Bedeutung und sollte geschlechtsspezifisch betrachtet werden. Die genetischen Risikofaktoren bei Männern an Brustkrebs zu erkranken, ähneln denen der Frauen, sind jedoch nicht vollkommen identisch. Vorgegangene genetische Erhebungen zeigen, dass *BRCA2*-Mutationen bei männlichen Patienten prädominieren und im Vergleich zu den an Brustkrebs erkrankten Frauen einen größeren Anteil des Mutationsspektrums der erblich bedingten Mammakarzinome ausmachen. Dem gegenüberstehend sind *BRCA1*-assoziierte Tumore unterrepräsentiert und weisen damit auf erhebliche Unterschiede in der geschlechtsspezifischen genetischen Ätiologie von Brustkrebs hin. Die Sequenzierung von weiteren Kandidatengenen, die an *BRCA1/2*-assoziierten DNA-Reparaturwegen beteiligt sind wie *PALB2*, *CHEK2* und *ATM* hat dazu beigetragen, das Verständnis über die bekannten *BRCA1/2* Gene hinaus zu erweitern.

Mit der Weiterentwicklung von Next-Generation-Sequencing(NGS)-Technologien und insbesondere durch den Einsatz von Multigenpaneltestungen hat sich während der vergangenen Jahre die Möglichkeit ergeben pathogene Varianten in einer Vielzahl von Genen zu identifizieren, die mit einem erhöhten Risiko für Brustkrebs assoziiert sind.<sup>41</sup>

Die Klassifizierung der Varianten basiert auf Kriterien des American college of medical genetics and genomics (ACMG)<sup>42</sup> Die detektierten Varianten werden entsprechend der

Empfehlungen der International Agency for Research on Cancer (IARC) in fünf Gruppen eingeteilt und entlang ihrer Sequenzfunktionalität bewertet.<sup>43</sup> Klasse 1 entspricht dabei der benignen Normvariante und präsentiert sich ohne klinische Relevanz, während Klasse 2-Varianten („Likely benign“) als wahrscheinliche Normvarianten gelten. Varianten unklarer klinischer Relevanz (VUS) werden der Klasse 3 zugeordnet und stellen vor dem Hintergrund der enormen Zunahme der durch NGS-Verfahren generierten genomischen Daten die bislang größte Herausforderung in der Interpretation von Varianten dar. Genvarianten der Klasse 4 gelten als wahrscheinlich pathogen und werden mit den der Klasse 5 zugeordneten Varianten, mit einem relevanten Funktionsverlust als pathogene Varianten zusammengefasst.

### **2.5.1. BRCA2 und BRCA1**

Die am häufigsten in der Pathogenese des erblichen Brustkrebses involvierten Gene sind die beiden bekannten autosomal-dominant vererbten Hochrisikogene *BRCA1* und *BRCA2*. Es handelt sich dabei um die beiden ersten 1994 und 1995 identifizierten Gene, die mit dem HBOC in Verbindung gebracht werden konnten. Sie kodieren für Proteine, die am DNA-Reparaturmechanismus der homologen Rekombination beteiligt sind und führen im Falle einer Mutation zu genomischer Instabilität und fördern die Tumorentstehung. Vor allem pathogene Varianten in dem auf Chromosom 13q22 lokalisierten *BRCA2*-Gen gelten seither als auffälligster genetischer Risikofaktor für die Entstehung des männlichen Mammakarzinoms. Abhängig von den Merkmalen der jeweilig untersuchten Population variiert die Häufigkeit pathogener *BRCA2* Keimbahnvarianten zwischen 10-16% der eingeschlossenen männlichen Brustkrebspatienten.<sup>10,44,23,45,46</sup> Eine aktuelle repräsentative Studie von Pritzlaff et al.<sup>47</sup> konnte beispielsweise in 11% der untersuchten Fälle (53/480) *BRCA2*-Keimbahnmutationen bei männlichen Brustkrebspatienten nachweisen. Weitere multizentrische Untersuchungen aus Italien und Spanien berichteten über diskret höhere Mutationsprävalenzen des betreffenden Hochrisikogens mit entsprechenden *BRCA2*-Positivitätsraten von 12,2% (46/382) nach Ottini et al.<sup>48</sup> und 15% (47/312) zufolge de Juan et al.<sup>49</sup>. Während sich bei Frauen das kumulative Brustkrebsrisiko bis zum Alter von 80 Jahren aktuellen Schätzungen zufolge auf 72% für *BRCA1* und 69% für *BRCA2* Trägerinnen verglichen mit 13% der weiblichen Gesamtbevölkerung beläuft<sup>28</sup>, ist insbesondere das Risiko für männliche Träger pathogener Varianten in *BRCA2* erhöht. Das geschätzte Lebenszeitrisiko Brustkrebs zu entwickeln liegt bei Männern mit Keimbahnveränderungen in *BRCA2* bei 5-12%, verglichen mit 0,1% in der männlichen Gesamtbevölkerung.<sup>18,48,15,50</sup> Pathogene Keimbahnmutationen in *BRCA1* hingegen lassen sich wesentlich seltener in lediglich 0-5% in männlichen Brustkrebspatienten feststellen und ihre tatsächliche Bedeutung, inwieweit sie das Brustkrebsrisiko bei Männern beeinflussen, ist weiterhin

umstritten.<sup>44,47,51</sup> *BRCA1*-assoziierte Brustkrebserkrankungen bei Frauen zeigen typischerweise eine Tumorsubtypisierung mit einem charakteristischen triple-negativen Phänotypmuster (TNBC), das durch das Fehlen von ER, PR und Her2-Rezeptoren definiert ist.<sup>52</sup> Im Gegensatz dazu wurde bei Männern bislang keine phänotypische Korrelation zwischen pathogenen *BRCA1* Varianten und dem Auftreten eines TNBC beobachtet.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass populationsbasierte polygene Risikoscores (PRS), die jeweils für Brust- bzw. Prostatakrebs entwickelt wurden, ebenfalls bei männlichen Trägern pathogener *BRCA1/2*-Varianten mit dem entsprechenden Krebsrisiko assoziiert sind.<sup>53,40</sup> Darüber hinaus verdeutlichen die Ergebnisse von Graff et al., dass polygenetische Risikoprofile über pleiotrope Effekte ebenso krebsübergreifende Relevanz haben können.<sup>54</sup> PRS kombinieren die Auswirkungen mehrerer häufiger Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs), die in genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) mit Brust- bzw. Prostatakrebs in Verbindung gebracht werden und zielen darauf ab, personalisierte Krebsrisiken zu ermitteln. Einzelne SNPs sind in diesem Zusammenhang jeweils nur mit einem niedrigen individuellen Risiko assoziiert. Allerdings können sowohl ungünstige als auch günstige Kombinationen dieser Varianten auftreten, die das Gesamtrisiko erheblich beeinflussen. Eine ungünstige Kombination, die beispielsweise im oberen Perzentil (obersten 5%) der Risikoverteilung liegt, kann das Erkrankungsrisiko deutlich erhöhen. Im Gegensatz dazu kann eine günstige Kombination, die im unteren Perzentil (untersten 5%) liegt, das Risiko signifikant reduzieren. Anhand von Studien des Consortium of Investigators of Modifiers of *BRCA1/2* (CIMBA) konnte gezeigt werden, dass kombinierte SNP-Effekte das Erkrankungsrisiko bei männlichen Trägern pathogener *BRCA1/2* Varianten in ähnlicher Weise beeinflussen wie das beschriebene Modell zur Stratifizierung des Brust- und Eierstockkrebsrisikos bei weiblichen Variantenträgerinnen.<sup>53</sup> Barnes et al. wiesen in ihrer auf dem PRS basierenden Risikoanalyse ein durchschnittliches Lebenszeitrisiko für männlichen Brustkrebs von 12% für *BRCA2* Variantenträger nach, das abhängig vom PRS zwischen 8% (5. Perzentil) und 18% (95. Perzentil) variiert.<sup>53</sup>

Zusätzlich weisen zahlreiche Studien darauf hin, dass genomische *BRCA*-Veränderungen, vordergründig pathogene *BRCA2*-Varianten, bei Männern neben einem erhöhten Brustkrebsrisiko auch insbesondere das Risiko für Prostatakarzinome, sowie für maligne Melanome und Pankreaskarzinome erhöhen.<sup>55,56</sup>

Von besonderer Bedeutung ist der Nachweis von *BRCA*-Mutationen im Zusammenhang mit ihren einhergehenden klinischen Auswirkungen. Insbesondere weibliche Mutationsträgerinnen profitieren der aktuellen Leitlinie BreastVersion 2021.1D der Kommission Mamma der AGO zufolge ab dem 25. Lebensjahr von einem multimodalen intensivierten Früherkennungsprogramm. Die aktuelle Leitlinie empfiehlt darüber hinaus den therapeutischen Einsatz von Poly-(ADP-ribose) Polymerasen (PARP) Inhibitoren beim

metastasierten *BRCA1/2*-assoziierten weiblichen Mammakarzinom. Für Männern mit *BRCA1/2* Mutationen hingegen existiert bislang kein spezifisches Früherkennungsprogramm und die Empfehlungen beruhen in erster Linie auf den Prinzipien der Selbstuntersuchung und des abwartenden Verhaltens im Rahmen der Brustkrebsprävention.

### **2.5.2. PALB2**

*PALB2* ist als "Partner and localizer of *BRCA2*" ebenfalls entscheidend an der homologen Reparatur (HR) von DNA-Doppelstrangbrüchen beteiligt. Der Tumorsuppressor dient dabei hauptsächlich der Vermittlung des Reparatursignals und fungiert als Bindungsmolekül des *BRCA* Komplexes mit *BRCA1* und *BRCA2* und erleichtert die Rekrutierung und Stabilisierung von *RAD51*-Proteinen an die DNA.<sup>57,58</sup> Während monoallelische Mutationen im Gen für *PALB2* mit einer erhöhten Prädisposition für Brust-, Pankreas und Eierstockkrebs assoziiert sind, führen biallelische Mutationen in *PALB2*, ebenso wie in *BRCA1/2* zu einem Subtyp der Fanconi-Anämie.<sup>59</sup> Neben *BRCA1* und *BRCA2* gehört auch *PALB2* zur Gruppe der hoch penetranten Risikogene und geht im Falle einer entsprechenden pathogenen Variante mit einem relevant erhöhten kumulativen Erkrankungsrisiko für Brustkrebs bei Frauen einher.<sup>60</sup> Trotz der engen funktionellen Verknüpfung zwischen den Proteinen, für die *BRCA2* und *PALB2* kodieren, ist die Erhöhung des Brustkrebsrisikos monoallelischer *PALB2* Mutationsträgerinnen jedoch geringer als jenes bei Trägerinnen monoallelischer *BRCA2* Mutationen. Rahman et al. konnten in ihrer 2007 veröffentlichten Studie *PALB2* erstmalig als Risikogen in der Brustkrebsentstehung definieren und schätzten, dass *PALB2* Mutationen mit einem etwa zweifach höheren Risiko für weiblichen Brustkrebs assoziiert sind.<sup>61</sup> Aktuellere Studien berichten von einem etwa 5-10-fach erhöhten Brustkrebsrisiko bei Frauen mit zugrundeliegender Keimbahnmutationen in *PALB2*.<sup>59,62,63,64</sup> Auch in männlichen Brustkrebskohorten konnten bislang zahlreiche pathogene Genveränderungen in *PALB2* nachgewiesen werden. Die Studienergebnisse bestätigen überwiegend übereinstimmend, dass pathogene *PALB2*-Varianten bei beiden Geschlechtern an der Modifizierung des Brustkrebsrisikos beteiligt sind.<sup>59,65,66,67</sup> In welchem Ausmaß allerdings Mutationsprävalenzen und genspezifische Risikoschätzungen bei Männern und Frauen übereinstimmen und inwiefern der Nachweis pathogener Varianten valide in die klinische Entscheidungsfindung miteinbezogen kann, ist weiterhin diskussionsbedürftig. Den Studienergebnissen von Rizzolo et al. zufolge stellt *PALB2* das am häufigsten mutierten Gen in männlichen *BRCA1/2*-negativen Brustkrebspatienten dar (1,2%) und geht mit einem etwa 9-17-fach erhöhten Mammakarzinomrisiko einher.<sup>68</sup> Ebenso konnten Pritzlaff et al. in Multigenanalysen in 0,8% der 621 untersuchten Fälle *PALB2* Mutationen nachweisen und zeigen, dass entsprechende Keimbahnvarianten das Risiko für männlichen Brustkrebs signifikant erhöhen (OR: 6,6; p = 0.01).<sup>47</sup> Weitere Keimbahnanalysen in 524 Familien mit

pathogenen *PALB2*-Mutationen von Yang et al. ergaben ein geschätztes relatives Brustkrebsrisiko von 7,34 für männliche Mutationsträger ( $p = 0.026$ ).<sup>69</sup> Im Gegensatz zu den bisher aufgeführten signifikanten Assoziationen konnten kleinere Studienkohorten den Zusammenhang zwischen pathogenen *PALB2*-Keimbahnmutationen und männlichem Brustkrebs teilweise nicht bestätigen. In einer Serie von 102 analysierten männlichen Brustkrebsfällen konnten Fostira et al. keine pathogenen *PALB2* Varianten nachweisen und eine Beteiligung anderer Risikogene als *BRCA2* in der Entstehung von Brustkrebs bei Männern in ihrer Studienkohorte widerlegen.<sup>44</sup> Darüber hinaus ist weiterhin fraglich, ob betroffene *PALB2*-Mutationsträgerinnen analog zu der Behandlungsempfehlung des metastasierten *BRCA*-assoziierten Mammakarzinoms von einer spezifischen PARP-Inhibitor-Therapie profitieren könnten.

### **2.5.3. CHEK2**

Bei der Zellzyklus Checkpoint-Kinase 2 (CHK2) handelt es sich um eine Serin/ Threonin-Kinase, die durch das *CHEK2*-Gen kodiert wird und als Reaktion auf DNA-Schäden aktiviert wird, um die Reparatur an der beschädigten DNA-Stelle zu initiieren.<sup>70,71</sup> Durch die Kontrolle wichtiger Zellzyklusregulatoren wird im Falle einer Beschädigung das Fortschreiten des Zellzyklus unterbrochen. CHK2 wird dabei klassischerweise in der Reaktion auf Doppelstrangbrüche als Effektor kinase in der ATM-CHK-p53-Kaskade dargestellt.<sup>72</sup> Die aktivierte CHK2 führt letztlich über ihre Fähigkeit der Phosphorylierung von p53, Cdc25c, BRCA1 und BRCA2 und zum Stillstand des Zellzyklus und zur Apoptose.<sup>70</sup> Der Verlust der Kinasefunktion und eine entsprechend gestörte Funktion der Kontrollpunkte können folglich mit genomischer Instabilität einhergehen und eine Tumorgenese begünstigen.<sup>73</sup> Vererbte Keimbahnmutationen in *CHEK2* wurden ursprünglich mit dem Li-Fraumeni-Syndrom-Typ-2 assoziiert, einem seltenen Krebsprädispositionssyndrom, das in der Regel mit Mutationen in *TP53* verknüpft ist. Kürzliche Untersuchungen zeigten jedoch klare Unterschiede zwischen den klinischen Merkmalen von *TP53*- und *CHEK2*-Trägern und konnten diesen initial beschriebenen Zusammenhang widerlegen.<sup>74</sup>

Seither wurden pathogene Keimbahnvarianten mit verschiedenen Krebsarten in Verbindung gebracht werden. So erhöht beispielsweise die weltweit am häufigsten untersuchte Deletionsmutation im *CHEK2* Gen c.1100delC, die für ein verkürztes CHK2 Protein mit reduzierter Kinaseaktivität kodiert, das Risiko Brust- und Prostatakrebs zu entwickeln.<sup>71</sup> Dennoch lässt die Detektionshäufigkeit und der mit der c.1100delC Variante verknüpften Gründereffekt („founder effect“) Zweifel an der Bedeutung von *CHEK2*-Mutationen als Risikofaktor aufkommen. In einer Studie des CHEK2 Breast Cancer Consortiums wurde festgestellt, dass eine entsprechend trunkierende c.1100delC Mutation bei Frauen zu einem 2-3-fach erhöhtem Brustkrebsrisiko führt und das Risiko für männliche Variantenträger

verzehnfacht.<sup>75,76</sup> Vor allem für weibliche Mutationsträgerinnen ist der Zusammenhang zwischen pathogenen Keimbahnvarianten in *CHEK2* und einem erhöhten Risiko für Mammakarzinome mittlerweile weitgehend gesichert und *CHEK2* konnte sich als moderat penetrantes Brustkrebsrisikogen in der genetischen Testung etablieren. *CHEK2* c.1100delC Trägerinnen haben ein mehr als doppelt so hohes Risiko, an Brustkrebs zu erkranken, insbesondere an ER-positiven Tumoren.<sup>77</sup> Das Lebenszeitrisiko beläuft sich dabei schätzungsweise auf 20% - 25% und korreliert mit der jeweiligen familiären Konstellation.<sup>78,79</sup> In Screeninganalysen des DK FBREK auf potenziell für Brustkrebs prädisponierende Keimbahnvarianten in 5589 *BRCA1/2*-negativen weiblichen Mammakarzinom Patientinnen konnte die höchste Mutationsprävalenz im *CHEK2*-Gen (2,5%, OR:2,93) nachgewiesen werden.<sup>62</sup> Weitere Untersuchungen konnten vergleichbare Häufigkeiten protein-trunkierender *CHEK2*-Varianten in tschechischen Hochrisikofamilien darstellen (2,39%)<sup>80</sup>. Trotzdem ist unser Verständnis darüber, in welchem Ausmaß Keimbahnmutationen in *CHEK2* an der Brustkrebsprädisposition beteiligt sind und welche klinischen Konsequenzen daraus resultieren, weiterhin unvollständig. Die niedrige Prävalenz, sowie die inkomplette Segregation der c.1100delC-Mutation wiesen in einer 2004 veröffentlichten multizentrischen Studie des DK FBREK auf eine begrenzte Relevanz in deutschen Brustkrebsfamilien hin.<sup>81</sup> Ihren Untersuchungen zufolge handele es sich bei einer Beteiligung von *CHEK2*-Mutationen an der Entstehung von erblichem Brustkrebs vermutlich eher um ein polygenes Risikomodel. Bei männlichem Brustkrebs hingegen zeigen sich weiterhin widersprüchliche Ergebnisse und die Beteiligung von *CHEK2*-Keimbahnvarianten in der Entstehung des Mammakarzinoms des Mannes scheint noch unklarer als bei dem weitaus besser untersuchten weiblichen Pendant. Infolge der ersten bereits erwähnten auffälligen Untersuchungsergebnisse, nach derer die Autoren des *CHEK2*-Consortiums 2002 für männliche *CHEK2*-c.1100delC Mutationsträger ein zehnfach erhöhtes Brustkrebsrisiko ermittelten<sup>76</sup>, konnten nachfolgende Studien diesen starken Zusammenhang nicht vollständig bestätigen. Zusammenfassend deuteten die Ergebnisse darauf hin, dass das Risiko für männlichen Brustkrebs bei Trägern dieser Variante wahrscheinlich deutlich geringer ist.<sup>82,83,84</sup> Pritzlaff et al. konnten pathogene *CHEK2* Varianten in 4,1% der Fälle nachweisen und schlossen aus ihren 2016 veröffentlichten Multigenpanel-Untersuchungen auf ein 3,8-fach erhöhtes Risiko für männlichen Brustkrebs bei zugrundeliegender *CHEK2*-Keimbahnmutation. Die entsprechenden Konfidenzintervalle reichten dabei von 2,1 bis 6,8 und verdeutlichten die Rolle von *CHEK2* als moderates Risikogen für männlichen Brustkrebs.<sup>47</sup> Demgegenüber lieferte die Auswertung einer multizentrischen italienischen Genpanel-Studie nach Rizollo et al. (2019) konträre Untersuchungsergebnisse, nach denen *CHEK2* und insbesondere die *CHEK2* c.1100delC-Variante bei der genetischen Prädisposition für männlichen Brustkrebs in der untersuchten Population nicht relevant sind.<sup>68</sup> Pathogene *CHEK2*-Varianten wurden in

dieser Kohorte lediglich in 0,4% (2/503) der männlichen Brustkrebsfälle nachgewiesen und lagen damit deutlich unter der bisher ermittelten Detektionshäufigkeit zwischen 1-9% anderer untersuchter Reihen männlicher Brustkrebspatienten.<sup>44,47,82,83,85</sup> Eine kürzlich durchgeführte Metaanalyse konnte letztlich zeigen, dass die pathogene Keimbahnveränderung in *CHEK2* c.1100delC tatsächlich das Brustkrebsrisiko bei Männern signifikant erhöhen, jedoch in geringerem Maße als ursprünglich angenommen (OR = 3,13, 95% CI 1,94-5,07).<sup>86</sup>

#### **2.5.4. ATM**

Das *ATM* Gen (Ataxia teleangiectasia mutated) befindet sich auf Chromosom 11 an Genlokus q22.3 und kodiert für die gleichnamige Proteinkinase, welche maßgeblich in Prozesse der DNA-Reparatur und Zellzyklus-Kontrolle eingebunden ist. *ATM* gehört zur Familie der Phosphatidylinositol-3-Kinase- verwandten Kinasen (PIKK) und ist der primäre Vermittler von DSB-induzierten HR-verknüpften Signalübertragungen.<sup>87</sup> Die Serin-Threonin-Kinase phosphoryliert und fungiert entlang ihrer Kaskadenposition als Regulator für eine Vielzahl nachgeschalteter Proteine, darunter beispielsweise auch die Tumorsuppressorproteine p53 und BRCA1, sowie die Checkpoint-Kinase *CHK2*.<sup>88,89</sup>

Klassischerweise werden biallelische *ATM* Mutationen mit der autosomal-rezessiv vererbten Erkrankung Ataxia teleangiectasia (AT), auch bekannt als Louis-Bar-Syndrom in Verbindung gebracht.<sup>90</sup> Die Erkrankung ist namensgebend durch eine chronisch fortschreitende zerebelläre Ataxie und Teleangiektasien der Bindehäute charakterisiert und zeichnet sich weiterhin durch Immundefizienz, gesteigerte Strahlenempfindlichkeit und ein erhöhtes Risiko für maligne Tumore aus.<sup>91</sup>

Heterozygote Anlageträger einer *ATM*-Mutation hingegen präsentieren sich phänotypisch unauffällig, werden allerdings mit einem erhöhten Risiko für verschiedene Tumorerkrankungen, insbesondere Brustkrebs assoziiert.<sup>92</sup> Das geschätzte Risiko ein Mammakarzinom zu entwickeln erhöht sich bei Frauen mit entsprechend zugrundeliegender *ATM*-Keimbahnmutation um den Faktor 2-3 verglichen mit Frauen ohne pathogene *ATM* Varianten und entspricht einem angenommenen Lebenszeitrisiko von in etwa 25-30%<sup>60,92,93,94</sup> Genauere Untersuchungen des Mutationsspektrums stellten dabei eine häufige, als c.7271T>G bekannte, pathogene Variante heraus, die mit einem deutlich höheren weiblichen Brustkrebsrisiko verbunden ist als andere pathogene *ATM*-Mutationen.<sup>95,96</sup>

Darüber hinaus prädisponieren pathogene *ATM*-Genmutationen mit einem moderat erhöhten Risiko für weitere Krebserkrankungen wie Pankreas- Magen- und Prostatakrebs.<sup>95,97</sup> Ebenso konnte einer kürzlich veröffentlichten Studie zufolge für männliche Anlageträger ein ca. 1,72-fach (95% CI: 1,08-2,75) erhöhtes Risiko ermittelt werden, an einem Mammakarzinom zu erkranken.<sup>23,95</sup> Dennoch ist die Datenlage bezüglich der Beteiligung pathogener *ATM*-Mutationen bei männlichen Trägern und ihre spezifische Prädisposition gegenüber

Brustkrebs äußerst begrenzt und weiterhin umstritten. Pritzlaff et al. konnten bei umfassenden Genpanelanalysen unter 421 europäischen männlichen Brustkrebspatienten keine signifikante Assoziation von genetischen Veränderungen in *ATM* und dem Auftreten von Brustkrebs bei Männern feststellen.<sup>47</sup> Analog dazu identifizierten Rizollo et al. in lediglich 0,6% (3/503) der untersuchten *BRCA1/2*-negativen männlichen Brustkrebsfälle pathogene *ATM*-Mutationen. Ihre Studienergebnisse ergaben ebenfalls keinen signifikanten Zusammenhang zwischen pathogenen *ATM*-Varianten und erhöhtem Brustkrebsrisiko unter Männern.<sup>68</sup> Bislang fehlt es auch hier weiterhin an ausreichender Evidenz, inwiefern der Zusammenhang zwischen *ATM*-Genmutationen und der Wirksamkeit therapeutischer Strategien wie der Einsatz von PARP Inhibitoren gesichert werden kann.<sup>97,98</sup>

## 2.6 Grundlagen der Karzinogenese und Zellzykluskontrolle

Die Karzinogenese beschreibt die Entstehung maligner Tumoren durch die Entartung und Umwandlung normaler Körperzellen in Tumorzellen. Beruhend auf Funktionsverlusten von Genen, deren Genprodukte wichtige Steuerungsfunktionen im Zellwachstum und in der Zelldifferenzierung und damit der Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität übernehmen, lassen sich die beiden wichtigsten Gengruppen Protoonkogene und Tumorsuppressorgene unterscheiden. Protoonkogene codieren für eine Reihe verschiedener Proteine, die während Phasen des physiologischen, regenerativen und adaptiven Wachstums exprimiert werden und positiv regulierend auf die Proliferation und Differenzierung von Tumorzellen wirken. Diese Proteingruppe fasst beispielsweise Wachstumsfaktoren, Signaltransduktoren, Proteinkinasen und Transkriptionsfaktoren zusammen. Mutationen in Protoonkogenen bewirken über ihre Aktivierung zu Onkogenen eine dysregulierte, gesteigerte Proliferation (Gain-of-Function-Mutation).<sup>99</sup> Während eine einzige Mutation ausreicht, um ein Onkogen zu aktivieren, erfordert die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen genetische Veränderungen in beiden Allelen. Bei hereditären Formen stammt ein mutiertes rezessives Allel bereits aus der elterlichen Vererbung über die Keimbahn. Entsprechend der Two-Hit-Modell-Hypothese nach Knudson führt schließlich erst eine Inaktivierung des verbleibenden Allels durch eine somatische Mutation zum vollständigen Verlust der Genfunktion (Loss-of-Heterozygosity, LOH) und zur Aufhebung der proliferationshemmenden Wirkung von Tumorsuppressoren.<sup>100,101</sup> Tumorsuppressoren unterdrücken in ihrer physiologischen Funktion ein ungehemmtes Zellwachstum, indem sie als Kontrollpunkte im Zellzyklus, beim Übergang zur Apoptose oder bei der DNA-Reparatur wirken.<sup>101</sup> Der Zellzyklus stellt ein vereinfachtes Modell zur Beschreibung der periodischen Abfolge der einzelnen Phasen zwischen zwei Zellteilungen dar.<sup>102</sup>

Im Wesentlichen lassen sich die M-Phase (Mitosephase), S-Phase (Synthesephase) und die beiden Zwischenphasen G1 und G2 unterscheiden. Über ein komplexes Netzwerk

regulatorischer Elemente erfolgt zeitlich voneinander getrennt die genaue Vervielfältigung der DNA während der S-Phase und die anschließende Segregation der replizierten DNA während der Mitosephase. Die physiologische Abfolge der Zellzyklusphasen durch Phosphorylierung von Proteinen wird durch sogenannte zyklinabhängige Kinasen (CDK) gesteuert. An speziell eingelagerten Zellzyklus-Kontrollpunkten, den sogenannten Checkpoints, werden Phasenübergänge reguliert, um die Integrität des Erbgutes zu schützen und eine ungehemmte Zellteilung zu verhindern.<sup>103</sup> Das p53-Protein beispielsweise verhindert als „Wächter des Erbguts“, dass Zellen mit Erbgutschädigungen in die S-Phase des Zellzyklus eintreten und reguliert im Falle eines irreparablen Defekts die Einleitung der Apoptose.<sup>104</sup> Mutationsereignisse einzelner Zellen sind häufig und werden in der Regel zuverlässig von körpereigenen DNA-Reparaturmechanismen erkannt und behoben oder gehen alternativ in den programmierten Zelltod über. In seltenen Fällen greifen diese reaktiven Mechanismen jedoch nicht und die DNA der betroffenen Zelle wird dauerhaft verändert. Insgesamt folgt der Prozess der Karzinogenese grob einer Mehrschritthypothese, nach der sich die Phasen der Initiation, Promotion und Progression unterscheiden lassen. Infolge einer initialen irreparablen Genomschädigung kommt es im Rahmen der Promotion zur Weitergabe des Defekts und zur klonalen Vermehrung der veränderten prä-malignen Zelle. Weitere Mutationen und Funktionsstörungen von Reparaturgenen, Tumorsuppressorgenen und Apoptose regulierenden Genen fördern das Zellwachstum und führen letztlich zur malignen Transformation.<sup>105</sup> Während der Phase der Progression beginnt die unkontrollierte Proliferation der neoplastischen Zellreihe, die Zellen entdifferenzieren sich zunehmend und bilden einen Primärtumor. Schließlich entstehen als Ergebnis einer weiteren Akkumulation von genetischen Veränderungen in den Zellen neue Klone mit bösartiger Invasions- und Metastasierungsfähigkeit.<sup>106</sup>

### **2.6.1. Doppelstrangbrüche und DNA-Reparaturmechanismen**

Unter Doppelstrangbrüchen (DSB) versteht man im Allgemeinen die Durchtrennung der beiden Nukleotidstränge der DNA. Sie gehören zu den wohl auswirkungsreichsten Formen von DNA-Schädigungen. Ätiologisch lassen sich DSB in der DNA über unterschiedliche Wege erklären. Sie entstehen beispielweise durch die Exposition gegenüber exogenen Einflüssen wie ionisierender Strahlung oder bestimmten chemischen Mutagenen sowie durch endogene Prozesse während der DNA-Replikation.<sup>107</sup> Abgesehen von diesen nicht intendierten Prozessen, werden DSB während der ersten meiotischen Teilung in Keimzellen absichtlich herbeigeführt, um eine korrekte Chromosomentrennung zu bewirken. Infolge der gezielten und streng regulierten Initiierung von DSB, setzt der Mechanismus der homologen Rekombination den damit verbundenen Austausch von DNA-Abschnitten zwischen den

Homologen fort und führt zur Bildung von Gameten mit Allelkombinationen, die sich vom Aufbau der elterlichen Keimbahn unterscheiden.<sup>108</sup>

Werden unbeabsichtigt herbeigeführte Doppelstrangbrüche nicht repariert, wird eine Form des programmierten Zelltods eingeleitet und die Zellen werden apoptotisch, während eine fehlerhafte Behebung der entsprechenden DNA-Schädigung folglich zu genomischer Instabilität beiträgt und die Zellentartung fördert.<sup>109</sup> Um die Stabilität des Genoms zu schützen und DSB zu beheben, stehen vordergründig zwei Reparaturmechanismen zur Verfügung. Einerseits handelt es sich um die nicht-homologe Endverbindung (NHEJ), die während des gesamten Zellzyklus aktiv ist, andererseits wird das Prinzip der homologen Reparatur (HR) genutzt, das auf die Zellzyklusphasen S und G2 beschränkt ist und das Vorhandensein eines Schwesterchromatids als Vorlage voraussetzt.<sup>110</sup>

Bei der NHEJ erfolgt die Reparatur der DNA-Läsion durch die direkte Verknüpfung von zwei DNA-Fragmenten. Nach der Erkennung der durchtrennten und somit freien DNA-Endstücke durch das Ku70/Ku80 Heterodimer wird der NHEJ-Komplex aufgebaut und an der Bruchstelle stabilisiert. Letztlich erfolgt die Ligation der Endstücke, indem die an den Komplex gebundene DNA-Ligase die Fragmente zusammenfügt.<sup>109</sup> Da diese Form der Reparatur keine fehlerfreie Matrize erfordert, ist eine Behebung des DSB zwar an jedem beliebigen Punkt des Zellzyklus möglich, sie gilt jedoch insbesondere als fehleranfällig.

Bei der homologen Rekombination hingegen wird der Defekt anhand des komplementären Strangs im Schwesterchromatid behoben und zeichnet sich durch den fehlerfreien Austausch von homologen Nukleotidsequenzen aus.<sup>111</sup> Bei der Reparatur wird zunächst bei beiden Strängen ein 3'-Überhang generiert und der defekte und der als Matrize dienende DNA-Abschnitt lagern sich über einen sequenzähnlichen Bereich aneinander. Es folgt im nächsten entscheidenden Schritt die Invasion von 3'-einzelsträngiger DNA in das homologe DNA-Molekül und damit die homologe Bindung eines Strangabschnitts an den auseinandergewichenen Vorlagenstrang mittels des RAD51-Proteins.<sup>112,113,114</sup> Schließlich wird der 3'-Überhang durch die Bindung von DNA-Polymerasen entsprechend der Vorlagesequenz verlängert.<sup>114</sup> In den komplexen mehrstufigen Prozess der HR-Reparatur (HRR) sind neben den umfassend untersuchten Hauptvertretern BRCA1 und BRCA2 eine Vielzahl weiterer proteinärer Vermittler eingebunden, die sich grob in Sensoren von DNA-Schädigungen und Effektoren des Pathways einteilen lassen.<sup>115</sup> Zunächst werden DSB vom MRE11-RAD50-NBN (MRN)-Komplex erkannt, der neben seiner sensorischen Funktion die beiden regulatorischen und oft gemeinschaftlich agierenden Phosphatidylinositol-3-kinase-like Kinasen (PIKK) ATR und ATM aktiviert. Die Aktivierung von ATM führt entlang der Kaskade zur Phosphorylierung einer Reihe nachgeschalteter Substrate einschließlich BRCA1, CHK2 und p53, die unter anderem das Anhalten des Zellzyklus und weitere nachfolgende Prozesse vermitteln.<sup>88,87</sup> Proteine der Rad51-Familie übernehmen schließlich

bei der HRR die zentrale Steuerungsaufgabe der interagierenden Proteine.<sup>111</sup> Von besonderer Bedeutung ist dabei exemplarisch die Bindung des Tumorsuppressors BRCA2 an RAD51. Unter anderem vermittelt BRCA2 den geregelten Einbau von RAD51 und dessen korrekte Steuerung und verhindert, dass DSB über andere fehlerbehaftete Reparaturmechanismen korrigiert werden.<sup>113,116</sup> Darüber hinaus ist das Zusammenspiel weiterer Akteure, darunter der BRCA1-PALB2-BRCA2-Komplex, daran beteiligt, RAD51 auf den entsprechenden DNA-Einzelstrang zu laden und zu stabilisieren, um die Reparatursynthese einzuleiten.<sup>58,117</sup>

## **2.6.2. Fehlerhafte homologe Rekombinationsreparatur und klinische Konsequenzen**

Ist der Signalweg der homologen Rekombination gestört, können erzeugte DSB nicht mehr zuverlässig korrigiert werden und es kommt zu einer Anhäufung von DNA-Schäden und vermehrter genomischer Instabilität. Umfassende Krebskohorten belegen, dass eine HR-Fehlfunktion am häufigsten bei Brust- und Eierstockkrebs, gefolgt von Pankreas- und Prostatakrebs auftritt und hauptsächlich auf die LOH basierte biallelische Inaktivierung der HRR-relevanten Gene *BRCA1*, *BRCA2*, *RAD51C* oder *PALB2* zurückzuführen ist.<sup>118,119</sup> Das Verständnis der an der HR beteiligten biologischen Prozesse legt nahe, dass eine gestörte HR-Reparatur eine der grundlegenden Ursachen für genomische Instabilität und die damit einhergehende Tumorentstehung bei Patienten ist.<sup>120</sup> Bislang stellt der *BRCA1/2* Keimbahn-Mutationsstatus in der Klinik des Mammakarzinoms den wichtigsten genetischen Biomarker für eine fehlerhafte Funktion der homologen Rekombination dar.<sup>118</sup> Dieser gilt unter anderem auch als Indikator für die Empfindlichkeit gegenüber gezielten Therapien mit Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) Inhibitoren und bildet damit die Grundlage eines neuen Behandlungsansatzes.<sup>121,122</sup> Poly(ADP-ribose)-Polymerasen (PARPs) fassen eine Gruppe von Enzymen zusammen, die als Reaktion auf einzelsträngige DNA-Brüche eine Schlüsselrolle bei der Basenexzisionsreparatur (BER) einnehmen.<sup>122</sup> Bei *BRCA*-mutierten Krebszellen mit abnormaler HR-Funktion ist der verbleibende Mechanismus der BER für das Überleben der Zelle von besonderer Bedeutung. Durch die gezielte Blockierung der Reparaturaktivität durch PARP-Inhibitoren, kommt es entlang des Prinzips der synthetischen Letalität zu einem kompletten Versagen der DNA-Reparatur und raschem programmierten Absterben der betroffenen HR-defizienten Zelle.<sup>123,124</sup>

Weitere Untersuchungen deuten darauf hin, dass ebenso die Dysfunktionalität bestimmter in den Signalweg der HR involvierter nicht-*BRCA* Genen, die Empfindlichkeit gegenüber der PARP-Inhibition modifiziert.<sup>121</sup> Bislang konnte sich der klinische Einsatz von PARP-Inhibitoren wie beispielsweise Olaparib als bedeutende therapeutische Option bei Patientinnen mit zugrundeliegenden *BRCA1/2* Mutationen im Rahmen der Behandlung des

Ovarialkarzinoms etablieren. Darüber hinaus erwiesen sich PARP-Inhibitoren ebenso als wirksame Behandlungsoption bei Patientinnen mit einem HER2-negativen, sowie lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Mammakarzinom bei genetisch gesicherter *BRCA1/2*-Keimbahnmutation.<sup>125</sup> Die Zulassung und der Einsatz von PARP-Inhibitoren werden zunehmend auf andere genetische Konstellationen ausgeweitet, wobei die Anwendung von Olaparib bei Patientinnen mit nachgewiesener *PALB2* Keimbahnmutation den Empfehlungen der AGO BreastVersion 2021.1D zufolge weiterhin als umstritten gilt. Ferner mangelt es nach wie vor an belastbaren Daten für die Übertragung therapeutischer Strategien auf das Behandlungsmodell beim männlichen Mammakarzinom.

## **2.7 Multigen-Panel Testungen bei männlichen Brustkrebspatienten**

Die Einführung von Next-Generation-Sequenzierungen (Next Generation Sequencing, NGS) ermöglicht in Hochdurchsatzverfahren die parallele Sequenzierung mehrerer Gene gleichzeitig und revolutioniert seither die molekulargenetische Diagnostik. Das kosten- und zeitsparende Untersuchungsverfahren hat sich längst in der klinischen Abklärung eines sich zunehmend ausdehnenden Spektrums genetisch bedingter Erkrankungen etablieren können. Über Multi-Genpanel lassen sich alle bekannten Gene, die mit einem bestimmten Erkrankungssyndrom assoziiert sind, zusammenfassen und simultan untersuchen. So werden beispielsweise in der molekulargenetischen Diagnostik des Lynch Syndroms als Form des hereditären nicht polypösen Kolonkarzinoms (HNPCC), gezielte Mutationsanalysen der Mismatch-Reparatur (MMR) Gene *MSH2*, *MLH1*, *PMS2* und *MSH6* durchgeführt.<sup>126</sup>

Im Gegensatz zu der bisher als Goldstandard in der Routinediagnostik von Erbkrankheiten eingesetzten Einzelsequenzierungsmethode nach Sanger lassen sich durch die gleichzeitige Festlegung mehrerer klinisch relevanter Gene die Chancen für die Identifizierung zugrunde liegender genetischer Veränderungen erhöhen. Im Falle des erblichen Brust- und Eierstockkrebses bei Frauen beispielsweise haben Multigenpaneltestungen (MGPT) die reinen Einzeltestungen auf Genveränderungen in den beiden Hochrisikogenen *BRCA1/2* weitestgehend ersetzt.<sup>127</sup> Gemäß nationaler krebspezifischen Empfehlungen variiert der Umfang der Genpanel jedoch stark. Derzeit sind eine Vielzahl unterschiedlicher Multigenpanel erhältlich, die zwischen 10 und 100 bekannte, sowie potenziell in Frage kommende Kandidatengene abdecken und zu Diagnostik- oder Forschungszwecken getestet werden.<sup>128</sup>

Nach Empfehlungen des DK FBREK wurde das TruRisk® Panel für die Multigenanalyse festgelegt.<sup>26</sup> Das primäre Ziel des DK FBREK ist es, die klinische Versorgung von Patientinnen mit familiärem Brust- und Eierstockkrebs in Deutschland durch den Verbund

spezialisierten universitären Zentren zu verbessern. Aus der angepassten Einschätzung des individuellen Risikos sollen perspektivisch klinische Empfehlungen für die Beratung und Versorgung der Ratsuchenden in den Zentren des DK FBREK abgeleitet werden.<sup>129</sup> Das eingesetzte dynamische Genpanel umfasst insgesamt 34 verschiedene Gene und schließt alle bekannten Risikogene für den erblichen Brustkrebs, Eierstockkrebs und Gebärmutter-schleimhautkrebs ein. Neben den zehn etablierten Kerngenen („core genes“)<sup>130</sup> *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CDH1*, *CHEK2*, *NBN*, *PALB2*, *RAD51C*, *RAD51D* und *TP53* wurde das TruRisk® Genpanel aktualisiert und um die Gene *BARD1* und *BRIP1* erweitert.<sup>131,132</sup> Darüber hinaus werden zusätzlich Gene berücksichtigt, deren Assoziationen mit erblichem Brustkrebs derzeit zwar vermutet werden, die aber noch nicht ausreichend validiert wurden und dementsprechend weiter erforscht werden müssen. Dazu zählen beispielsweise auch die Syndrom-assoziierten Lynch Gene, sowie die dem Cowden Syndrom beziehungsweise Peutz-Jeghers Syndrom zugeordneten Gene *PTEN* und *STK11*. Das TruRisk® Genpanel wird regelmäßig dem aktuellen Forschungsstand angepasst und ist einem ständigen Validierungsprozess unterlegen. Während sich also Genpanel-Analysen im Rahmen des erblichen Mammakarzinoms der Frau etablieren konnten und ebenso die Entdeckung neuer Risikogene sowie deren Validierung und Translation in die Klinik einem weitgehend strukturierten Schema folgen, ist die Rolle von MGPT in der genetischen Beratung von männlichen Brustkrebspatienten weiterhin umstritten. Es fehlt aufgrund der relativen Rarität der Erkrankung bislang an entsprechender Evidenz und verlässlichen Daten, um ein spezifisches Genpanel für diese Patientengruppe festzulegen und auch die klinischen Auswirkungen von Genpaneltestungen bei an Brustkrebs erkrankten Männern sind bislang unklar. Für die umfassenden Genpanelanalysen von Rizollo et al. wurde beispielsweise ein individuell angepasstes Panel mit 50 krebsassoziierten Genen entwickelt und bei insgesamt 503 *BRCA1/2*-negativen männlichen Brustkrebspatienten eingesetzt. Die getroffene Genauswahl orientierte sich dabei primär an bekannten und vorgeschlagenen Genen für Brust- und Eierstockkrebs mit hoher und mittlerer Anfälligkeit. Darüber hinaus wurden Gene einbezogen, die über genomweite Assoziationsstudien (GWAS) mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko in Verbindung gebracht werden sowie Gene, die mit Krebsarten assoziiert werden, die gehäuft in Familien mit männlichen Mammakarzinomen beobachtet werden, wie das Prostata- und Pankreaskarzinom.<sup>68</sup> Dabei verteilten sich die identifizierten pathogenen Keimbahnvarianten auf 16 der 50 untersuchten Gene. In einer anderen großen Studie wurden retrospektiv MGPT-Ergebnisse analysiert und die genetische Prädisposition des männlichen Mammakarzinoms anhand von 512 Brustkrebspatienten bewertet, die auf Keimbahnvarianten in 16 verschiedenen Kandidatengenen untersucht wurden.<sup>47</sup> Bei Keimbahnuntersuchungen in 102 männlichen Brustkrebspatienten in einer Studie von Fostira et al. hingegen, umfasste das verwendete Genpanel die Analyse von insgesamt 94

unterschiedlichen vermutlich für Krebs prädisponierenden Genen. Pathogene Mutationen wurden in diesen Untersuchungen bei 13 der getesteten Patienten identifiziert, aufgeteilt in sechs verschiedenen Prädispositionsgenen.<sup>44</sup> Dasselbe 94 Gene umfassende Multigenpanel wurde auch auf eine italienischen Patientenkohorte von 70 männlichen Brustkrebspatienten angewandt, wobei pathogenen Varianten in 8 der 94 untersuchten Gene nachgewiesen werden konnten.<sup>67</sup>

Ähnlich dem weiblichen Vorbild zeigen sich neben einschlägigen Vorteilen und Entwicklungsmöglichkeiten zunehmend auch Schwierigkeiten, die mit der rasch voranschreitenden Überführung von Kandidatengenen aus der Forschung in die klinische Diagnostik einhergehen. Mit dem stetig wachsendem Umfang des sequenzierten Genoms steigt auch die Rate der Varianten mit unklarer Signifikanz (VUS).<sup>133,134</sup> Weitere Herausforderungen stellen neben dem fraglichen Umgang mit VUS in der Klinik auch Mutationen mit geringer oder unvollständiger Penetranz, sowie finanzielle Auswirkungen auf das Gesundheitssystem und mögliche psychosoziale Belastung der betreffenden Person und ihres familiären Umfeldes dar.<sup>134</sup> Insbesondere der klinische Nutzen und damit die Fähigkeit den einzelnen Patienten beziehungsweise die getestete Person in ihrer jeweiligen Entscheidungsfindung zu beeinflussen und mögliche resultierende klinische Konsequenzen sollten in der Auseinandersetzung mit einem erweiterten Einsatz von MGPT bedacht werden.<sup>135,136</sup>

## **2.8 Deutsches Konsortium Familiärer Brust- und Eierstockkrebs**

Das Deutsche Konsortium Familiärer Brust- und Eierstockkrebs (DK FBREK) ist ein deutschlandweiter Zusammenschluss von derzeit 23 universitären Zentren, die das gemeinsame Ziel verfolgen, die Versorgung und Betreuung von Ratsuchenden bzw. PatientInnen mit einer familiären Belastung für Brust- und Eierstockkrebs bundesweit zu optimieren. Besteht der Verdacht auf eine erbliche Veranlagung sollte die Möglichkeit einer genetischen Untersuchung erörtert werden. In diesem Zusammenhang hat das DK FBREK in Kooperation mit der Deutschen Krebsgesellschaft (DKG) evidenzbasierte Kriterien zur Erfassung der erblichen Belastung für Brust- und Eierstockkrebs festgelegt, die laufend validiert und dem aktuellen Forschungsstand angepasst werden (<https://www.krebsgesellschaft.de/zertdokumente.html>). Die Kriterien umfassen Verwandtschaftskonstellationen ersten bis dritten Grades und sind für die Identifizierung einer mindestens 10%igen Mutationsnachweiswahrscheinlichkeit an über 21.000 Familien validiert.<sup>137</sup> Werden die Einschlusskriterien für eine familiäre Risikosituation erfüllt, besteht die Indikation für eine molekulargenetische Testung, die die Ratsuchenden nach ärztlicher Aufklärung auf eigenen Wunsch in Anspruch nehmen können. Die Kosten werden hierfür nach §140a SGBV von vielen Krankenkassen übernommen und es bestehen spezielle

Verträge mit den jeweiligen gesetzlichen Krankenkassen sowie dem Verband der privaten Krankenversicherer zur pauschalisierten Vergütung. Mit dem TruRisk® Genpanel bietet das Konsortium eine umfassende genetische Diagnostik nach aktuellem wissenschaftlichem Stand an. Dabei werden nur jene Gene untersucht, die hinsichtlich ihrer klinischen Validität ausreichend geprüft wurden. Dennoch ist der alleinige Nachweis, dass eine genetische Veränderung mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko einhergeht, nicht ausreichend, um daraus evidenzbasierte klinische Präventionsmaßnahmen abzuleiten (z.B. intensivierete Früherkennung oder risikoreduzierende prophylaktische Operationen).<sup>129</sup> Die Konsensusempfehlungen des Konsortiums betonen, dass für die Rechtfertigung solcher Maßnahmen ein klinischer Nutzen nachgewiesen werden muss, der insbesondere hinsichtlich der Auswirkungen auf Sterblichkeit, Krankheitslast und Lebensqualität einen Vorteil zeigt. Gegenwärtig besteht im Zusammenhang mit erblichen Brust- und Eierstockkrebs eine derartige Evidenz lediglich für die *BRCA1/2*-Gene. Für sämtliche weitere Gene, sowie für das männliche Mammakarzinom ließen sich bislang risikoadaptierte Präventionsmaßnahmen nicht ausreichend in ihrer Wirksamkeit belegen. Um die Implementierung genetischer Untersuchungen in die klinische Versorgung zu standardisieren, hat das Konsortium ein Konzept der wissensgenerierenden Versorgung im Bereich der risikoadaptierten Prävention entwickelt.<sup>129</sup> Das Konzept beschreibt, dass Präventionsangebote und klinische Maßnahmen auf Grundlage der verfügbaren Evidenz festgelegt und kontinuierlich evaluiert werden. Das übergeordnete Ziel besteht darin, Innovationen auf dem Gebiet der genomischen Medizin zeitnah betroffenen PatientInnen und Ratsuchenden zugänglich zu machen. Der Versorgungsstandard in den Zentren des Konsortiums umfasst dabei die kontinuierliche Überprüfung und Festlegung von Einschlusskriterien, die Identifizierung neuer Gene, den Umgang mit VUS, die Bewertung risikomindernder Optionen, sowie eine verstärkte Überwachung und Risikokommunikation.<sup>138</sup> Unterstützt durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung, wurde zu diesem Zweck durch das DK FBREK das bundesweite Register „HereditCaRe“ (Hereditary Cancer Register) eingerichtet. Das Register gilt neben den gesetzlich vorgeschriebenen Krebsregistern als erstes dieser Art, welches durch die Krankenkassen finanziert wird und dient der sektorenübergreifenden netzwerkbasierter Erfassung von versorgungsrelevanten Langzeitdaten von Patienten mit Verdacht auf erblichen Brust- und Eierstockkrebs. Die Ergebnisse sollen schließlich zur Evaluation des klinischen Nutzens von risikoadjustierten Präventionskonzepten auf der Basis der Genpanel-Diagnostik herangezogen werden.<sup>129</sup>

## **2.9 Ziele der Arbeit**

Nach wie vor stellt das männliche Mammakarzinom aufgrund seiner relativen Seltenheit und bislang rudimentären geschlechtsspezifischen Erforschung eine große Herausforderung in der klinischen Bewältigung dar und erfordert ein hohes Maß an Interdisziplinarität. Neben umweltassoziierten Risikofaktoren prädisponieren insbesondere genetische Faktoren wie die familiäre Vorbelastung in Form von Keimbahnmutationen in den bekannten Hochrisikogenen *BRCA1/2* für die Entstehung von Brustkrebs bei Männern. Darüber hinaus ist die gegenwärtige Rolle und klinische Bedeutung weiterer pathogener Genvarianten mit niedrigem beziehungsweise moderatem bis hohem Erkrankungsrisiko für männlichen Brustkrebs bislang unzureichend diskutiert.








Im Rahmen der vorliegenden Dissertation erfolgte eine umfangreiche molekulargenetische Analyse von genomischen Veränderungen in den beiden Hochrisikogenen *BRCA1/2* sowie 23 weiteren ausgewählten nicht-*BRCA*-Kandidatengenen, die potenziell an der Pathogenese des männlichen Mammakarzinoms beteiligt sind. Um den Einfluss genetischer Faktoren auf die Entstehung von Brustkrebs bei Männern zu untersuchen, wurde eine große deutsche multizentrische Kohorte an Brustkrebspatienten des DK-FBREK zusammengestellt. Über die Identifizierung zugrundeliegender pathogener Varianten sollen Erkenntnisse erlangt werden, die eine geschlechtsspezifische Annäherung des für den männlichen Brustkrebs prädisponierenden Keimbahnmutationsspektrums und der damit verbundenen Risikoabschätzung liefern. Ebenso sollen die Forschungsergebnisse perspektivisch dazu verwendet werden, die klinische Versorgung von Männern mit einem erhöhten Mammakarzinomrisiko zu verbessern.

## **3. Publikation**

Im Folgenden wird die aus den Untersuchungsergebnissen hervorgegangene Publikation mit dem Titel „Prevalence of cancer predisposition germline variants in male breast cancer patients: Results of the German Consortium for hereditary breast and ovarian cancer“ präsentiert.

Article

# Prevalence of Cancer Predisposition Germline Variants in Male Breast Cancer Patients: Results of the German Consortium for Hereditary Breast and Ovarian Cancer

Muriel Rolfes <sup>1</sup>, Julika Borde <sup>1</sup>, Kathrin Möllenhoff <sup>2</sup> , Mohamad Kayali <sup>1</sup>, Corinna Ernst <sup>1</sup> , Andrea Gehrig <sup>3</sup>, Christian Sutter <sup>4</sup> , Juliane Ramser <sup>5</sup>, Dieter Niederacher <sup>6</sup>, Judit Horváth <sup>7</sup>, Norbert Arnold <sup>8</sup>, Alfons Meindl <sup>9</sup>, Bernd Auber <sup>10</sup>, Andreas Rump <sup>11</sup>, Shan Wang-Gohrke <sup>12</sup>, Julia Ritter <sup>13</sup>, Julia Hentschel <sup>14</sup>, Holger Thiele <sup>15</sup>, Janine Altmüller <sup>15,16,17</sup> , Peter Nürnberg <sup>15</sup> , Kerstin Rhiem <sup>1</sup>, Christoph Engel <sup>18</sup> , Barbara Wappenschmidt <sup>1</sup>, Rita K. Schmutzler <sup>1</sup>, Eric Hahnen <sup>1,\*</sup> and Jan Hauke <sup>1</sup> 



**Citation:** Rolfes, M.; Borde, J.; Möllenhoff, K.; Kayali, M.; Ernst, C.; Gehrig, A.; Sutter, C.; Ramser, J.; Niederacher, D.; Horváth, J.; et al. Prevalence of Cancer Predisposition Germline Variants in Male Breast Cancer Patients: Results of the German Consortium for Hereditary Breast and Ovarian Cancer. *Cancers* **2022**, *14*, 3292. <https://doi.org/10.3390/cancers14133292>

Academic Editor: Kyriaki Michailidou

Received: 9 May 2022  
Accepted: 30 June 2022  
Published: 5 July 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- <sup>1</sup> Center for Familial Breast and Ovarian Cancer, Center for Integrated Oncology (CIO), University of Cologne, Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, 50937 Cologne, Germany; muriel.rolfes@uk-koeln.de (M.R.); julika.borde@uk-koeln.de (J.B.); mohamad.kayali@uk-koeln.de (M.K.); corinna.ernst@uk-koeln.de (C.E.); kerstin.rhiem@uk-koeln.de (K.R.); barbara.wappenschmidt@uk-koeln.de (B.W.); rita.schmutzler@uk-koeln.de (R.K.S.); jan.hauke@uk-koeln.de (J.H.)
- <sup>2</sup> Mathematisches Institut, Heinrich-Heine-Universität Duesseldorf, 40225 Duesseldorf, Germany; kathrin.moellenhoff@hhu.de
- <sup>3</sup> Institute of Human Genetics, University Wuerzburg, 97074 Wuerzburg, Germany; gehrig@biozentrum.uni-wuerzburg.de
- <sup>4</sup> Institute of Human Genetics, University Hospital Heidelberg, 69120 Heidelberg, Germany; christian.sutter@med.uni-heidelberg.de
- <sup>5</sup> Department of Gynecology and Obstetrics, Technical University Munich, 80333 Munich, Germany; juliane.ramser@mri.tum.de
- <sup>6</sup> Department of Gynecology and Obstetrics, University Hospital Duesseldorf, Heinrich-Heine University Duesseldorf, 40225 Duesseldorf, Germany; niedera@med.uni-duesseldorf.de
- <sup>7</sup> Institute for Human Genetics, University Hospital Muenster, 48149 Muenster, Germany; judit.horvath@ukmuenster.de
- <sup>8</sup> Institute of Clinical Molecular Biology, Department of Gynecology and Obstetrics, University Hospital of Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Christian-Albrechts University Kiel, 24105 Kiel, Germany; norbert.arnold@uksh.de
- <sup>9</sup> Department of Gynecology and Obstetrics, LMU Munich, University Hospital Munich, 80337 Munich, Germany; alfons.meindl@med.uni-muenchen.de
- <sup>10</sup> Department of Human Genetics, Hannover Medical School, 30645 Hannover, Germany; auber.bernd@mh-hannover.de
- <sup>11</sup> Institute for Clinical Genetics, Faculty of Medicine Carl Gustav Carus, TU Dresden, 01062 Dresden, Germany; rump.andreas@klinikum-oldenburg.de
- <sup>12</sup> Department of Gynecology and Obstetrics, University of Ulm, 89075 Ulm, Germany; shan.wang-gohrke@uniklinik-ulm.de
- <sup>13</sup> Institute of Medical and Human Genetics, Charité-Universitätsmedizin Berlin, 13353 Berlin, Germany; julia.ritter@laborberlin.com
- <sup>14</sup> Institute of Human Genetics, University of Leipzig Hospitals and Clinics, 04103 Leipzig, Germany; julia.hentschel@medizin.uni-leipzig.de
- <sup>15</sup> Cologne Center for Genomics (CCG) and Center for Molecular Medicine Cologne (CMMC), Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, University of Cologne, 50931 Cologne, Germany; hthiele@uni-koeln.de (H.T.); janine.altmueller@bih-charite.de (J.A.); nuernberg@uni-koeln.de (P.N.)
- <sup>16</sup> Core Facility Genomics, Berlin Institute of Health, Charité-Universitätsmedizin Berlin, 10117 Berlin, Germany
- <sup>17</sup> Max Delbrück Center for Molecular Medicine in the Helmholtz Association (MDC), 13125 Berlin, Germany
- <sup>18</sup> Institute for Medical Informatics, Statistics and Epidemiology, University of Leipzig, 04107 Leipzig, Germany; christoph.engel@imise.uni-leipzig.de
- \* Correspondence: eric.hahnen@uk-koeln.de; Tel.: +49-221-478-78929; Fax: +49-221-478-86510

**Simple Summary:** Male breast cancer (mBC) is a rare disease associated with a high prevalence of pathogenic germline variants (PVs) in the *BRCA2* gene. However, data regarding other breast cancer (BC) predisposition genes are limited or conflicting. We investigated the prevalence of PVs in *BRCA1/2* and 23 other cancer predisposition genes using an overall study sample of 614 patients with

mBC. A high proportion of patients with mBC carried pathogenic germline variants in *BRCA2* (23.0%, 142/614) and *BRCA1* (4.6%, 28/614). A *BRCA1/2* PV prevalence of 11.0% was identified in patients with mBC without a family history of breast and/or ovarian cancer. Patients with *BRCA1/2* PVs did not show an earlier disease onset than those without. Case-control analyses revealed significant associations of protein-truncating variants in *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *PALB2*, and *ATM* with mBC. Our findings support the benefit of multi-gene panel testing in patients with mBC.

**Abstract:** Male breast cancer (mBC) is associated with a high prevalence of pathogenic variants (PVs) in the *BRCA2* gene; however, data regarding other BC predisposition genes are limited. In this retrospective multicenter study, we investigated the prevalence of PVs in *BRCA1/2* and 23 non-*BRCA1/2* genes using a sample of 614 patients with mBC, recruited through the centers of the German Consortium for Hereditary Breast and Ovarian Cancer. A high proportion of patients with mBC carried PVs in *BRCA2* (23.0%, 142/614) and *BRCA1* (4.6%, 28/614). The prevalence of *BRCA1/2* PVs was 11.0% in patients with mBC without a family history of breast and/or ovarian cancer. Patients with *BRCA1/2* PVs did not show an earlier disease onset than those without. The predominant clinical presentation of tumor phenotypes was estrogen receptor (ER)-positive, progesterone receptor (PR)-positive, and HER2-negative (77.7%); further, 10.2% of the tumors were triple-positive, and 1.2% were triple-negative. No association was found between ER/PR/HER2 status and *BRCA1/2* PV occurrence. Comparing the prevalence of protein-truncating variants (PTVs) between patients with mBC and control data (ExAC,  $n = 27,173$ ) revealed significant associations of PTVs in both *BRCA1* and *BRCA2* with mBC (*BRCA1*: OR = 17.04, 95% CI = 10.54–26.82,  $p < 10^{-5}$ ; *BRCA2*: OR = 77.71, 95% CI = 58.71–102.33,  $p < 10^{-5}$ ). A case-control investigation of 23 non-*BRCA1/2* genes in 340 *BRCA1/2*-negative patients and ExAC controls revealed significant associations of PTVs in *CHEK2*, *PALB2*, and *ATM* with mBC (*CHEK2*: OR = 3.78, 95% CI = 1.59–7.71,  $p = 0.002$ ; *PALB2*: OR = 14.77, 95% CI = 5.02–36.02,  $p < 10^{-5}$ ; *ATM*: OR = 3.36, 95% CI = 0.89–8.96,  $p = 0.04$ ). Overall, our findings support the benefit of multi-gene panel testing in patients with mBC irrespective of their family history, age at disease onset, and tumor phenotype.

**Keywords:** breast neoplasms; male breast cancer; breast cancer predisposition genes; genetic testing; familial breast cancer

## 1. Introduction

Male breast cancer (mBC) is a rare disease; less than 1% of all patients with breast cancer (BC) are men [1]. Worldwide, the incidence of mBC is less than 1 per 100,000 man-years [2]. In Germany, approximately 750 men were diagnosed with BC in 2020. In contrast, BC among women is by far the most common tumor entity, with approximately 69,000 newly diagnosed patients annually [3]. Due to its comparative rarity, mBC is routinely excluded from clinical trials on BC. Thus, diagnostic recommendations for mBC have been based on clinical research results primarily focusing on women over the decades. In addition to obvious similarities in the disease course, sex-specific differences reveal, in particular, the need for more specific and separate consideration of mBC [4–6]. Examining prospective data has revealed clinically relevant differences in carcinogenesis of mBC, especially the divergent prevalence of germline pathogenic variants (PVs) in the major BC susceptibility genes, *BRCA1/2*. PVs in *BRCA2* represent the most frequent causative gene alteration and have been reported in about 10–16% of patients with mBC [4,7,8]. These are associated with an estimated lifetime risk for mBC of 4–12%, compared with 0.1% in the general male population [9,10]. Barnes et al. demonstrated an average lifetime risk for mBC of 12% for *BRCA2* carriers in their polygenic risk score (PRS)-based risk analyses [11]. In contrast to *BRCA2*, PVs in *BRCA1* are underrepresented in male patients compared with those in female patients with BC [12,13]. After initially disproving the involvement of *BRCA1* in mBC carcinogenesis [14], several studies subsequently suggested an association between mBC and PVs in *BRCA1*, although this association is substantially weaker than that with

*BRCA2* [15]. Li et al. recently confirmed the association of *BRCA1* PVs and mBC (risk ratio (RR) = 4.30; 95% confidence interval (CI) = 1.09–16.96) [10].

Recently published guidelines [16,17] concerning managing patients with mBC include, in addition to general therapeutic options, the support of genetic counseling and germline genetic testing for cancer predisposition genes regardless of their family cancer history. Nevertheless, there remains a lack of evidence-based, precise breakdown of possible PVs beyond those in *BRCA2*. As widely confirmed in female patient cohorts [18], several predisposition genes involved in DNA repair pathways such as *ATM*, *CHEK2*, and *PALB2* have also been described in mBC cohorts [19–23]. Overall, data regarding these and other suspected mBC predisposition genes remain limited and have revealed controversial results. Pritzlaff et al. [19] investigated the association of 16 BC risk genes in 708 patients with mBC and found that besides *BRCA2*, *PALB2* and *CHEK2* were associated with mBC risk. No significant association with increased mBC risk was found for *BRCA1* and *ATM*. A study by Rizzolo et al. [20] investigating 503 *BRCA1/2*-negative patients with mBC from Italy confirmed the association of PVs in *PALB2* and found no significant association of PVs in *CHEK2* with increased mBC risk. A study including 102 patients with mBC by Fostira et al. [21] confirmed an association with *BRCA2* and identified *ATM* as the second most frequently mutated risk gene.

As the respective contribution to mBC risk remains controversial, further investigations are needed to evaluate the utility and potential incorporation of multi-gene panel testing in the clinical management of patients with mBC. We performed a multicenter study including 614 patients with mBC recruited for genetic testing through the centers of the German Consortium for Hereditary Breast and Ovarian Cancer (GC-HBOC) to determine PV prevalence in known and suspected BC predisposition genes and to more comprehensively define the genetic predisposition to mBC. We pursued a two-stage approach: first, all patients were screened for PVs in *BRCA1/2*; second, *BRCA1/2*-negative patients were further analyzed for PVs in non-*BRCA1/2* cancer predisposition genes.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Study Sample

The overall study sample comprised 614 patients with mBC, diagnosed with unilateral or bilateral BC between 1965 and 2018. The average age at first diagnosis (AAD) was 60 years (range 22–91 years). All patients were recruited from the participating centers of GC-HBOC. For 66.1% of the patients with mBC in the overall study sample (406/614), a positive family history (FH) for BC and/or ovarian cancer (OC) was reported. Positive FH was defined as at least one known relative with BC or OC, irrespective of the AAD of the relative(s) with BC or OC. Among the patients with mBC, 32.6% reported no FH of BC/OC (200/614). Data regarding BC/OC FH were missing for 8/614 of the patients with mBC (1.3%). *BRCA1/2* germline analysis was performed in a routine diagnostic setting between 1995 and 2019. All patients were tested for germline mutations after mBC was diagnosed. A high proportion (27.7%) of patients with mBC (170/614) carried PVs in *BRCA1/2*. Of the 614 patients, 586 were considered index patients, with no prior testing of another family member. The remaining 28 mBC patients, all with a positive FH, were analyzed for a known pathogenic *BRCA1/2* family mutation only. Of those, 22 were tested positive. Of the 444 patients with mBC without PVs in *BRCA1/2*, 104 were excluded from further analyses because of missing DNA samples or lack of patient consent. The remaining 340 patients with mBC who had previously tested negative for PVs in *BRCA1/2* were screened for PVs in 23 established or suspected non-*BRCA1/2* BC predisposition genes. Genotype and phenotype data were retrieved from the centralized GC-HBOC patient database ([BRCA2006/HerediCaRe](#), accessed on 20 May 2019).

### 2.2. Gene Selection and Next-Generation-Sequencing (NGS) Analysis

Genomic DNA was isolated from venous blood. Regarding non-*BRCA1/2* predisposition gene analyses, approximately one-third (102/340) of the patient genetic data

originated from a comprehensive analysis of gene panel testing previously performed at the GC-HBOC centers in a routine diagnostic setting using the customized hybridization capture-based TruRisk<sup>®</sup> gene panel of the GC-HBOC for target enrichment. Another customized multi-gene panel was used for the remaining 238 patients (Agilent SureSelect<sup>XT</sup>, Santa Clara, CA, USA). Both multi-gene panels covered the entire coding regions of 23 established or suspected non-*BRCA1/2* BC predisposition genes (*ATM*, NM\_000051.3; *BARD1*, NM\_000465.3; *BRIP1*, NM\_032043.2; *CDH1*, NM\_004360.4; *CHEK2*, NM\_007194.3; *FAM175A*, NM\_139076.2; *FANCM*, NM\_020937.3; *MLH1*, NM\_000249.3; *MRE11A*, NM\_005591.3; *MSH2*, NM\_000251.2; *MSH6*, NM\_000179.2; *MUTYH*, NM\_0011428425.1; *NBN*, NM\_002485.4; *PALB2*, NM\_024675.3; *PMS2*, NM\_000535.5; *PTEN*, NM\_000314.4; *RAD50*, NM\_005732.3; *RAD51C*, NM\_058216.2; *RAD51D*, NM\_002878.3; *RINT1*, NM\_021930.4; *STK11*, NM\_000455.4; *TP53*, NM\_000546.5; *XRCC2*, NM\_005431.1). Quantified libraries were sequenced on Illumina NGS devices (HiSeq 4000 or NovaSeq 6000, San Diego, CA, USA) at the Cologne Center for Genomics (CCG). Bioinformatic analyses were performed using the Varbank v.2.26 (Cologne Center for Genomics, Cologne, Germany) pipeline of the CCG.

### 2.3. Variant Annotation and Classification

The sequencing reads were mapped against human reference genome GRCh38. Mean coverage of at least 100× was chosen as the sequencing quality filter threshold. The Alamut Visual version 2.13 analysis software tool (Interactive Biosoftware, Rouen, France) was used for variant annotation and integration of current ClinVar classifications. Variant classification was performed using the GC-HBOC criteria for the classification of germline sequence variants in risk genes for hereditary BC and OC [24], based on the interpretive guidelines published by the Evidence-Based Network for the Interpretation of Germline Mutant Alleles (ENIGMA) and the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) [25]. As proposed by the International Agency for Research on Cancer (IARC) [26], a five-tier classification system was applied. This grading system defines variants as pathogenic (class 5), likely pathogenic (class 4), variant of uncertain significance (VUS, class 3), likely benign (class 2), or benign (class 1). Protein-truncating germline variants (PTVs) were defined as nonsense, frameshift, or essential splice site variants affecting the invariant splice sites or the last nucleotide of an exon. PVs (pathogenic variants) included PTVs, (likely) pathogenic missense variants, and (likely) pathogenic copy number variations (CNVs). ExomeDepth v1.1.15 was used for CNV prediction [27] and predicted CNVs were verified by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) using specific P041 (*ATM*), P042 (*ATM*), and P190 (*CHEK2*) SALSA<sup>®</sup> MLPA<sup>®</sup> kits (MRC Holland, Amsterdam, The Netherlands). All remaining PVs were confirmed by Sanger sequencing.

### 2.4. Control Sample and Statistical Analysis

To investigate the association of mBC with PTVs in suspected cancer predisposition genes, a case-control analysis was conducted using univariate logistic regression analysis to estimate the odds ratios (ORs) and corresponding 95% confidence intervals (CIs). Publicly available genomic variant data from 27,173 individuals of non-Finnish European ancestry from the Exome Aggregation Consortium (ExAC) [28], excluding samples from The Cancer Genome Atlas (TCGA), were included as control data. Finnish individuals were excluded due to a high prevalence of founder mutations in the Finnish population [29], which may cause a bias in the case-control analysis. Statistical analyses were performed using R v3.6 (R Core Team (2021)). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <https://www.R-project.org/> (accessed on 23 February 2022). All statistical tests were two-sided, with *p*-values < 0.05 considered statistically significant.

### 3. Results

#### 3.1. Prevalence of BRCA1/2 Pathogenic Variants and Cancer Characteristics in the Overall Study Sample

From the overall study sample of 614 patients with mBC, 170 (27.7%) patients carried a PV in *BRCA1* or *BRCA2*, with a notably higher proportion of *BRCA2* PV carriers (142/614, 23.1%) than *BRCA1* PV carriers (28/614, 4.6%). In *BRCA2*, the c.1813dup PV was most frequent (12/142). In *BRCA1*, the c.5266dup variant accounted for one-quarter of all *BRCA1* PVs (7/28). The mean AAD of *BRCA1* PV carriers, as well as that of *BRCA2* PV carriers, was 62 years (*BRCA1*: range 33–82 years; *BRCA2*: range 37–83 years), with a statistically significant difference observed compared with *BRCA1/2*-negative patients (mean 59 years, range 22–91 years, Welch's *t*-test  $p = 0.005$ ). Among 606 patients with mBC whose BC/OC FH status was known, the prevalence of *BRCA1/2* PVs was significantly higher in patients with BC/OC FH than in those without (154/460 (33.5%) vs. 16/146 (11.0%), Fisher's exact test  $p < 10^{-7}$ ). A statistically significant association between BC/OC FH and the occurrence of PVs was found the *BRCA2* gene (128/460 (27.8%) vs. 14/146 (9.6%), OR = 3.63, 95% CI = 1.99–7.08, Fisher's exact test  $p < 10^{-5}$ ) and for the *BRCA1* gene (26/460 (5.6%) vs. 2/146 (1.4%),  $p = 0.04$ ). A high proportion of PVs in the *BRCA2* gene was observed in bilaterally affected patients with mBC, though with no statistical significance compared with the prevalence in unilaterally affected patients with mBC ( $p = 0.112$ ); of the 28 bilaterally affected patients with mBC (Table 1), 10 patients (35.7%) carried PVs in *BRCA2* compared with 132/586 (22.5%) in unilaterally affected patients.

**Table 1.** Patient and cancer characteristics in the overall study sample (n = 614) stratified by pathogenic variant (PV) status, family history (FH), age at first diagnosis (AAD). BC = breast cancer, ER = estrogen receptor, mBC = male breast cancer, PR = progesterone receptor.

Subgroup	Overall Study Sample (%)	<i>BRCA1/2</i> -Positive	<i>BRCA1</i> -Positive	<i>BRCA2</i> -Positive	<i>BRCA1/2</i> Negative Patients Further Investigated	Carriers of Pathogenic Variants in 23 Non- <i>BRCA1/2</i> -Genes (%)
patients with mBC	614 (100)	170	28	142	340	32 (9.4)
unilateral BC	586 (95.4)	160	28	132	328	32 (9.8)
bilateral BC	28 (4.6)	10	0	10	12	0 (0)
BC/OC FH *	460 (75.9)	154	26	128	235	23 (9.8)
no BC/OC FH *	146 (24.1)	16	2	14	102	9 (8.8)
mean AAD (range) *	60 (22–91)	62 (33–83)	62 (33–82)	62 (37–83)	60 (27–91)	58 (30–83)
AAD < 40 years	30 (4.9)	4 (2.4)	1	3	18	2 (11.2)
AAD 40–49 years	90 (14.8)	18 (10.6)	4	14	55	8 (14.5)
AAD 50–59 years	163 (26.8)	42 (24.7)	5	37	89	7 (7.9)
AAD 60–69 years	183 (30.0)	61 (35.9)	9	52	97	7 (7.2)
AAD 70–79 years	125 (20.5)	40 (23.5)	8	32	69	7 (10.1)
AAD > 80 years	18 (3.0)	5 [2.9]	1	4	12	1 (8.3)
ER/PR-status available (%)	407 (100)	107 (100)	17 (100)	90 (100)	243 (100)	24 (100)
HER2-status available (%)	323 (100)	90 (100)	15 (100)	75 (100)	200 (100)	21 (100)
ER-positive (%)	394 (96.8)	105 (98.1)	17 (100)	88 (97.8)	234 (96.3)	24 (100)
ER-negative (%)	13 (3.2)	2 (1.9)	0 (0)	2 (2.2)	9 (3.7)	0 (0)
PR-positive (%)	366 (89.9)	94 (87.9)	14 (82.4)	80 (88.9)	219 (90.1)	23 (96.0)
PR-negative (%)	41 (10.1)	13 (12.1)	3 (17.6)	10 (11.1)	24 (9.9)	1 (4.2)
HER2-positive (%)	38 (11.7)	13 (14.4)	2 (13.3)	11 (14.7)	20 (10.0)	4 (19.0)
HER2-negative (%)	285 (88.2)	77 (85.6)	13 (86.7)	64 (85.3)	180 (90.0)	17 (81.0)

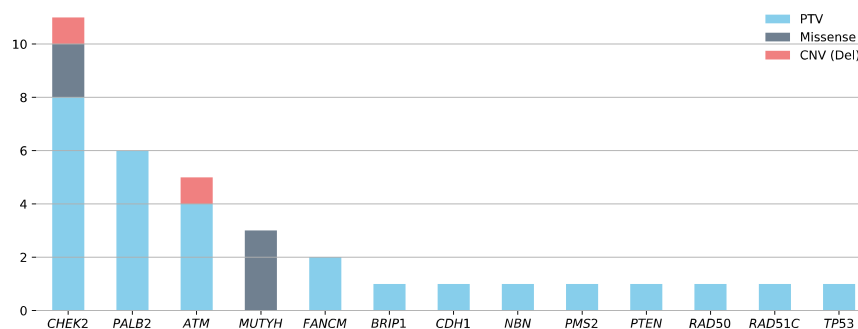
\* total missing information regarding AAD (n = 5) and missing information regarding FH (n = 8).

Information on tumor estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR) status was available for 407 patients with mBC (66%) among the overall study sample of 614 patients with mBC. The predominant clinical presentation of tumor phenotypes was

ER-positive and PR-positive (359/407, 88.2%); further, 35/407 (8.6%) were ER-positive and PR-negative. Only 13/407 (3.2%) tumors were ER-negative, of which seven were PR-positive and six were PR-negative. Among the 407 patients with mBC with known ER and PR status, human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) status was documented in 323 patients. Most patients were ER-positive, PR-positive, and HER2-negative (251/323, 77.7%); further, 33/323 (10.2%) were triple-positive, and 4/323 (1.2%) were triple-negative (Figure S1). Neither AAD nor *BRCA1/2* PV carrier status was associated with ER, PR, or HER2 status (Figure S2, and Table S1).

### 3.2. Prevalence of Pathogenic Variants in *BRCA1/2*-Negative Patients with mBC

In the overall study sample, 72.3% (444/614) of patients tested negative for PVs in *BRCA1/2*. Of these patients, 340 were screened for PVs among 23 additional non-*BRCA1/2* cancer predisposition genes. This subgroup, with a mean AAD of 60 years (range 27–91), comprised 328 unilaterally and 12 bilaterally affected patients with mBC (Table 1). A BC/OC FH was reported in 69.7% (235/337) of these patients (Table 1, no BC/OC FH data were available for three patients). In the *BRCA1/2*-negative study sample, 9.4% (32/340) of the patients with mBC, all unilaterally affected, carried at least one PV in the 23 (suspected) non-*BRCA1/2* cancer predisposition genes (Figure 1).



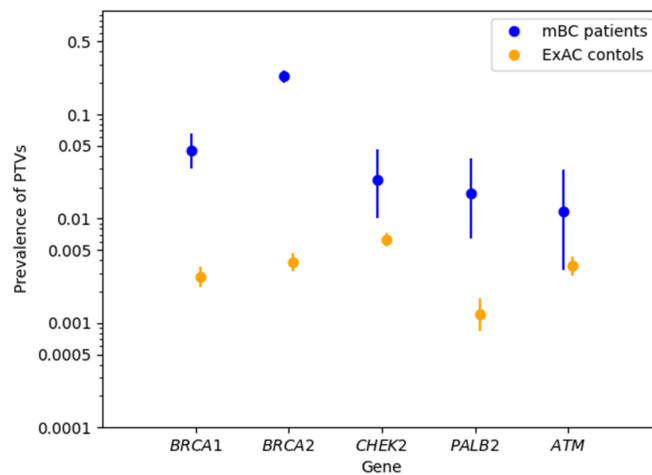
**Figure 1.** Gene-specific prevalence of heterozygous pathogenic germline variants (PVs) in 340 patients with *BRCA1/2*-negative male breast cancer.

Overall, 35 PVs were identified in the 13 genes (Figure 1). Three patients with mBC were double PV carriers (*CHEK2/ATM*, *NBN/RAD50*, *PALB2/TP53*). PVs in *CHEK2* were the most frequent and were identified in 3.2% (11/340) of the *BRCA1/2*-negative patients with mBC. The most prevalent PV in the *CHEK2* gene was the c.1100delC variant observed in six of 11 patients. The second highest PV prevalence was in *PALB2* (1.8%, 6/340), followed by *ATM* (1.5%, 5/340). The prevalence of PVs in other investigated genes was less than 1% each (*MUTYH* (3/340), *FANCM* (2/340), *BRIP1* (1/340), *CDH1* (1/340), *NBN* (1/340), *PMS2* (1/340), *PTEN* (1/340), *RAD50* (1/340), *RAD51C* (1/340), *TP53* (1/340)). No PVs were identified in *BARD1*, *FAM175A*, *MLH1*, *MRE11A*, *MSH2*, *MSH6*, *RAD51D*, *RINT1*, *STK11*, or *XRCC2* (Table S1).

### 3.3. Associations between mBC and Protein-Truncating Variants in *BRCA1/2* and Non-*BRCA1/2* Cancer Predisposition Genes

Based on the sequencing results from the publicly available ExAC control dataset [28], case-control analyses were performed to assess associations between mBC and PTVs in *BRCA1/2* and selected non-*BRCA1/2* genes. PTVs in both *BRCA2* and *BRCA1* were significantly associated with mBC (*BRCA2*: OR = 77.41, 95% CI = 58.71–102.33, Fisher's exact test  $p < 0.0001$ ; *BRCA1*: OR = 17.04, 95% CI = 10.54–26.82,  $p < 0.0001$ ) (Table 2). Among the 340 patients with *BRCA1/2*-negative mBC, 25 (7.35%) carried PTVs in 10 non-*BRCA1/2*

genes (Table S1). At a gene-specific level, the prevalence of PTVs in *PALB2* was significantly higher in patients with mBC than in the ExAC controls (6/340 (1.76%) vs. 33/27,173 (0.12%); OR = 14.77; 95% CI = 5.02–36.02;  $p < 0.0001$ , Table 2). Statistically significant associations were also observed between mBC and PTVs in *CHEK2* (OR = 3.78; 95% CI = 1.59–7.71;  $p = 0.002$ ) and *ATM* (OR = 3.36; 95% CI = 0.89–8.96;  $p = 0.04$ ) (Table 2). Notably, the number of identified PTVs was low ( $\leq 8$ ) for each of the non-*BRCA1/2* genes, and the 95% CIs of the observed PTV prevalence did not reach a distinction for the *ATM* gene, which only affected four patients with mBC (Figure 2). Beyond *PALB2*, *CHEK2*, and *ATM*, the prevalence of PTVs in the other examined genes was too low for meaningful statistical analysis.



**Figure 2.** Prevalence of protein-truncating variants (PTVs) with binomial 95% confidence intervals (CIs) per gene in patients with male breast cancer and in ExAC controls.

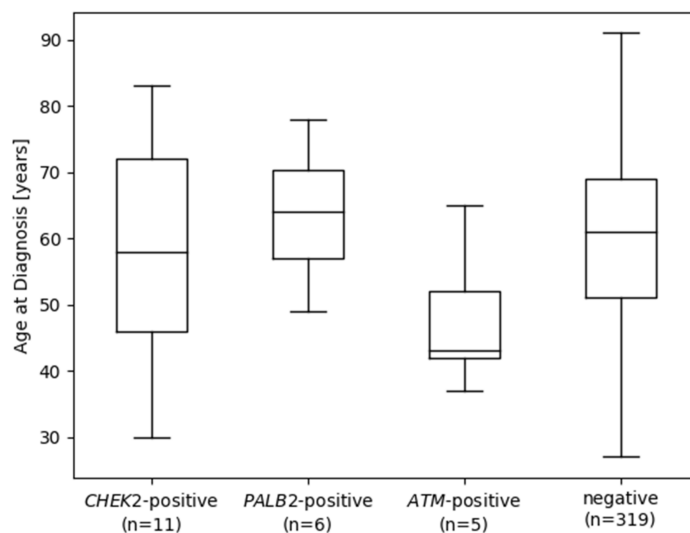
**Table 2.** Prevalence of protein-truncating variants (PTVs) in (suspected) cancer predisposition genes in patients with mBC compared with the control dataset (ExAC). Mutation carrier frequencies are shown in parentheses. Univariate logistic regression analysis was performed to estimate the odds ratios (OR) and corresponding 95% confidence intervals (CI).

Gene	mBC PTVs (%)	Patients with mBC	ExAC Controls n = 27,173 (%)	mBC vs. ExAC	
				OR (95% CI)	$p^*$
<i>BRCA2</i>	142 (23.13)	614	105 (0.39)	77.41 (58.71–102.33)	$<10^{-5}$
<i>BRCA1</i>	28 (4.56)	614	76 (0.28)	17.04 (10.54–26.82)	$<10^{-5}$
<i>CHEK2</i>	8 (2.35)	340	172 (0.63)	3.78 (1.59–7.71)	0.002
<i>PALB2</i>	6 (1.76)	340	33 (0.12)	14.77 (5.02–36.02)	$<10^{-5}$
<i>ATM</i>	4 (1.18)	340	96 (0.35)	3.36 (0.89–8.96)	0.04
<i>FANCM</i>	2 (0.59)	340	184 (0.68)	-	-
<i>BRIP1</i>	1 (0.29)	340	59 (0.22)	-	-
<i>CDHI</i>	1 (0.29)	340	2 (0.00)	-	-
<i>NBN</i> **	1 (0.29)	340	42 (0.15)	-	-
<i>PTEN</i>	1 (0.29)	340	1 (0.00)	-	-
<i>RAD50</i> **	1 (0.29)	340	84 (0.31)	-	-
<i>RAD51C</i>	1 (0.29)	340	34 (0.13)	-	-

\* Fisher’s exact test; \*\* one patient carried two PTVs (NBN/RAD50).

### 3.4. Pathogenic Variants in Cancer Predisposition Genes according to Cancer Family History, Age at Diagnosis, and Tumor Characteristics

In the subset of 340 *BRCA1/2*-negative patients with mBC, the overall prevalence of PVs in patients with a BC/OC FH was 9.8% (23/235), and that in patients without a BC/OC FH was 8.8% (9/102) (23/235 vs. 9/102; Fisher's exact test  $p = 0.84$ ). When focusing on *ATM*, *CHEK2*, and *PALB2*, the prevalence of PVs in patients with BC/OC FH was 7.7% (18/235), whereas that in patients without BC/OC FH was 2.9% (3/102) (Fisher's exact test,  $p = 0.14$ ). The mean AAD of patients with mBC was considerably lower in carriers of a PV in *ATM* (Figure 3) compared with that in patients without (mean AAD *ATM*-positive 47.8 years ( $n = 5$ ) vs. *ATM*-negative 59.9 years ( $n = 335$ ), Welch's  $t$ -test  $p = 0.07$ ). Linear regression analysis with the AAD of mBC in years as the outcome revealed a statistically significant association of PVs in the *ATM* gene with younger AAD (Table 3) under adjustment for the presence of BC/OC FH, whereas PVs in *CHEK2* and *PALB2* showed no statistically significant association with AAD.



**Figure 3.** Age at diagnosis (AAD) of male breast cancer in *BRCA1/2*-negative individuals based on germline pathogenic variant (PV) status in the *CHEK2*, *PALB2*, and *ATM* genes. One individual (AAD = 37 years) carried PVs in both *CHEK2* and *ATM*. The term “negative” indicates individuals without PVs in *BRCA1/2*, *CHEK2*, *PALB2*, and *ATM*.

**Table 3.** Linear regression analysis results with age at first diagnosis (AAD) of male breast cancer (mBC) with years as the outcome in 337 *BRCA1/2*-negative patients with mBC. Gene-wise covariates refer to pathogenic variant status (1: pathogenic variant, 0: no pathogenic variant). FH = Breast/ovarian cancer family history (1: yes 0: no).

Covariat	$\beta$	95% CI	$p$
FH	1.78	−0.97–4.52	0.20
<i>ATM</i>	−11.87	−22.35–−1.39	0.03
<i>CHEK2</i>	−1.96	−9.09–5.17	0.59
<i>PALB2</i>	3.55	−5.98–13.07	0.46

#### 4. Discussion

Comprehensive germline genetic testing is a prerequisite in targeted risk-adjusted surveillance programs for early cancer detection and targeted therapies in the context of precision oncology. Therefore, germline genetic testing represents a globally established standard; however, it primarily remains limited to women with BC. Research on PARP inhibitors beyond *BRCA1/2*-mutated carcinomas, for example, is pioneering the field of personalized medicine [30]. Thus, sex-specific consideration of distinct tumor entities in conjunction with their respective predominant germline defects is particularly important. In our multicenter study, we investigated genetic susceptibility to mBC by evaluating the prevalence of PVs in *BRCA1/2* using a study sample of 614 patients with mBC and screening their blood-derived DNA samples with multi-gene panel analyses for potentially relevant PVs in 23 non-*BRCA1/2* genes. As the largest nationwide sample, with 340 of 614 patients with mBC undergoing comprehensive genetic screening, this study contributes to decoding the genetic predisposition to mBC and reassessing the previously obtained contradictory study results. As expected, the role of *BRCA2* as a key risk gene for mBC was highlighted. [12] In the overall study sample, 23.1% (142/614) of patients with mBC carried a PV in *BRCA2*. Further, as PVs in *BRCA1* accounted for 4.6% of the cases, *BRCA1* was the second most frequently altered BC predisposition gene. While *BRCA2* represents an established BC risk gene for both female and male BC, literature regarding the association between *BRCA1* and mBC is limited. The results of our study are in line with those of Li et al. [10], who were among the first to demonstrate a significant association between mBC and PVs in *BRCA1* (OR = 17.04, 95% CI 10.54–26.82,  $p < 10^{-5}$ ).

Consistent with the comprehensive population-specific analyses conducted by Rebbeck et al., we demonstrated that the PVs, *BRCA2* c.1813dup and *BRCA1* c.5266dup, are the most common variants in the mutational spectrum of mBC. [31] The investigation of available information on ER, PR, and HER2 status revealed predominantly ER-positive, PR-positive, and HER2-negative tumor presentation in the studied sample, consistent with previous findings characterizing the general cancer type in virile breast carcinoma. [32] In this context, Silvestri et al. previously showed that *BRCA1/2*-positive mBCs were more likely to be ER-positive, PR-positive, and non-triple negative, compared with BC in female *BRCA1/2* carriers, suggesting that susceptibility to hereditary BC may be influenced by hormonal background differences between male and female *BRCA1/2* mutation carriers [12]. In our study focusing on mBC only, no association of the ER/PR/HER2 status with *BRCA1/2* PV occurrence was observed.

Among the non-*BRCA1/2* genes, our study confirmed a significantly increased risk association between mBC and PTVs in the BC predisposition genes *PALB2*, *CHEK2*, and *ATM*. This finding may be considered in mBC risk prediction models such as BOADICEA (Breast and Ovarian Analysis of Disease Incidence and Carrier Estimation Algorithm) [33]. We demonstrated the strongest association of mBC in carriers of PVs in *PALB2* with an OR of 14.77 ( $p < 0.0001$ ) compared with that in ExAC controls. As a functional partner and localizer of *BRCA2*, the tumor suppressor gene *PALB2* is critically involved in the homologous recombination (HR) repair mechanism of double-strand breaks [34]. Consistent with previously reported associations between PVs in *PALB2* and mBC (with corresponding ORs ranging from 9.63–17.30) [20], our findings contribute to the accumulating evidence for the relevance of *PALB2* in genetic testing for hereditary mBC [35,36]. The role of *CHEK2* in mBC has been discussed contradictorily in recent studies. A study by Pritzlaff et al. defined *CHEK2* as a moderate-risk gene [19], whereas other analyses could not confirm an association of *CHEK2* with genetic mBC predisposition [20,21]. In the present investigation, *CHEK2* represented the gene most frequently affected by PVs apart from *BRCA1/2*, with a PV prevalence of 3.2%, and a statistically significant association between PTVs in *CHEK2* and mBC risk was confirmed (OR = 3.78, 95% CI = 1.59–7.71,  $p = 0.002$ ). Furthermore, a statistically significant association was found between PTVs in *ATM* and mBC (mBC vs. ExAC controls OR = 3.36, 95% CI: 0.89–8.96,  $p = 0.04$ ), and the data indicate a younger AAD in *ATM* PV carriers. Future studies with larger sample sizes are required to conclusively

assess the role of *ATM* in mBC development, as our study cohort included only 5 *ATM* PV carriers. In contrast to the strikingly divergent frequencies of PTVs in *BRCA1/2* in male and female patients with BC, the prevalence of PTVs in other predisposition genes, including *PALB2*, *CHEK2*, and *ATM*, were comparable in both genders [18,37]. Patients with *BRCA1/2* PVs did not show an earlier disease onset than those without. Except for patients with mBC carrying pathogenic *ATM* variants, who showed a younger AAD of BC in our study sample, AAD does not seem to be a useful indicator of genetic mBC predisposition. Further, we could not support the results of Pritzlaff et al., who suggested that *CHEK2* c.1100delC carriers had a significantly younger AAD compared with that men in carrying PVs in other risk genes [19]. Our results support the NCCN guidelines for male invasive BC version 5.2020, which recommend genetic testing for all men with BC, regardless of their BC/OC FH. Based on this recommendation, we propose to expand the inclusion criteria for testing for genetic to all patients with mBC in Germany, regardless of their AAD, FH, or tumor phenotype. In conclusion, our study results continue to pursue the overall objective of better understanding genetic predisposition to mBC for developing appropriate clinical approaches for sex-specific risk prediction, which could lead to more targeted screening and treatment programs for male PV carriers. It remains to be determined whether the germline mutation status in *BRCA1/2*, *ATM*, *CHEK2* and *PALB2* predicts favourable or unfavourable targeted therapy response in mBC patients, e.g., regarding PARP or CDK4/6 inhibitors [38].

This study has limitations. Our study sample largely comprised patients with mBC who met the GC-HBOC inclusion criteria for germline testing. Therefore, these study results should be validated in a larger study sample of unselected patients with mBC. Further, the prevalence of PTVs in unaffected individuals was retrieved from ExAC non-Finnish Europeans (NFE) under the exclusion of TCGA instead of matched controls, which may have caused bias. The mBC patients who were initially tested for *BRCA1/2* mutations only and tested positive were not analyzed further using a more comprehensive gene panel.

## 5. Conclusions

In addition to PVs in the established mBC risk gene *BRCA2*, PVs in *BRCA1* are particularly associated with an increased risk of mBC. Our results further suggest the role of *PALB2*, *CHEK2*, and *ATM* in mBC predisposition, and support the benefit of multi-gene panel testing in patients with mBC. Due to the high prevalence of *BRCA1/2* PVs even in the absence of a BC/OC FH, our data provide a rationale to offer genetic counseling and multi-gene panel testing to all patients with mBC.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers14133292/s1>, Figure S1: Venn diagram of hormone receptor status of 323 individuals with male breast cancer. ER+/-: Estrogen receptor positive/negative. PR+/-: Progesterone receptor positive/negative. HER2 +/-: human epidermal growth factor receptor 2 positive/negative; Figure S2: Proportion of hormone receptor-positive tumors per age at first diagnosis (AAD) in 323 mBC patients. ER+: Estrogen receptor positive. PR+: Progesterone receptor positive. HER2+: human epidermal growth factor receptor 2 positive; Table S1: Pathogenic variants (PVs) in non-*BRCA1/2* genes detected in 32/340 mBC patients. AAD = age at first diagnosis, CNV = copy number variation, PTV = protein truncating variant, mBC = male breast cancer; Table S2: Binary logistic regression analyses with tumor receptor status as the outcome (1 = positive; 0 = negative) for 323 individuals with male breast cancer. Gene-wise covariates refer to pathogenic variant carrier status (1 = carrier; 0 = non-carrier). CI = confidence interval. SE = standard error.

**Author Contributions:** Conceptualization: J.H. (Jan Hauke), M.R., J.B., R.K.S., E.H.; Investigation: M.R., M.K., P.N., J.A., H.T.; Methodology: J.H. (Jan Hauke), E.H., M.R., K.M., C.E. (Corinna Ernst), J.B., R.K.S.; Software: C.E. (Corinna Ernst), M.R.; Formal Analysis: M.R., C.E. (Corinna Ernst), J.H. (Jan Hauke); Resources: B.W., J.H. (Jan Hauke), A.G., C.S., J.R. (Juliane Ramsner), D.N., J.H. (Judith Horváth), N.A., A.M., B.A., A.R., S.W.-G., J.R. (Julia Ritter), K.R., J.H. (Julia Hentschel), C.E. (Christoph Engel), E.H., R.K.S.; Data curation: M.R., J.B., C.E. (Corinna Ernst), J.H. (Jan Hauke), E.H.; Writing—original draft: M.R., J.B., C.E. (Corinna Ernst), K.M., J.H. (Jan Hauke), E.H.; Writing—review

& editing: all authors; Visualization: M.R., J.B., C.E. (Corinna Ernst); Validation: M.R., M.K.; Supervision: E.H., R.K.S., J.H. (Jan Hauke); Project administration: R.K.S., E.H., J.H. (Jan Hauke); Funding acquisition: R.K.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** The GC-HBOC is supported by the German Cancer Aid (grant no 110837 and grant no 70114178, coordinator: Rita K. Schmutzler, Cologne) and the Federal Ministry of Education and Research (BMBF), Germany (grant no 01GY1901). Genetic analyses were supported by the Köln Fortune Program, Faculty of Medicine, University of Cologne, Germany. The funding sources had no role in the design and conduct of the study; collection, management, analysis, and interpretation of the data; preparation, review, or approval of the manuscript; nor in the decision to submit the manuscript for publication.

**Institutional Review Board Statement:** Ethical approval was granted by the ethics committee of the University of Cologne (07-048, 22 March 2007).

**Informed Consent Statement:** Written informed consent was obtained from all patients.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy.

**Acknowledgments:** We are thankful to all patients who participated in this study.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

#### Abbreviations

AAD	age at first diagnosis
ACMG	American College of Medical Genetics
BC	breast cancer
CCG	Cologne Center for Genomics
CI	confidence interval
CNV	copy number variation
ER	estrogen receptor
ExAC	Exome Aggregation Consortium
FH	family history
GC-HBOC	German Consortium for Hereditary Breast and Ovarian Cancer
HER2	human epidermal growth factor receptor 2
IARC	International Agency for Research on Cancer
mBC	male breast cancer
MLPA	multiplex ligation-dependent probe amplification
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NFE	non-Finnish European
NGS	next-generation sequencing
PR	progesterone receptor
PTV	protein-truncating variant
PV	pathogenic variant
OC	ovarian cancer
OR	odds ratio
TCGA	The Cancer Genome Atlas
VUS	variant of uncertain significance

#### References

1. Konduri, S.; Singh, M.; Bobustuc, G.; Rovin, R.; Kassam, A. Epidemiology of Male Breast Cancer. *Breast* **2020**, *54*, 8–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Ly, D.; Forman, D.; Ferlay, J.; Brinton, L.A.; Cook, M.B. An International Comparison of Male and Female Breast Cancer Incidence Rates. *Int. J. Cancer* **2013**, *132*, 1918–1926. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Robert Koch-Institut. *Krebs in Deutschland 2015/2016*; Robert Koch-Institut, und Gesellschaft der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland, E.V.: Berlin, Germany, 2019. [[CrossRef](#)]
4. Giordano, S.H. Breast Cancer in Men. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *378*, 2311–2320. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

5. Leon-Ferre, R.A.; Giridhar, K.V.; Hieken, T.J.; Mutter, R.W.; Couch, F.J.; Jimenez, R.E.; Hawse, J.R.; Boughey, J.C.; Ruddy, K.J. A Contemporary Review of Male Breast Cancer: Current Evidence and Unanswered Questions. *Cancer Metastasis Rev.* **2018**, *37*, 599–614. [\[CrossRef\]](#)
6. Campos, F.A.B.; Rouleau, E.; Torrezan, G.T.; Carraro, D.M.; Casali da Rocha, J.C.; Mantovani, H.K.; da Silva, L.R.; Osório, C.A.B.d.T.; Moraes Sanches, S.; Caputo, S.M.; et al. Genetic Landscape of Male Breast Cancer. *Cancers* **2021**, *13*, 3535. [\[CrossRef\]](#)
7. Fentiman, I.S. Male Breast Cancer Is Not Congruent with the Female Disease. *Crit. Rev. Oncol./Hematol.* **2016**, *101*, 119–124. [\[CrossRef\]](#)
8. De Juan, I.; Palanca, S.; Domenech, A.; Feliubadaló, L.; Segura, Á.; Osorio, A.; Chirivella, I.; de la Hoya, M.; Sánchez, A.B.; Infante, M.; et al. BRCA1 and BRCA2 Mutations in Males with Familial Breast and Ovarian Cancer Syndrome. Results of a Spanish Multicenter Study. *Fam. Cancer* **2015**, *14*, 505–513. [\[CrossRef\]](#)
9. Ottini, L. Male Breast Cancer: A Rare Disease That Might Uncover Underlying Pathways of Breast Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2014**, *14*, 643–644. [\[CrossRef\]](#)
10. Li, S.; Silvestri, V.; Leslie, G.; Rebbeck, T.R.; Neuhausen, S.L.; Hopper, J.L.; Nielsen, H.R.; Lee, A.; Yang, X.; McGuffog, L.; et al. Cancer Risks Associated With BRCA1 and BRCA2 Pathogenic Variants. *J. Clin. Oncol.* **2022**, *40*, JCO2102112. [\[CrossRef\]](#)
11. Barnes, D.R.; Silvestri, V.; Leslie, G.; McGuffog, L.; Dennis, J.; Yang, X.; Adlard, J.; Agnarsson, B.A.; Ahmed, M.; Aittomäki, K.; et al. Breast and Prostate Cancer Risks for Male BRCA1 and BRCA2 Pathogenic Variant Carriers Using Polygenic Risk Scores. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **2021**, *114*, djab147. [\[CrossRef\]](#)
12. kConFab Investigators; Hereditary Breast and Ovarian Cancer Research Group Netherlands (HEBON); EMBRACE; Silvestri, V.; Barrowdale, D.; Mulligan, A.M.; Neuhausen, S.L.; Fox, S.; Karlan, B.Y.; Mitchell, G.; et al. Male Breast Cancer in BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers: Pathology Data from the Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2. *Breast Cancer Res.* **2016**, *18*, 15. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Ibrahim, M.; Yadav, S.; Ogunleye, F.; Zakalik, D. Male BRCA Mutation Carriers: Clinical Characteristics and Cancer Spectrum. *BMC Cancer* **2018**, *18*, 179. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Stratton, M.R.; Ford, D.; Neuhasen, S.; Seal, S.; Wooster, R.; Friedman, L.S.; King, M.-C.; Egilsson, V.; Devilee, P.; McManus, R.; et al. Familial Male Breast Cancer Is Not Linked to the BRCA1 Locus on Chromosome 17q. *Nat. Genet.* **1994**, *7*, 103–107. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Tai, Y.C.; Domchek, S.; Parmigiani, G.; Chen, S. Breast Cancer Risk Among Male BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **2007**, *99*, 1811–1814. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Hassett, M.J.; Somerfield, M.R.; Baker, E.R.; Cardoso, F.; Kansal, K.J.; Kwait, D.C.; Plichta, J.K.; Ricker, C.; Roshal, A.; Ruddy, K.J.; et al. Management of Male Breast Cancer: ASCO Guideline. *J. Clin. Oncol.* **2020**, *38*, JCO.19.03120. [\[CrossRef\]](#)
17. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). *Interdisziplinäre S3-Leitlinie Für Die Früherkennung, Diagnostik, Therapie Und Nachsorge Des Mammakarzinoms Version 4.3 AWMF-Registernummer: 032-045OL*; Version 4.3; Deutsche Krebsgesellschaft: Berlin, Germany, 2020.
18. Hauke, J.; Horvath, J.; Groß, E.; Gehrig, A.; Honisch, E.; Hackmann, K.; Schmidt, G.; Arnold, N.; Faust, U.; Sutter, C.; et al. Gene Panel Testing of 5589 BRCA1/2 -Negative Index Patients with Breast Cancer in a Routine Diagnostic Setting: Results of the German Consortium for Hereditary Breast and Ovarian Cancer. *Cancer Med.* **2018**, *7*, 1349–1358. [\[CrossRef\]](#)
19. Pritzlaff, M.; Summerour, P.; McFarland, R.; Li, S.; Reineke, P.; Dolinsky, J.S.; Goldgar, D.E.; Shimelis, H.; Couch, F.J.; Chao, E.C.; et al. Male Breast Cancer in a Multi-Gene Panel Testing Cohort: Insights and Unexpected Results. *Breast Cancer Res. Treat.* **2017**, *161*, 575–586. [\[CrossRef\]](#)
20. Rizzolo, P.; Zelli, V.; Silvestri, V.; Valentini, V.; Zanna, I.; Bianchi, S.; Masala, G.; Spinelli, A.M.; Tibiletti, M.G.; Russo, A.; et al. Insight into Genetic Susceptibility to Male Breast Cancer by Multigene Panel Testing: Results from a Multicenter Study in Italy: Multigene Panel Testing in Male Breast Cancer. *Int. J. Cancer* **2019**, *145*, 390–400. [\[CrossRef\]](#)
21. Fostira, F.; Saloustros, E.; Apostolou, P.; Vagena, A.; Kalfakakou, D.; Mauri, D.; Tryfonopoulos, D.; Georgoulas, V.; Yannoukakos, D.; Fountzilas, G.; et al. Germline Deleterious Mutations in Genes Other than BRCA2 Are Infrequent in Male Breast Cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **2018**, *169*, 105–113. [\[CrossRef\]](#)
22. Szwiec, M.; Tomiczek-Szwiec, J.; Kluźniak, W.; Wokolorczyk, D.; Osowiecka, K.; Sibilski, R.; Wachowiak, M.; Gronwald, J.; Gronwald, H.; Lubiński, J.; et al. Genetic Predisposition to Male Breast Cancer in Poland. *BMC Cancer* **2021**, *21*, 975. [\[CrossRef\]](#)
23. Tedaldi, G.; Tebaldi, M.; Zampiga, V.; Cangini, I.; Pirini, F.; Ferracci, E.; Danesi, R.; Arcangeli, V.; Ravegnani, M.; Martinelli, G.; et al. Male Breast Cancer: Results of the Application of Multigene Panel Testing to an Italian Cohort of Patients. *Diagnostics* **2020**, *10*, 269. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Wappenschmidt, B.; Hauke, J.; Faust, U.; Niederacher, D.; Wiesmüller, L.; Schmidt, G.; Groß, E.; Gehrig, A.; Sutter, C.; Ramser, J.; et al. Criteria of the German Consortium for Hereditary Breast and Ovarian Cancer for the Classification of Germline Sequence Variants in Risk Genes for Hereditary Breast and Ovarian Cancer. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* **2020**, *80*, 410–429. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. ACMG Laboratory Quality Assurance Committee; Richards, S.; Aziz, N.; Bale, S.; Bick, D.; Das, S.; Gastier-Foster, J.; Grody, W.W.; Hegde, M.; Lyon, E.; et al. Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet. Med.* **2015**, *17*, 405–423. [\[CrossRef\]](#)

26. Plon, S.E.; Eccles, D.M.; Easton, D.; Foulkes, W.D.; Genuardi, M.; Greenblatt, M.S.; Hogervorst, F.B.L.; Hoogerbrugge, N.; Spurdle, A.B.; Tavtigian, S.V.; et al. Sequence Variant Classification and Reporting: Recommendations for Improving the Interpretation of Cancer Susceptibility Genetic Test Results. *Hum. Mutat.* **2008**, *29*, 1282–1291. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Plagnol, V.; Curtis, J.; Epstein, M.; Mok, K.Y.; Stebbings, E.; Grigoriadou, S.; Wood, N.W.; Hambleton, S.; Burns, S.O.; Thrasher, A.J.; et al. A Robust Model for Read Count Data in Exome Sequencing Experiments and Implications for Copy Number Variant Calling. *Bioinformatics* **2012**, *28*, 2747–2754. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Exome Aggregation Consortium; Lek, M.; Karczewski, K.J.; Minikel, E.V.; Samocha, K.E.; Banks, E.; Fennell, T.; O'Donnell-Luria, A.H.; Ware, J.S.; Hill, A.J.; et al. Analysis of Protein-Coding Genetic Variation in 60,706 Humans. *Nature* **2016**, *536*, 285–291. [[CrossRef](#)]
29. Kääriäinen, H.; Muilu, J.; Perola, M.; Kristiansson, K. Genetics in an Isolated Population like Finland: A Different Basis for Genomic Medicine? *J. Community Genet.* **2017**, *8*, 319–326. [[CrossRef](#)]
30. Tomasik, B.; Bieńkowski, M.; Jassem, J. PARP Inhibitors beyond BRCA-Mutated Cancers: Precision Medicine at the Crossroads. *Precis. Cancer Med.* **2021**, *4*, 19. [[CrossRef](#)]
31. Rebbeck, T.R.; Friebel, T.M.; Friedman, E.; Hamann, U.; Huo, D.; Kwong, A.; Olah, E.; Olopade, O.I.; Solano, A.R.; Teo, S.-H.; et al. Mutational Spectrum in a Worldwide Study of 29,700 Families with BRCA1 or BRCA2 Mutations. *Hum. Mutat.* **2018**, *39*, 593–620. [[CrossRef](#)]
32. Cardoso, F.; Bartlett, J.M.S.; Slaets, L.; van Deurzen, C.H.M.; van Leeuwen-Stok, E.; Porter, P.; Linderholm, B.; Hedenfalk, I.; Schröder, C.; Martens, J.; et al. Characterization of Male Breast Cancer: Results of the EORTC 10085/TBCRC/BIG/NABCG International Male Breast Cancer Program. *Ann. Oncol.* **2018**, *29*, 405–417. [[CrossRef](#)]
33. Lee, A.; Yang, X.; Tyrer, J.; Gentry-Maharaj, A.; Ryan, A.; Mavaddat, N.; Cunningham, A.P.; Carver, T.; Archer, S.; Leslie, G.; et al. Comprehensive epithelial tubo-ovarian cancer risk prediction model incorporating genetic and epidemiological risk factors. *J. Med. Genet.* **2022**, *59*, 632–643. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Wu, S.; Zhou, J.; Zhang, K.; Chen, H.; Luo, M.; Lu, Y.; Sun, Y.; Chen, Y. Molecular Mechanisms of PALB2 Function and Its Role in Breast Cancer Management. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Silvestri, V.; Zelli, V.; Valentini, V.; Rizzolo, P.; Navazio, A.S.; Coppa, A.; Agata, S.; Oliani, C.; Barana, D.; Castrignanò, T.; et al. Whole-Exome Sequencing and Targeted Gene Sequencing Provide Insights into the Role of PALB2 as a Male Breast Cancer Susceptibility Gene: PALB2 Mutations in Male Breast Cancer. *Cancer* **2017**, *123*, 210–218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Ding, Y.C.; Steele, L.; Kuan, C.-J.; Greilac, S.; Neuhausen, S.L. Mutations in BRCA2 and PALB2 in Male Breast Cancer Cases from the United States. *Breast Cancer Res. Treat.* **2011**, *126*, 771–778. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Aloraifi, F.; McCartan, D.; McDevitt, T.; Green, A.J.; Bracken, A.; Geraghty, J. Protein-Truncating Variants in Moderate-Risk Breast Cancer Susceptibility Genes: A Meta-Analysis of High-Risk Case-Control Screening Studies. *Cancer Genet.* **2015**, *208*, 455–463. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Zheng, G.; Leone, J.P. Male Breast Cancer: An Updated Review of Epidemiology, Clinicopathology, and Treatment. *J. Oncol.* **2022**, *2022*, 1734049. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

## 4. Diskussion

Das Mammakarzinom des Mannes ist eine seltene Erkrankung und stellt weiterhin eine große Herausforderung in seiner klinischen Bewältigung dar. Während die Erforschung der Erkrankung bei Frauen in den vergangenen Jahrzehnten enorme Fortschritte erzielen konnte, persistieren entscheidende Wissenslücken in der geschlechtsspezifischen Aufarbeitung der Erkrankung. Insbesondere Untersuchungen zur genetischen Prädisposition des familiären Brust- und Eierstockkrebses bei weiblichen Patientinnen haben in den letzten Jahrzehnten signifikante Durchbrüche erzielt und dazu beigetragen, das Verständnis für die Vererbung dieser Krebsart zu vertiefen und effektivere präventive und diagnostische sowie therapeutische Ansätze zu entwickeln. Dementsprechend konnten sich umfassende Multigenpaneltestungen weltweit als diagnostischer Standard etablieren und dienen im Rahmen der Präzisionsonkologie als Voraussetzung für gezielte risikoadjustierte Überwachungsprogramme zur Krebsfrüherkennung sowie für gezielte Therapien. Allerdings beschränken sich die Anstrengungen auf dem Gebiet der genetischen Prädispositionsforschung bislang vordergründig auf weibliche Brustkrebspatientinnen, während die Situation für Männer komplex und bislang undurchsichtig erscheint. Um sicherzustellen, dass alle Patienten gleichermaßen von den Fortschritten in diesem Bereich profitieren können, ist die Berücksichtigung der geschlechtsspezifischen Unterschiede bei der genetischen Prädisposition für familiären Brust- und Eierstockkrebs von besonderer Bedeutung. Im Rahmen unserer umfangreichen multizentrischen Studie haben wir die genetische Ursache für männlichen Brustkrebs untersucht. Hierbei konnten wir die Prävalenz pathogener Varianten in den bekannten Hochrisikogenen *BRCA1/2* anhand einer repräsentativen Stichprobe von 614 männlichen Brustkrebspatienten analysieren, die in den Zentren des DK FBREK betreut wurden. Zusätzlich wurden mithilfe von Multigenpanel-Analysen die zur Testung vorliegenden DNA-Proben auf potenziell relevante pathogene Varianten in 23 weiteren nicht-*BRCA* Genen analysiert. Als umfangreichste bundesweite Stichprobe ihrer Art, leistet die vorliegende Untersuchung einen wichtigen Beitrag in der Entschlüsselung der genetischen Vorbelastung für männlichen Brustkrebs und ermöglicht eine Neubewertung der zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse früherer Studien auf diesem Gebiet. Durch die Kombination von *BRCA1/2*-Analysen und der Untersuchung weiterer relevanter Gene können wir ein detaillierteres Bild der genetischen Faktoren zeichnen, die eine Rolle in der Pathogenese des männlichen Mammakarzinoms spielen. Die Ergebnisse dieser Studie könnten nicht nur dazu beitragen, die Risikoabschätzung und Präventionsstrategien für männliche Brustkrebspatienten zu verbessern, sondern auch dazu beitragen, die genetische Beratung und die Behandlungsmöglichkeiten für diese Patientengruppe zu optimieren.

In Übereinstimmung mit vorangegangenen Forschungsarbeiten auf diesem Gebiet konnten wir in unserer Studie erneut die herausragende Rolle von *BRCA2* als Hauptrisikogen im Zusammenhang mit Brustkrebs bei Männern betonen.<sup>23,68,128</sup> In der Gesamtstichprobe wiesen 23,1% (142/614) der untersuchten männlichen Brustkrebspatienten pathogene Varianten in *BRCA2* auf. Weiterhin konnten basierend auf Sequenzierungsergebnissen des ExAC-Kontrolldatensatzes Fall-Kontrollanalysen durchgeführt werden, um Assoziationen zwischen männlichem Brustkrebs und pathogenen Varianten in den ausgewählten vermuteten Risikogenen zu bewerten. Pathogene Varianten in *BRCA2* waren signifikant mit dem männlichen Mammakarzinom assoziiert (*BRCA2*: OR = 77.41, 95% CI = 58.71–102.33, Fisher's exact test  $p < 0.0001$ ). Während *BRCA2* sowohl für den weiblichen als auch für männlichen Brustkrebs ein etabliertes Risikogen darstellt, wurde die Bedeutung von pathogenen *BRCA1* Veränderungen im Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko für Brustkrebs bei Männern bislang als umstritten angesehen. Pathogene Varianten in *BRCA1* konnten im Rahmen unserer Untersuchungen in 4,6% der Fälle (28/614) nachgewiesen werden und stellten damit die am zweithäufigsten vorkommenden Genveränderungen in unserer Kohorte dar. Die Ergebnisse unserer Studie konnten einen signifikanten Zusammenhang zwischen männlichem Brustkrebs und pathogenen Varianten in *BRCA1* nachweisen (OR = 17,04, 95% CI 10,54-26,82,  $p < 10^{-5}$ ) und stehen im Einklang mit vorangegangenen Forschungsergebnissen von Li et al.<sup>140</sup>, die als eine der ersten entsprechenden Zusammenhang beschrieben. Wie auch die umfassenden populationsspezifischen Analysen von Rebbeck et al. ergaben, stellten die pathogenen Varianten *BRCA2* c.1813dup und *BRCA1* c.5266dup ebenso in unseren Untersuchungen die häufigsten Varianten des Mutationsspektrums dar.<sup>141</sup>

Im Unterschied zum Mammakarzinom der Frau, zeigte die Auswertung unserer Kohortenanalyse weder eine Korrelation zwischen dem Genotyp und Tumorphänotyp, noch zwischen dem Genotyp und dem Ersterkrankungsalter. Die Untersuchung der verfügbaren Informationen bezüglich des ER- (Östrogenrezeptor), PR- (Progesteronrezeptor) und HER2-Status ergab, dass die untersuchte Stichprobe überwiegend ER-positive, PR-positive und HER2-negative Tumore aufwies. Dies entspricht den bisherigen Erkenntnissen zur Charakterisierung des allgemeinen Tumortyps beim männlichen Mammakarzinom.<sup>10,14</sup> Während *BRCA1*-assoziierte Tumore bei Frauen charakteristische pathologische Merkmale aufweisen und tendenziell häufiger triple-negative Eigenschaften präsentieren, wird dieser Phänotyp bei Männern nur in sehr seltenen Fällen beobachtet.<sup>23</sup> Im Rahmen unserer Analysen konnten wir keinen Zusammenhang zwischen dem ER/ PR/ HER2-Status und dem Vorhandensein von pathogenen Varianten in den *BRCA1/2* Genen feststellen. Silvestri et al. zeigten zuvor, dass *BRCA1/2*-positive männliche Mammakarzinome im Vergleich zum weiblichen Pendant unterschiedliche pathologische Merkmale aufweisen und sich häufiger

positiv für Hormonrezeptoren (ER-positiv und PR-positiv) präsentieren.<sup>15</sup> Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die genetische Anfälligkeit für erblichen Brustkrebs möglicherweise durch Unterschiede im hormonellen Hintergrund zwischen männlichen und weiblichen *BRCA1/2* Mutationsträger/innen beeinflusst wird.<sup>15,23</sup> Darüber hinaus werden *BRCA1/2*-assoziierte Mammakarzinome bei Frauen in der Regel in einem jüngeren Alter diagnostiziert als in der Allgemeinbevölkerung, wohingegen bei Männern mit einer entsprechenden *BRCA1/2*-Mutation dies nicht der Fall zu sein scheint.<sup>23,48,52</sup> Das mittlere Ersterkrankungsalter der in unserer Kohorte untersuchten *BRCA1/2*-Variantenträger betrug 62 Jahre (*BRCA1*: Spanne 33-81 Jahre; *BRCA2*: Spanne 37-83 Jahre), wobei ein statistisch signifikanter Unterschied zu *BRCA1/2*-negativen Patienten beobachtet wurde (Mittelwert 59 Jahre, Spanne 22-91 Jahre, Welch's t-Test  $p = 0,005$ ).

Weiterhin ergab die Untersuchung der Gesamtstichprobe eine statistisch signifikant höhere Nachweisrate von pathogenen Varianten in *BRCA1/2* in der Gruppe der Patienten mit positiver Familienanamnese (Fisher's Exact Test  $p < 10^{-7}$ ). Von den Patienten mit positiver Familienanamnese trugen 33,5% (154/460) pathogene Varianten in den Hochrisikogenen *BRCA1/2*, während auch bei 11% (16/146) der Patienten ohne positive Familienanamnese entsprechende Keimbahnvarianten festgestellt wurden. Dennoch wird die familiäre Krankheitsgeschichte bei Männern mit Brustkrebs im Vergleich zur Erkrankung bei Frauen als wesentlich schwächerer Vorhersagefaktor für das Vorhandensein einer pathogenen *BRCA1/2*-Variante angesehen.<sup>3</sup> Aufgrund unserer Erkenntnisse, die darauf hinweisen, dass pathogene Varianten in den Genen *BRCA1/2* auch in Abwesenheit einer familiären Brust- oder Eierstockkrebsanamnese relativ häufig vorkommen und die Mutationsnachweiswahrscheinlichkeit von 10% übersteigt, gibt es eine klare Argumentation dafür, allen männlichen Brustkrebspatienten eine genetische Beratung und Keimbahntestung in der diagnostischen Abklärung anzubieten. Im Rahmen der wissensgenerierenden Versorgungsforschung des DK FBREK konnte basierend auf den in dieser Arbeit präsentierten Untersuchungsergebnissen seit 2023 das singuläre männliche Mammakarzinom als weiteres Einschlusskriterium validiert werden. Die genetische Keimbahnanalyse ist demnach bei allen an Brustkrebs erkrankten Männern ohne weitere familiäre Brust- oder Eierstockkrebserkrankungen, sowie unabhängig vom Erstdiagnosealter und Tumorphänotyp indiziert und in Kooperation mit den zertifizierten FBREK-Zentren abrechenbar (<https://www.krebsgesellschaft.de/zertdokumente.html>).

**Checkliste zur Erfassung einer möglichen erblichen Belastung für Brust- und/oder Eierstockkrebs<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Mammakarzinom inkl. DCIS, Ovarialkarzinom inkl. Borderline-Tumore (BOT), primäre Tuben- u. Peritonealkarzinome u. STIC

Name Patientin/Patient:  Geburtsdatum:



**A. Patient/in und deren Geschwister / Kinder**

Auftreten bei Patientin/Patient	Anzahl	Gewichtung	Ergebnis
eines Mammakarzinoms bei der Patientin vor dem 36. Geburtstag		3	0
eines triple-negativen Mammakarzinoms bei der Patientin vor dem 60. Geburtstag*		3	0
eines unilateralen Mammakarzinoms bei der Patientin vor dem 50./51.* Geburtstag		2	0
eines bilateralen Mammakarzinoms bei der Patientin, das erste vor dem 50./51.* Geburtstag		3	0
eines uni- oder bilateralen Mammakarzinoms bei der Patientin nach dem 51. Geburtstag		1	0
eines uni- oder bilateralen Mammakarzinoms bei dem Patienten (männlich)*		3	0
eines Ovarialkarzinoms bei der Patientin vor dem 60. Geburtstag*		3	0
eines Ovarialkarzinoms bei der Patientin		2	0
<b>Auftreten bei Kindern, Geschwistern und deren Kindern</b>			
eines Mammakarzinoms bei Schwestern/Töchtern/Nichten vor dem 36. Geburtstag		3	0
eines unilateralen Mammakarzinoms bei Schwestern/Töchtern/Nichten vor dem 50./51.* Geburtstag		2	0
eines bilateralen Mammakarzinoms bei Schwestern/Töchtern/Nichten, das erste vor dem 50./51.* Geburtstag		3	0
eines uni- oder bilateralen Mammakarzinoms bei Schwestern/Töchtern/Nichten nach dem 51. Geburtstag		1	0
eines uni- oder bilateralen Mammakarzinoms bei Brüdern/Söhnen/Neffen		2	0
eines Ovarialkarzinoms bei Schwestern/Töchtern/Nichten		2	0
<b>A</b>			<b>0</b>

**Ausfüllhinweis**

Zunächst wird die Anzahl bekannter Erkrankungsfälle bei den Geschwistern und Kindern, einschließlich der aktuellen Erkrankung der Patientin sowie in der mütterlichen und väterlichen Linie erfragt.

Diese Zahlen werden mit den jeweiligen Gewichtungen multipliziert. Dann wird die Summe aus diesen Ergebnissen errechnet und in die Felder A und B und C eingetragen.

Der höhere der beiden Werte aus den Feldern B und C wird in Feld D eingetragen.

Der Gesamtscore errechnet sich dann aus der Summe der Felder A und D.

**Eine Risikoberatung in den ausgewiesenen Zentren ist bei Scores**

**≥ 3 Punkten zu empfehlen**

\*Diese Einschlusskriterien gelten nur in Kooperation mit den zertifizierten FBREK-Zentren, die diese im Rahmen der Wissen generierenden Versorgung validieren. Die anderen Einschlusskriterien entsprechen den Vorgabe des EBM.

Version: 06. Januar 2023 (C)  
 Ärztkammer Westfalen-Lippe,  
 Deutsche Krebsgesellschaft,  
 Deutsche Gesellschaft für Senologie,  
 Deutsches Konsortium für Erblichen Brust- und Eierstockkrebs

**B. Mütterliche Linie (incl. Mutter)**

Auftreten	Anzahl	Gewichtung	Ergebnis
eines Mammakarzinoms bei einer Angehörigen vor dem 36. Geburtstag		3	0
eines unilateralen Mammakarzinoms bei einer Angehörigen vor dem 50./51.* Geburtstag		2	0
eines bilateralen Mammakarzinoms bei einer Angehörigen, das erste vor dem 50./51.* Geburtstag		3	0
eines uni- oder bilateralen Mammakarzinoms bei einer Angehörigen nach dem 51. Geburtstag		1	0
eines Mammakarzinoms bei einem angehörigen Mann		2	0
eines Ovarialkarzinoms bei einer Angehörigen		2	0
<b>Summe weitere mütterliche Linie</b>			<b>B</b>

**C. Väterliche Linie (incl. Vater)**

Auftreten	Anzahl	Gewichtung	Ergebnis
eines Mammakarzinoms bei einer Angehörigen vor dem 36. Geburtstag		3	0
eines unilateralen Mammakarzinoms bei einer Angehörigen vor dem 50./51.* Geburtstag		2	0
eines bilateralen Mammakarzinoms bei einer Angehörigen, das erste vor dem 50./51.* Geburtstag		3	0
eines uni- oder bilateralen Mammakarzinoms bei einer Angehörigen nach dem 51. Geburtstag		1	0
eines Mammakarzinoms bei einem angehörigen Mann		2	0
eines Ovarialkarzinoms bei einer Angehörigen		2	0
<b>Summe väterliche Linie</b>			<b>C</b>

**D. Der höhere Wert aus B und C**

**D** 0

**E. Summe aus A und D = Risiko-Score**

**A+D** 0

Abbildung 1: Checkliste zur Erfassung einer möglichen erblichen Belastung für Brust- und/oder Eierstockkrebs (Quelle: <https://www.krebsgesellschaft.de/zertdokumente.html>)

Das Ergebnis der genetischen Testung kann potenziell therapeutische Relevanz haben und ermöglicht die Identifizierung von Familien, die bislang nicht durch die festgelegten Kriterien erfasst wurden. Ebenso können gesunde Familienangehörige durch eine risikoadaptierte Prävention und gegebenenfalls von einer psychosozialen Entlastung profitieren. Darüber hinaus erlaubt die Keimbahnanalyse eine personalisierte Risikoprädiktion für assoziierte Karzinome, wie zum Beispiel das Prostatakarzinom.

Neben der beschriebenen Risikoerhöhung für Brutkrebs bei Männern werden pathogene *BRCA1* und insbesondere *BRCA2* Varianten ebenso mit einem erhöhten Risiko für Prostatakrebs assoziiert.<sup>142,143</sup> In einer kürzlich durchgeführten prospektiven Studie wurde das kumulative Lebenszeitrisiko, bis zum Alter von 85 Jahren an Prostatakrebs zu erkranken, für *BRCA1*-Träger auf 29% und für *BRCA2*-Träger auf 60% geschätzt.<sup>143</sup> Obwohl die Rolle der beiden Hochrisikogene in der Entstehung von Prostatakrebs noch nicht abschließend geklärt wurde, werden pathogene Varianten in beiden Genen mit einer aggressiveren Erkrankung und einer ungünstigeren Prognose in Verbindung gebracht.<sup>142,144</sup> Gleichzeitig eröffnet die Biologie der Tumorzellen mit *BRCA1/2*-Mutationen die Möglichkeit einer gezielten Therapie durch den Einsatz von PARP-Inhibitoren. Initial zugelassen in der

Behandlung des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms und folgend beim fortgeschrittenen Mamma- und Pankreaskarzinom mit entsprechend vorliegendem Nachweis einer *BRCA1/2*-Mutation, ist der Einsatz von PARP-Inhibitoren ebenfalls in der Behandlung des Prostatakarzinoms indiziert.<sup>145,146,147</sup> Die Empfehlung zur *BRCA1/2* Testung richtet sich der aktuellen S3-Leitlinie Prostatakarzinom zufolge auf Basis der PROfound-Studie an Patienten mit metastasiertem, kastrationsresistentem Prostatakarzinom, bei denen bereits eine Therapie mit neuen hormonellen Substanzen durchgeführt wurde. Die Entscheidung für eine prädiktive genetische Testung auf prädisponierende Keimbahnmutationen wird in der Regel auf individueller Basis getroffen und folgt bislang keinen standardisierten Richtlinien. Die individuelle Risikobewertung für Prostatakrebs orientiert sich an verschiedenen Faktoren, einschließlich der Familiengeschichte, des Alters des Patienten und weiterer klinischer Merkmale. Zukünftige Kooperationsprojekte und die Schaffung von Schnittstellen zwischen den Bereichen der gynäkologischen und urologischen Beratung sowie der Humangenetik könnten ausschlaggebend sein, um die Versorgung und Beratung zu verbessern. Aktuell plant das DK FBREK in Kooperation mit der Martini-Klinik Prostatakrebszentrum Hamburg bezüglich des erhöhten Risikos, an einem Prostatakrebs zu erkranken, eine intensivierete Früherkennung im Rahmen einer klinischen Studie zu etablieren.

Obwohl Multigenpanels in der Brustkrebsdiagnostik immer häufiger als etablierter Standard eingesetzt werden, gibt es bisher nur eine begrenzte Anzahl an Studien, die den Einfluss von pathogenen Varianten in anderen Genen als *BRCA1/2* auf das Brustkrebsrisiko bei Männern untersucht haben. In unseren umfassenden Untersuchungen konnten wir bestätigen, dass eine signifikante Risikoassoziation zwischen männlichem Brustkrebs und pathogenen Varianten in den vermuteten Brustkrebs-Prädispositionsgenen *PALB2*, *CHEK2* und *ATM* besteht. Insbesondere bei männlichen Trägern pathogener Varianten im Tumorsuppressorgen *PALB2* ist das Risiko für Brustkrebs mit einer Odds Ratio (OR) von 14,77 ( $p < 0,0001$ ), verglichen mit den berücksichtigten ExAC-Kontrollen, am stärksten erhöht. Unsere Befunde stehen im Einklang mit vorherigen Forschungsarbeiten, die bereits Assoziationen zwischen pathogenen Varianten in *PALB2* und dem Risiko für männlichen Brustkrebs mit entsprechenden Odds Ratios zwischen 9,63 und 17,30 nachgewiesen haben.<sup>68,148</sup> Das Ergebnis unterstreicht damit die Bedeutung von *PALB2*, welches als funktioneller Partner von *BRCA2* eine entscheidende Funktion im Reparaturmechanismus der homologen Rekombination von Doppelstrangbrüchen übernimmt und bei genetischen Testungen zur Identifizierung erblicher Brustkrebsfälle bei Männern einbezogen werden sollte.<sup>57,65,66</sup>

In ihren Empfehlungen hat die ACMG kürzlich darauf hingewiesen, dass pathogene *PALB2*-Keimbahnmutationen ebenso im Hinblick auf Therapieentscheidungen und im Rahmen von

Studien als äquivalent zu *BRCA1/2*-Varianten betrachtet werden sollten.<sup>149</sup> Neben dem verbundenen erhöhten Brustkrebsrisiko, wurden pathogene *PALB2* Keimbahnmutationen auch in Familien mit einer erhöhten Inzidenz von Bauchspeicheldrüsenkrebs nachgewiesen. Inwiefern mögliche verbundene Risiken im Rahmen einer genetischen Beratung bei männlichen Ratsuchenden kommuniziert werden sollen, ist weiterhin fraglich.

Die Rolle von *CHEK2* im Zusammenhang mit männlichem Brustkrebs wurde in jüngsten Untersuchungen kontrovers diskutiert. Eine Studie von Pritzlaff et al. stufte *CHEK2* als moderates Risikogen ein.<sup>47</sup> Im Gegensatz dazu konnten andere Analysen keinen klaren Zusammenhang zwischen *CHEK2* und der genetischen Anfälligkeit für männlichen Brustkrebs zeigen.<sup>68,44</sup> Die vorliegende Erhebung ergab, dass pathogene Varianten in *CHEK2* mit einer Prävalenz von 3,2% (11/340) die am häufigsten auftretenden genetischen Abweichungen in der Gruppe der Patienten ohne *BRCA1/2*-Mutation darstellten. Außerdem konnten wir einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen pathogenen Varianten in *CHEK2* und dem Brustkrebsrisiko bestätigen (OR = 3,78, CI: 1,59-7,71, p = 0,002).

Während der Zusammenhang zwischen pathogenen Keimbahnvarianten im *CHEK2*-Gen und der Prädisposition für Brustkrebs bei Frauen seit Jahren bekannt ist, sind die Möglichkeiten für den Umgang auch im Patientenkollektiv weiblicher Mutationsträgerinnen in der klinischen Praxis weiterhin begrenzt. Die aktuellen Praxisempfehlung der ACMG verdeutlichen, dass die Spannweite des assoziierten Brustkrebsrisikos in ihrer Ausprägung erheblich variiert und das Erkrankungsrisiko von einer Reihe weiterer Faktoren beeinflusst wird.<sup>150</sup> Demnach sollten sich klinische Entscheidungen an einer individuellen Risikoabschätzung orientieren, die von Experten durchgeführt wird. Derzeit werden Brustkrebspatienten mit zugrundeliegender *CHEK2*-Keimbahnmutation keine gezielten medizinischen Behandlungen empfohlen.

Die gegenwärtigen Untersuchungsergebnisse haben darüber hinaus eine statistisch signifikante Korrelation zwischen pathogenen Varianten in *ATM* und dem Auftreten von Brustkrebs bei Männern aufgezeigt (OR = 3,36, CI: 0,89-8,96, p = 0,04). Da unsere Kohorte lediglich 5 Träger pathogener *ATM*-Varianten umfasste, sind zukünftige Studien mit größeren Stichproben erforderlich, um die Rolle von *ATM* abschließend zu bewerten und das Brustkrebsrisiko für Männer mit pathogenen Veränderungen in diesem Gen genauer einzuschätzen.<sup>151</sup> Im Gegensatz zu den auffälligen Unterschieden in der Häufigkeitsverteilung pathogener Varianten in den Brustkrebsrisikogenen *BRCA1* und *BRCA2* zwischen männlichen und weiblichen PatientInnen, präsentiert sich die Prävalenz pathogener Varianten in anderen Genen, die zur genetischen Prädisposition beitragen, wie *PALB2*, *CHEK2* und *ATM* weitestgehend ähnlich bei beiden Geschlechtern.<sup>23,62</sup> Es sind zusätzliche Assoziationsstudien sowohl in Familien mit bekanntem Brustkrebsrisiko als auch

in der Allgemeinbevölkerung erforderlich, um den Zusammenhang von Genen wie *PALB2*, *CHEK2* und *ATM* und dem Auftreten von Brustkrebs bei Männern weiter zu bestätigen.

Durch den Zugewinn weiterer Evidenz können präzisere Risikoberechnungen und Empfehlungen für die Früherkennung und Prävention von Brustkrebs bei betroffenen Männern entwickelt werden. Gene mit hoher Penetranz wie *BRCA1* und *BRCA2* sowie die beschriebenen Gene mit fraglicher moderater Penetranz wie *CHEK2*, *PALB2* und *ATM* können die genetische Anfälligkeit für männlichen Brustkrebs nicht vollständig erklären. Ebenso sind umfangreichere Studien notwendig, um die Bedeutung der weiteren untersuchten Gene genauer zu analysieren, die nur selten pathogene Varianten aufweisen.

Von besonderer klinischer Bedeutung könnte künftig zusätzlich die Berücksichtigung der Auswirkung mehrerer krankheitsassoziierter Niedrigrisikovarianten sein, die in Ihrer Kombination als Polygenic Risk Score (PRS) multiplikativ wirken und eine genauere Bewertung des individuellen Krebsrisikos ermöglichen. Das CanRisk Prostate Modell gilt in diesem Sinne als erstes validiertes Modell zur personalisierten Risikoabschätzung für Prostatakrebs.<sup>152</sup> Es bietet die Grundlage für eine präzise Beratung von Männern hinsichtlich ihres persönlichen Erkrankungsrisikos und eröffnet Perspektiven für die Implementierung risikoadaptierter Screeningstrategien. Obwohl es derzeit nicht möglich ist, das Brustkrebsrisiko für Männer in der Allgemeinbevölkerung mittels PRS zu differenzieren, könnten männliche *BRCA1/2* Keimbahnvariantenträger eine Untergruppe darstellen, die möglicherweise von einer genaueren Risikostratifizierung mittels PRS profitierten. Die Ergebnisse der bisher größten verfügbaren Fall-Kontroll-Studie von Barnes et al. konnten zeigen, dass die kürzlich entwickelten PRS ebenfalls jeweils mit dem Risiko für Brust- und Prostatakrebs bei männlichen Trägern pathogener Varianten in *BRCA1/2* assoziiert sind.<sup>53</sup> Neben Barnes et al. konnten auch Lecarpentier et al. eine signifikante Assoziation zwischen der PRS und dem Brust- und Prostatakrebsrisiko bei Männern mit pathogenen *BRCA1/2* Varianten nachweisen.<sup>40</sup> Die Integration eines PRS in die klinische Praxis könnte die Möglichkeiten zur präziseren Stratifizierung des individuellen Brust- und Prostatakrebsrisikos bei männlichen *BRCA1/2*-Variantenträgern erweitern und dazu beitragen, individuelle Präventionsstrategien für Männer mit entsprechend zugrundeliegenden Keimbahnveränderungen zu entwickeln. Inwieweit die Einbindung dieser PRS die klinischen Entscheidungen und die Versorgung von männlichen *BRCA1/2*-Trägern beeinflusst, sollte im Rahmen zukünftiger Implementierungsstudien ermittelt werden.<sup>53</sup>

Die Ergebnisse unserer Untersuchung könnten ebenso im Hinblick auf die Entwicklung von Risikovorhersagemodellen, wie beispielsweise das auf dem BOADICEA-Modell (Breast and Ovarian Analysis of Disease Incidence and Carrier Estimation Algorithm)<sup>153</sup> basierende Online-Tool CanRisk berücksichtigt werden. Das umfassende multifaktorielle Modell zur Risikostratifizierung integriert neben den Auswirkungen von pathogenen Varianten in

*BRCA1/2*, *PALB2*, *CHEK2* und *ATM* auch einen PRS, sowie weitere bekannte Risikofaktoren und zielt in seiner Kombination darauf ab, die Bewertung des individuellen Brustkrebsrisikos zu optimieren und Entscheidungen über Präventions- und Screeningstrategien zu treffen.

Aufgrund der Seltenheit der Erkrankung und der damit verbundenen bislang unzureichenden Studienlage ergeben sich gegenwärtig besondere Herausforderungen in der klinischen Versorgung des männlichen Mammakarzinoms. Eines der Hauptprobleme stellt weiterhin das begrenzte Bewusstsein für Brustkrebs bei Männern in der Öffentlichkeit und beim medizinischen Personal dar. Während der weibliche Brustkrebs eine breite öffentliche Aufmerksamkeit erfährt und Brustkrebszentren etablierte Strukturen für die Routineversorgung bieten, die speziell auf die medizinischen und psychosozialen Bedürfnisse von Frauen ausgerichtet sind, sind diese für männliche Patienten bislang begrenzt und wenig zugänglich. Das Forschungsprojekt „N-MALE“ hat sich mit der medizinischen und psychosozialen Bedürfnissituation von männlichen Brustkrebspatienten in Bezug auf Prävention, Diagnose, Behandlung, Rehabilitation und Nachsorge befasst. Ziel war es, herauszufinden, welche Maßnahmen ergriffen werden können, um die Versorgung der Betroffenen langfristig zu verbessern.<sup>154</sup> Von entscheidender Bedeutung ist es, das Bewusstsein für Brustkrebs bei Männern sowohl in der Öffentlichkeit als auch in der wissenschaftlichen Forschung zu stärken, um frühzeitige Diagnosen zu ermöglichen und gleichzeitig Unsicherheiten im Umgang mit der Erkrankung und Stigmatisierung zu reduzieren. Perspektivisch sollten im Gesundheitssystem Strukturen etabliert werden, die entsprechenden Zugang sicherstellen und klare Verantwortlichkeiten in der interdisziplinären Versorgung an Brustkrebs erkrankter Männer festlegen. Vorangegangene Untersuchungen konnten in diesem Zusammenhang ebenso die Notwendigkeit unterstreichen, geschlechtsspezifische evidenzbasierte Gesundheitsinformationen bereitzustellen, die Patienten bei ihrer partizipativen Entscheidungsfindung unterstützen sollen.<sup>156</sup> Ein wesentlicher Aspekt stellt außerdem der Bedarf an Informationen über die möglichen Auswirkungen einer genetischen Veranlagung, ebenso im Hinblick auf mögliche psychosozialen Effekte dar.<sup>156,157</sup>

Idealerweise sollte die genetische Beratung eine individuelle Risikobewertung, geeignete genetische Tests und ein personalisiertes onkologisches Versorgungsprogramm für männliche Brustkrebspatienten und ihre potenziell gefährdeten gesunden Familienangehörigen entsprechend ihrer spezifischen genetischen Veranlagung vorsehen.<sup>3</sup> Bei männlichen Brustkrebspatienten stellt die genetische Testung auf Keimbahnmutationen in *BRCA1/2* und *PALB2* die erste Wahl für die Mutationsanalyse dar. Darüber hinaus können zusätzliche Gene, die mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko assoziiert werden, wie *ATM* und *CHEK2* für die genetische Testung in Betracht gezogen werden. Es besteht jedoch nach

wie vor Unsicherheit darüber, in welchem Umfang die jeweiligen Risiken in der klinischen Praxis oder ausschließlich im Rahmen von Forschungsprojekten kommuniziert werden sollten. Die Analyse weiterer Gene, wie *TP53*, *STK11* und *PTEN* kann erwogen werden, sofern die Familienanamnese auf entsprechende Syndrome wie Li-Fraumeni, Cowden- oder Peutz-Jeghers hindeutet. Gegenwärtig liegt keine formelle Empfehlung für den Einsatz von Multigenpaneltestungen in der genetischen Beratung von männlichen Brustkrebspatienten vor und es fehlt weiterhin an ausreichender Evidenz, um ein spezifisches Genpanel für Männer mit Brustkrebs vorzuschlagen. Aufgrund der Seltenheit der Erkrankung könnten internationale Kooperationsbemühungen erforderlich sein, um diese Frage zu klären. Gerade im Hinblick auf die zukünftige Erforschung und Bewertung der Risikogene bietet das dynamische TruRisk® Genpanel des DK-FBREK entscheidende Vorteile. Die umfassende Genpanelanalyse berücksichtigt neben den etablierten Risikogenen weitere noch zu validierende Kandidatengene und ihr standardisierter Einsatz sollte ebenso in die genetische Diagnostik männlicher Brustkrebspatienten integriert werden.

Die Anwendung von Multigenpanelanalysen ermöglichen durch die massive parallele Untersuchung von vielen Bereichen des Genoms die Identifizierung zahlreicher Sequenzvarianten. Im Vergleich zu Einzeltestungen führt dies jedoch dazu, dass die Anzahl nicht eindeutig klassifizierbarer Varianten steigt. Eine besondere Herausforderung stellt in diesem Zusammenhang die funktionelle Charakterisierung und Interpretation dieser sogenannten Varianten mit unklarer Signifikanz (VUS) dar. Das DK FBREK hat auf die steigende Anzahl genetischer VUS und die fortlaufende Analyse neuer Risikogene mit verschiedenen Maßnahmen reagiert, die einem mittlerweile standardisierten Ansatz folgen.<sup>129,158</sup> Durch die Einrichtung eines interdisziplinären Expertengremiums (VUS Task Force) werden die von den Konsortialzentren gemeldeten Genvarianten hinsichtlich ihrer Klassifizierung geprüft und gegebenenfalls der aktuellen Datenlage angepasst. In diesem Zusammenhang wurden eigene Richtlinien für die Klassifizierung von Sequenzvarianten in den bekannten Risikogenen für Brust- und Eierstockkrebs erstellt, die auf den Richtlinien des internationalen ENIGMA-Konsortiums (Evidence-based Network for the Interpretation of Germline Mutant Alleles; <https://enigmaconsortium.org>) für *BRCA1/2* und den ACMG-Richtlinien (American College of Medical Genetics) basieren. Im Rahmen von weiteren Analysen wie das von der Deutschen Krebshilfe unterstützte Forschungsprojekt HerediVar des DK-FBREK, das darauf abzielt die Neubewertung in Zukunft automatisiert und damit schneller durchzuführen, soll die Rate genetischer VUS reduziert werden.<sup>159</sup> Darüber hinaus konnte das Konsortium ein Rückrufsystem etablieren, das sicherstellt, dass Träger von Sequenzvarianten im Falle einer aufgrund neuer Erkenntnisse aktualisierten Variantenbewertung unverzüglich über die angepasste Klassifizierung durch die Task Force

informiert werden. Weiterhin wurden multiprofessionelle genetische Diagnostikgremien eingeführt, die Mutationen hinsichtlich ihrer klinischen Auswirkungen bewerten. Inwieweit assoziierte Risiken kommuniziert werden, sollte gerade im Hinblick auf mögliche Screening- und Behandlungsoptionen sowie potenzielle psychische Auswirkungen auf die Betroffenen untersucht werden.

Bislang werden die Empfehlungen für das Brustkrebscreening für Männer uneinheitlich diskutiert.<sup>160</sup> Nach der aktuellen S3-Leitlinie und den Richtlinien der Kommission Mamma werden für Männer, bei denen nach einer genetischen Beratung und einem Gentest ein erhöhtes Brustkrebsrisiko festgestellt wurde, keine speziellen Screeningverfahren oder Früherkennungsmaßnahmen empfohlen. (www.ago-online.de; S3 Leitlinie Mammakarzinom) Während nicht an Brustkrebs erkrankten weiblichen *BRCA1/2*-Mutationsträgerinnen ein multimodales intensiviertes Früherkennungsprogramm angeboten wird, das zum Nachweis früher Tumorstadien die ärztliche Tastuntersuchung, Ultraschalldiagnostik, sowie Mammografie und Kernspintomographie umfasst, erfolgt die Krebsfrüherkennungsuntersuchung bei Männern im Rahmen der Regelversorgung und beschränkt sich im Wesentlichen auf die Selbstuntersuchung. Lediglich bei begründetem klinischem Verdacht wird eine weitere bildgebende oder invasive Diagnostik durchgeführt. Bei nachgewiesener *BRCA1/2* Mutation sollte zusätzliche eine Aufklärung über verbundene Erkrankungsrisiken für männliche Familienangehörige erfolgen.

Weiterhin gilt es zu untersuchen, inwieweit der Keimbahnmutationsstatus in *BRCA1/2*, *ATM*, *CHEK2* und *PALB2* das Ansprechen auf zielgerichtete Therapien wie beispielsweise auf PARP-oder CDK4/6-Inhibitoren bei männlichen Mammakarzinom-Patienten beeinflusst. Die derzeitige Behandlung basiert auf Studien, die vordergründig bei weiblichen Patienten durchgeführt wurde, obwohl verfügbare Daten darauf hinweisen, dass das männliche Mammakarzinom unterschiedliche molekulare und klinisch-pathologische Merkmale aufweist, die möglicherweise andere klinische Ansätze rechtfertigen.<sup>161</sup> Die Beteiligung männlicher Brustkrebspatienten an speziell für diese Patientengruppe konzipierten klinischen Studien ist in diesem Zusammenhang entscheidend, um in Zukunft die besten therapeutischen Optionen zu identifizieren. Weiterhin sind größere unabhängige Populationsstudien erforderlich, um unter anderem das mit den verschiedenen Mutationen verbundene Lebenszeitrisiko für Brustkrebs zu bewerten und die optimalen Vorsorgestrategien für Männer, die diese genetischen Varianten tragen, zu bestimmen. Um dieses übergeordnete Ziel zu unterstützen, könnten perspektivisch insbesondere kollaborative Anstrengungen weitere Fortschritte erzielen, wie beispielsweise das umfassende internationale Confluence Projekt des US-amerikanischen National Cancer Institute (<https://confluence.cancer.gov>, aufgerufen am 14. Dezember 2024). Das Projekt

integriert dabei sowohl bestehende als auch neue genetische Daten, die im Rahmen genomweiter Studien gesammelt wurden. Dazu gehören Informationen aus mehreren Konsortien wie dem BC Association Consortium (BCAC, dem Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2 (CIMBA) um dem kürzlich gegründete Konsortium für die Genetik von männlichem Brustkrebs (MERGE).

Die vorliegende Untersuchung weist einige Einschränkungen auf. Zunächst bestand die untersuchte Stichprobe überwiegend aus männlichen Brustkrebspatienten, die die bis zum Zeitpunkt der Datenerhebung geltenden Einschlusskriterien des DK-FBREC erfüllten und in entsprechenden Konsortialzentren betreut wurden. Dies könnte zu einer Überrepräsentation von Patienten mit einer positiven Familienanamnese geführt haben. Infolgedessen sollten die Ergebnisse dieser Studie in größeren vorab nicht selektierten Stichproben von Patienten validiert werden. Darüber hinaus wurde die Prävalenz pathogener Varianten bei nicht erkrankten Personen anhand von nicht-finneuropäischen ExAC-Daten ermittelt, anstatt angepasste Kontrollen zu verwenden. Dieser Ansatz könnte ebenso zu Verzerrungen in den Ergebnissen geführt haben. Darüber hinaus wurden Patienten, die initial ausschließlich auf Mutationen in den beiden Risikogenen *BRCA1/2* getestet und positiv befundet wurden, keiner weiteren umfassenden Genpanel-Analyse unterzogen.

## 5. Literaturverzeichnis

1. Koch-Institut, R. & Gesellschaft Der Epidemiologischen Krebsregister In Deutschland E.V. Krebs in Deutschland 2015/2016. (2019) doi:10.25646/5977.
2. Hassett, M. J. *et al.* Management of Male Breast Cancer: ASCO Guideline. *Journal of Clinical Oncology* **38**, 1849–1863 (2020).
3. Pensabene, M., Von Arx, C. & De Laurentiis, M. Male Breast Cancer: From Molecular Genetics to Clinical Management. *Cancers* **14**, 2006 (2022).
4. Fox, S., Speirs, V. & Shaaban, A. M. Male breast cancer: an update. *Virchows Arch* **480**, 85–93 (2022).
5. Khan, N. A. J. & Tirona, M. An updated review of epidemiology, risk factors, and management of male breast cancer. *Med Oncol* **38**, 39 (2021).
6. Fang, W., Huang, Y., Han, X., Peng, J. & Zheng, M. Characteristics of metastasis and survival between male and female breast cancer with different molecular subtypes: A population-based observational study. *Cancer Medicine* **11**, 764–777 (2022).
7. Konduri, S., Singh, M., Bobustuc, G., Rovin, R. & Kassam, A. Epidemiology of male breast cancer. *The Breast* **54**, 8–14 (2020).
8. Liu, N., Johnson, K. J. & Ma, C. X. Male Breast Cancer: An Updated Surveillance, Epidemiology, and End Results Data Analysis. *Clinical Breast Cancer* **18**, e997–e1002 (2018).
9. Wang, F. *et al.* Overall Mortality After Diagnosis of Breast Cancer in Men vs Women. *JAMA Oncol* **5**, 1589 (2019).
10. Gucalp, A. *et al.* Male breast cancer: a disease distinct from female breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* **173**, 37–48 (2019).
11. Nofal, M. N. & Yousef, A. J. The diagnosis of male breast cancer. *Neth J Med* **77**, 356–359 (2019).
12. Serdy, K. M., Leone, J. P., Dabbs, D. J. & Bhargava, R. Male Breast Cancer: A Single-Institution Clinicopathologic and Immunohistochemical Study. *American Journal of Clinical Pathology* aqw207 (2017) doi:10.1093/ajcp/aqw207.
13. Ferzoco, R. M. & Ruddy, K. J. The Epidemiology of Male Breast Cancer. *Current Oncology Reports* **18**, (2016).
14. Cardoso, F. *et al.* Characterization of male breast cancer: results of the EORTC 10085/TBCRC/BIG/NABCG International Male Breast Cancer Program. *Annals of Oncology* **29**, 405–417 (2018).
15. kConFab Investigators *et al.* Male breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: pathology data from the Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2. *Breast Cancer Research* **18**, (2016).
16. Deb, S., Lakhani, S. R., Ottini, L. & Fox, S. B. The cancer genetics and pathology of male

- breast cancer. *Histopathology* **68**, 110–118 (2016).
17. Khare, V. S. *et al.* Male Breast Cancer: An Updated Review of Patient Characteristics, Genetics, and Outcome. *International Journal of Breast Cancer* **2024**, 1–7 (2024).
  18. Fentiman, I. S. Male breast cancer is not congruent with the female disease. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **101**, 119–124 (2016).
  19. Arbeitsgemeinschaft. *Interdisziplinäre S3-Leitlinie Für Die Früherkennung, Diagnostik, Therapie Und Nachsorge Des Mammakarzinoms Langversion 4.4 – Juni 2021 AWMF-Registernummer: 032-045OL.* (2021).
  20. Forbes, C., Fayter, D., de Kock, S. & Quek, R. G. W. A systematic review of international guidelines and recommendations for the genetic screening, diagnosis, genetic counseling, and treatment of BRCA-mutated breast cancer. *Cancer Management and Research Volume* **11**, 2321–2337 (2019).
  21. Ruddy, K. J. & Winer, E. P. Male breast cancer: risk factors, biology, diagnosis, treatment, and survivorship. *Annals of Oncology* **24**, 1434–1443 (2013).
  22. Nahleh, Z. & Girnius, S. Male breast cancer: a gender issue. *Nature Clinical Practice Oncology* **3**, 428–437 (2006).
  23. Campos, F. A. B. *et al.* Genetic Landscape of Male Breast Cancer. *Cancers* **13**, 3535 (2021).
  24. Brinton, L. A. *et al.* Prospective Evaluation of Risk Factors for Male Breast Cancer. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* **100**, 1477–1481 (2008).
  25. Weiss, J. R., Moysich, K. B. & Swede, H. Epidemiology of male breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **14**, 20–26 (2005).
  26. Meindl, A., Ramser, J., Hauke, J. & Hahnen, E. Genetik des familiären Brust- und Eierstockkrebses: Paneldiagnostik – Möglichkeiten und Grenzen. *medizinische genetik* **27**, 202–210 (2015).
  27. Garber, J. E. & Offit, K. Hereditary Cancer Predisposition Syndromes. *Journal of Clinical Oncology* **23**, 276–292 (2005).
  28. Kuchenbaecker, K. B. *et al.* Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for *BRCA1* and *BRCA2* Mutation Carriers. *JAMA* **317**, 2402 (2017).
  29. Hereditary Cancer Syndromes and Risk Assessment: ACOG COMMITTEE OPINION, Number 793. *Obstetrics & Gynecology* **134**, e143–e149 (2019).
  30. Guha, T. & Malkin, D. Inherited *TP53* Mutations and the Li–Fraumeni Syndrome. *Cold Spring Harb Perspect Med* **7**, a026187 (2017).
  31. Nagy, R., Sweet, K. & Eng, C. Highly penetrant hereditary cancer syndromes. *Oncogene* **23**, 6445–6470 (2004).
  32. Drago, D. D. *et al.* PTEN Hamartoma Tumor Syndrome/Cowden Syndrome: Genomics, Oncogenesis, and Imaging Review for Associated Lesions and Malignancy. *Cancers* **13**, 3120 (2021).
  33. Pilarski, R. *et al.* Cowden Syndrome and the PTEN Hamartoma Tumor Syndrome: Systematic

- Review and Revised Diagnostic Criteria. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* **105**, 1607–1616 (2013).
34. McGarrity, T. J., Amos, C. I. & Baker, M. J. Peutz-Jeghers Syndrome. in *GeneReviews®* (eds. Adam, M. P. et al.) (University of Washington, Seattle, Seattle (WA), 1993).
35. van der Post, R. S. *et al.* Hereditary diffuse gastric cancer: updated clinical guidelines with an emphasis on germline *CDH1* mutation carriers. *J Med Genet* **52**, 361–374 (2015).
36. Rich, T. A., Woodson, A. H., Litton, J. & Arun, B. Hereditary breast cancer syndromes and genetic testing: Breast Cancer Syndromes and Genetic Testing. *Journal of Surgical Oncology* **111**, 66–80 (2015).
37. Robson, M. Moderate-Penetrance Predisposition to Breast Cancer. *Curr Breast Cancer Rep* **10**, 232–239 (2018).
38. Antoniou, A. C. *et al.* A comprehensive model for familial breast cancer incorporating BRCA1, BRCA2 and other genes. *British Journal of Cancer* **86**, 76–83 (2002).
39. Maguire, S. *et al.* Common Susceptibility Loci for Male Breast Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **113**, 453–461 (2021).
40. Lecarpentier, J. *et al.* Prediction of Breast and Prostate Cancer Risks in Male *BRCA1* and *BRCA2* Mutation Carriers Using Polygenic Risk Scores. *JCO* **35**, 2240–2250 (2017).
41. Valentini, V. *et al.* Gender-Specific Genetic Predisposition to Breast Cancer: BRCA Genes and Beyond. *Cancers* **16**, 579 (2024).
- 42.; on behalf of the ACMG Laboratory Quality Assurance Committee *et al.* Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine* **17**, 405–423 (2015).
43. Plon, S. E. *et al.* Sequence variant classification and reporting: recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results. *Human Mutation* **29**, 1282–1291 (2008).
44. Fostira, F. *et al.* Germline deleterious mutations in genes other than BRCA2 are infrequent in male breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* **169**, 105–113 (2018).
45. Tung, N. *et al.* Frequency of mutations in individuals with breast cancer referred for *BRCA 1* and *BRCA 2* testing using next-generation sequencing with a 25-gene panel: Mutations in *BRCA1/2* - Tested Patients. *Cancer* **121**, 25–33 (2015).
46. Rizzolo, P. *et al.* Male breast cancer: genetics, epigenetics, and ethical aspects. *Annals of Oncology* **24**, viii75–viii82 (2013).
47. Pritzlaff, M. *et al.* Male breast cancer in a multi-gene panel testing cohort: insights and unexpected results. *Breast Cancer Research and Treatment* **161**, 575–586 (2017).
48. Ottini, L. *et al.* Clinical and pathologic characteristics of BRCA-positive and BRCA-negative male breast cancer patients: results from a collaborative multicenter study in Italy. *Breast Cancer Research and Treatment* **134**, 411–418 (2012).

49. de Juan, I. *et al.* BRCA1 and BRCA2 mutations in males with familial breast and ovarian cancer syndrome. Results of a Spanish multicenter study. *Familial Cancer* **14**, 505–513 (2015).
50. Tai, Y. C., Domchek, S., Parmigiani, G. & Chen, S. Breast Cancer Risk Among Male BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* **99**, 1811–1814 (2007).
51. Abdelwahab Yousef, A. J. Male Breast Cancer: Epidemiology and Risk Factors. *Seminars in Oncology* **44**, 267–272 (2017).
52. 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* **21**, 134–147 (2012).
53. Barnes, D. R. *et al.* Breast and Prostate Cancer Risks for Male *BRCA1* and *BRCA2* Pathogenic Variant Carriers Using Polygenic Risk Scores. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* djab147 (2021) doi:10.1093/jnci/djab147.
54. Graff, R. E. *et al.* Cross-cancer evaluation of polygenic risk scores for 16 cancer types in two large cohorts. *Nat Commun* **12**, 970 (2021).
55. Junejo, N. N. & AlKhateeb, S. S. BRCA2 gene mutation and prostate cancer risk: Comprehensive review and update. *Saudi Medical Journal* **41**, 9–17 (2020).
56. Ibrahim, M., Yadav, S., Ogunleye, F. & Zakalik, D. Male BRCA mutation carriers: clinical characteristics and cancer spectrum. *BMC Cancer* **18**, (2018).
57. Wu, S. *et al.* Molecular Mechanisms of PALB2 Function and Its Role in Breast Cancer Management. *Frontiers in Oncology* **10**, (2020).
58. Prakash, R., Zhang, Y., Feng, W. & Jasin, M. Homologous Recombination and Human Health: The Roles of BRCA1, BRCA2, and Associated Proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **7**, a016600 (2015).
59. Nepomuceno, T. *et al.* The Role of PALB2 in the DNA Damage Response and Cancer Predisposition. *International Journal of Molecular Sciences* **18**, 1886 (2017).
60. Breast Cancer Association Consortium *et al.* Breast Cancer Risk Genes — Association Analysis in More than 113,000 Women. *New England Journal of Medicine* **384**, 428–439 (2021).
61. The Breast Cancer Susceptibility Collaboration (UK) *et al.* PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. *Nature Genetics* **39**, 165–167 (2007).
62. Hauke, J. *et al.* Gene panel testing of 5589 *BRCA1/2* -negative index patients with breast cancer in a routine diagnostic setting: results of the German Consortium for Hereditary Breast and Ovarian Cancer. *Cancer Medicine* **7**, 1349–1358 (2018).
63. Slavin, T. P. *et al.* The contribution of pathogenic variants in breast cancer susceptibility genes to familial breast cancer risk. *npj Breast Cancer* **3**, (2017).
64. Decker, B. *et al.* Rare, protein-truncating variants in *ATM* , *CHEK2* and *PALB2* , but not *XRCC2* , are associated with increased breast cancer risks. *Journal of Medical Genetics* **54**, 732–741 (2017).

65. Silvestri, V. *et al.* Whole-exome sequencing and targeted gene sequencing provide insights into the role of *PALB2* as a male breast cancer susceptibility gene: *PALB2* Mutations in Male Breast Cancer. *Cancer* **123**, 210–218 (2017).
66. Ding, Y. C., Steele, L., Kuan, C.-J., Greilac, S. & Neuhausen, S. L. Mutations in *BRCA2* and *PALB2* in male breast cancer cases from the United States. *Breast Cancer Research and Treatment* **126**, 771–778 (2011).
67. Tedaldi, G. *et al.* Male Breast Cancer: Results of the Application of Multigene Panel Testing to an Italian Cohort of Patients. *Diagnostics* **10**, 269 (2020).
68. Rizzolo, P. *et al.* Insight into genetic susceptibility to male breast cancer by multigene panel testing: Results from a multicenter study in Italy: Multigene panel testing in male breast cancer. *International Journal of Cancer* (2019) doi:10.1002/ijc.32106.
69. Yang, X. *et al.* Cancer Risks Associated With Germline *PALB2* Pathogenic Variants: An International Study of 524 Families. *Journal of Clinical Oncology* **38**, 674–685 (2020).
70. Zannini, L., Delia, D. & Buscemi, G. *CHK2* kinase in the DNA damage response and beyond. *Journal of Molecular Cell Biology* **6**, 442–457 (2014).
71. Apostolou, P. & Papatotiriou, I. Current perspectives on *CHEK2* mutations in breast cancer. *Breast Cancer: Targets and Therapy* **Volume 9**, 331–335 (2017).
72. Stolarova, L. *et al.* *CHEK2* Germline Variants in Cancer Predisposition: Stalemate Rather than Checkmate. *Cells* **9**, 2675 (2020).
73. Stolz, A., Ertych, N. & Bastians, H. Tumor Suppressor *CHK2*: Regulator of DNA Damage Response and Mediator of Chromosomal Stability: Figure 1. *Clinical Cancer Research* **17**, 401–405 (2011).
74. Fortunato, C. *et al.* *CHEK2* is not a Li-Fraumeni syndrome gene: time to update public resources. *J Med Genet* **60**, 1215–1217 (2023).
75. Weischer, M., Bojesen, S. E., Tybjærg-Hansen, A., Axelsson, C. K. & Nordestgaard, B. G. Increased Risk of Breast Cancer Associated With *CHEK2* \* 1100delC. *Journal of Clinical Oncology* **26**, 57–63 (2007).
76. The *CHEK2*-Breast Cancer Consortium. Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to *CHEK2*\*1100delC in noncarriers of *BRCA1* or *BRCA2* mutations. *Nature Genetics* **31**, 55–59 (2002).
77. Schmidt, M. K. *et al.* Age- and Tumor Subtype-Specific Breast Cancer Risk Estimates for *CHK2* \*1100delC Carriers. *JCO* **34**, 2750–2760 (2016).
78. Desrichard, A., Bidet, Y., Uhrhammer, N. & Bignon, Y.-J. *CHEK2* contribution to hereditary breast cancer in non-*BRCA* families. *Breast Cancer Research* **13**, (2011).
79. Cybulski, C. *et al.* Risk of Breast Cancer in Women With a *CHEK2* Mutation With and Without a Family History of Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology* **29**, 3747–3752 (2011).
80. Kleiblova, P. *et al.* Identification of deleterious germline *CHEK2* mutations and their association with breast and ovarian cancer. *International Journal of Cancer* (2019)

doi:10.1002/ijc.32385.

81. Dufault, M. R. *et al.* Limited relevance of the *CHEK2* gene in hereditary breast cancer: CHEK2 Relevance in German Breast Cancer. *International Journal of Cancer* **110**, 320–325 (2004).
82. Neuhausen, S. *et al.* Role of CHEK2\*1100delC in unselected series of non-BRCA1/2 male breast cancers. *International Journal of Cancer* **108**, 477–478 (2004).
83. Wasielewski, M. *et al.* CHEK2 1100delC and male breast cancer in the Netherlands. *Breast Cancer Research and Treatment* **116**, 397–400 (2009).
84. Syrjäkoski, K., Kuukasjärvi, T., Auvinen, A. & Kallioniemi, O.-P. CHEK2 1100delC is not a risk factor for male breast cancer population: Risk Factor of CHEK2 1100delC. *International Journal of Cancer* **108**, 475–476 (2004).
85. Hallamies, S. *et al.* CHEK2 c.1100delC mutation is associated with an increased risk for male breast cancer in Finnish patient population. *BMC Cancer* **17**, (2017).
86. Liang, M. *et al.* Association Between CHEK2\*1100delC and Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Molecular Diagnosis & Therapy* **22**, 397–407 (2018).
87. Stracker, T. H., Roig, I., Knobel, P. A. & Marjanović, M. The ATM signaling network in development and disease. *Frontiers in Genetics* **4**, (2013).
88. Marechal, A. & Zou, L. DNA Damage Sensing by the ATM and ATR Kinases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **5**, a012716–a012716 (2013).
89. Cremona, C. A. & Behrens, A. ATM signalling and cancer. *Oncogene* **33**, 3351–3360 (2014).
90. Rothblum-Oviatt, C. *et al.* Ataxia telangiectasia: a review. *Orphanet Journal of Rare Diseases* **11**, (2016).
91. Ahmed, M. & Rahman, N. ATM and breast cancer susceptibility. *Oncogene* **25**, 5906–5911 (2006).
92. Jerzak, K. J., Mancuso, T. & Eisen, A. Ataxia–Telangiectasia Gene (ATM) Mutation Heterozygosity in Breast Cancer: A Narrative Review. *Current Oncology* **25**, 176–180 (2018).
93. The Breast Cancer Susceptibility Collaboration (UK) *et al.* ATM mutations that cause ataxia-telangiectasia are breast cancer susceptibility alleles. *Nature Genetics* **38**, 873–875 (2006).
94. Milne, R. L. Variants in the ATM gene and breast cancer susceptibility. *Genome Medicine* **1**, 12 (2009).
95. Hall, M. J. *et al.* Germline Pathogenic Variants in the Ataxia Telangiectasia Mutated ( ATM ) Gene are Associated with High and Moderate Risks for Multiple Cancers. *Cancer Prevention Research* **14**, 433–440 (2021).
96. Southey, M. C. *et al.* *PALB2* , *CHEK2* and *ATM* rare variants and cancer risk: data from COGS. *Journal of Medical Genetics* **53**, 800–811 (2016).
97. Stucci, L. S. *et al.* The ATM Gene in Breast Cancer: Its Relevance in Clinical Practice. *Genes* **12**, 727 (2021).
98. Jette, N. R. *et al.* ATM-Deficient Cancers Provide New Opportunities for Precision Oncology.

*Cancers* **12**, 687 (2020).

99. Hoffmann, M. J., Taubert, H. & Junker, K. Molekulare Grundlagen der Karzinogenese und molekularbiologische Untersuchungsmethoden. in *Uroonkologie* (eds. Rübber, H., Hakenberg, O., Grimm, M.-O. & Burger, M.) 1–20 (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2020). doi:10.1007/978-3-662-54652-9\_11-1.
100. Wang, L.-H., Wu, C.-F., Rajasekaran, N. & Shin, Y. K. Loss of Tumor Suppressor Gene Function in Human Cancer: An Overview. *Cell Physiol Biochem* **51**, 2647–2693 (2018).
101. Arnemann, J. Tumorsuppressorgen. in *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik* (eds. Gressner, A. M. & Arndt, T.) 2383–2383 (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2019). doi:10.1007/978-3-662-48986-4\_3626.
102. *Molekulare Onkologie: Entstehung, Progression, klinische Aspekte*. b-002-10334 (Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2010). doi:10.1055/b-002-10334.
103. Matthews, H. K., Bertoli, C. & de Bruin, R. A. M. Cell cycle control in cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2021) doi:10.1038/s41580-021-00404-3.
104. Somasundaram, K. Tumor suppressor p53: regulation and function. *Front Biosci* **5**, d424 (2000).
105. Basu, A. DNA Damage, Mutagenesis and Cancer. *IJMS* **19**, 970 (2018).
106. Yokota, J. Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis* **21**, 497–503 (2000).
107. Cannan, W. J. & Pederson, D. S. Mechanisms and Consequences of Double-Strand DNA Break Formation in Chromatin: DOUBLE-STRAND DNA BREAK FORMATION IN CHROMATIN. *Journal of Cellular Physiology* **231**, 3–14 (2016).
108. de Massy, B. Initiation of Meiotic Recombination: How and Where? Conservation and Specificities Among Eukaryotes. *Annual Review of Genetics* **47**, 563–599 (2013).
109. Davis, A. J. & Chen, D. J. DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. *Transl Cancer Res* **2**, 130–143 (2013).
110. Chapman, J. R., Taylor, M. R. G. & Boulton, S. J. Playing the End Game: DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice. *Molecular Cell* **47**, 497–510 (2012).
111. Wright, W. D., Shah, S. S. & Heyer, W.-D. Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks. *Journal of Biological Chemistry* **293**, 10524–10535 (2018).
112. Arnemann, J. Homologe Rekombination. in *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik* (eds. Gressner, A. M. & Arndt, T.) 1143–1143 (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2019). doi:10.1007/978-3-662-48986-4\_3504.
113. Jasin, M. & Rothstein, R. Repair of Strand Breaks by Homologous Recombination. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **5**, a012740–a012740 (2013).
114. Heyer, W.-D., Ehmsen, K. T. & Liu, J. Regulation of Homologous Recombination in Eukaryotes. *Annual Review of Genetics* **44**, 113–139 (2010).
115. Toh, M. & Ngeow, J. Homologous Recombination Deficiency: Cancer Predispositions and

Treatment Implications. *The Oncologist* **26**, (2021).

116. Holloman, W. K. Unraveling the mechanism of BRCA2 in homologous recombination. *Nature Structural & Molecular Biology* **18**, 748–754 (2011).
117. Sy, S. M. H., Huen, M. S. Y. & Chen, J. PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 7155–7160 (2009).
118. Nguyen, L., W. M. Martens, J., Van Hoeck, A. & Cuppen, E. Pan-cancer landscape of homologous recombination deficiency. *Nature Communications* **11**, (2020).
119. kConFab Investigators *et al.* Homologous recombination DNA repair defects in PALB2-associated breast cancers. *npj Breast Cancer* **5**, (2019).
120. Moynahan, M. E. & Jasin, M. Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **11**, 196–207 (2010).
121. McCabe, N. *et al.* Deficiency in the Repair of DNA Damage by Homologous Recombination and Sensitivity to Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibition. *Cancer Research* **66**, 8109–8115 (2006).
122. den Brok, W. D. *et al.* Homologous Recombination Deficiency in Breast Cancer: A Clinical Review. *JCO Precision Oncology* 1–13 (2017) doi:10.1200/PO.16.00031.
123. Turk, A. A. & Wisinski, K. B. PARP inhibitors in breast cancer: Bringing synthetic lethality to the bedside: PARP Inhibition in BRCA-Mutant Breast CA. *Cancer* **124**, 2498–2506 (2018).
124. Cerrato, A., Morra, F. & Celetti, A. Use of poly ADP-ribose polymerase [PARP] inhibitors in cancer cells bearing DDR defects: the rationale for their inclusion in the clinic. *J Exp Clin Cancer Res* **35**, 179 (2016).
125. Kempe, S. Neuer PARP-Inhibitor bei BRCA-positivem metastasiertem Mammakarzinom. *gynäkologie + geburtshilfe* **25**, 54–54 (2020).
126. Steinke, V. *et al.* Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (HNPCC)/Lynch Syndrome. *Deutsches Ärzteblatt Online* (2013) doi:10.3238/arztebl.2013.0032.
127. Desmond, A. *et al.* Clinical Actionability of Multigene Panel Testing for Hereditary Breast and Ovarian Cancer Risk Assessment. *JAMA Oncology* **1**, 943 (2015).
128. Nielsen, S. M. *et al.* Genetic Testing and Clinical Management Practices for Variants in Non-*BRCA1 / 2* Breast (and Breast/Ovarian) Cancer Susceptibility Genes: An International Survey by the Evidence-Based Network for the Interpretation of Germline Mutant Alleles (ENIGMA) Clinical Working Group. *JCO Precision Oncology* 1–42 (2018) doi:10.1200/PO.18.00091.
129. Rhiem, K. *et al.* Consensus Recommendations of the German Consortium for Hereditary Breast and Ovarian Cancer. *Breast Care* **17**, 199–207 (2022).
130. Schmutzler, R. Konsensusempfehlung des Deutschen Konsortiums Familiärer Brust- und Eierstockkrebs zum Umgang mit Ergebnissen der Multigenanalyse. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* **77**, 733–739 (2017).
131. Weber-Lassalle, N. *et al.* Germline loss-of-function variants in the BARD1 gene are associated

- with early-onset familial breast cancer but not ovarian cancer. *Breast Cancer Res* **21**, 55 (2019).
132. Weber-Lassalle, N. *et al.* BRIP1 loss-of-function mutations confer high risk for familial ovarian cancer, but not familial breast cancer. *Breast Cancer Res* **20**, 7 (2018).
133. Angeli, D., Salvi, S. & Tedaldi, G. Genetic Predisposition to Breast and Ovarian Cancers: How Many and Which Genes to Test? *International Journal of Molecular Sciences* **21**, 1128 (2020).
134. Catana, A., Apostu, A. P. & Antemie, R.-G. Multi gene panel testing for hereditary breast cancer - is it ready to be used? *Medicine and Pharmacy Reports* (2019) doi:10.15386/mpr-1083.
135. Fountzilias, C. & Kaklamani, V. G. Multi-gene Panel Testing in Breast Cancer Management. in *Optimizing Breast Cancer Management* (ed. Gradishar, W. J.) vol. 173 121–140 (Springer International Publishing, Cham, 2018).
136. Di Resta, C., Galbiati, S., Carrera, P. & Ferrari, M. Next-generation sequencing approach for the diagnosis of human diseases: open challenges and new opportunities. *EJIFCC* **29**, 4–14 (2018).
137. Kast, K. *et al.* Prevalence of *BRCA1/2* germline mutations in 21 401 families with breast and ovarian cancer. *Journal of Medical Genetics* **53**, 465–471 (2016).
138. Speiser, D. & Bick, U. Primary Prevention and Early Detection of Hereditary Breast Cancer. *Breast Care* (2023) doi:10.1159/000533391.
139. Giordano, S. H. Breast Cancer in Men. *New England Journal of Medicine* **378**, 2311–2320 (2018).
140. Li, S. *et al.* Cancer Risks Associated With *BRCA1* and *BRCA2* Pathogenic Variants. *J Clin Oncol* **JCO2102112** (2022) doi:10.1200/JCO.21.02112.
141. Rebbeck, T. R. *et al.* Mutational spectrum in a worldwide study of 29,700 families with *BRCA1* or *BRCA2* mutations. *Hum Mutat* **39**, 593–620 (2018).
142. Castro, E. & Eeles, R. The role of *BRCA1* and *BRCA2* in prostate cancer. *Asian J Androl* **14**, 409–414 (2012).
143. Nyberg, T. *et al.* Prostate Cancer Risks for Male *BRCA1* and *BRCA2* Mutation Carriers: A Prospective Cohort Study. *European Urology* **77**, 24–35 (2020).
144. Castro, E. *et al.* Germline *BRCA* Mutations Are Associated With Higher Risk of Nodal Involvement, Distant Metastasis, and Poor Survival Outcomes in Prostate Cancer. *JCO* **31**, 1748–1757 (2013).
145. De Bono, J. *et al.* Olaparib for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *N Engl J Med* **382**, 2091–2102 (2020).
146. European Medicines Agency (EMA), Lynparza: Olaparib.
147. Thiery-Vuillemin, A. *et al.* Pain and health-related quality of life with olaparib versus physician's choice of next-generation hormonal drug in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer with homologous recombination repair gene alterations (PROfound): an open-label, randomised, phase 3 trial. *The Lancet Oncology* **23**, 393–405 (2022).
148. Szwiec, M. *et al.* Genetic predisposition to male breast cancer in Poland. *BMC Cancer* **21**, 975

(2021).


149. Tischkowitz, M. *et al.* Management of individuals with germline variants in PALB2: a clinical practice resource of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genetics in Medicine* **23**, 1416–1423 (2021).
150. Hanson, H. *et al.* Management of individuals with germline pathogenic/likely pathogenic variants in CHEK2: A clinical practice resource of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genetics in Medicine* **25**, 100870 (2023).
151. Cunha, R., Nejo, P., Bento, S. & Vaz, F. ATM germline variants and male breast cancer. *BMJ Case Rep* **14**, e238100 (2021).
152. Nyberg, T. *et al.* CanRisk-Prostate: A Comprehensive, Externally Validated Risk Model for the Prediction of Future Prostate Cancer. *JCO* **41**, 1092–1104 (2023).
153. Lee, A. *et al.* BOADICEA: a comprehensive breast cancer risk prediction model incorporating genetic and nongenetic risk factors. *Genetics in Medicine* **21**, 1708–1718 (2019).
154. Midding, E. *et al.* Men With a “Woman’s Disease”: Stigmatization of Male Breast Cancer Patients—A Mixed Methods Analysis. *Am J Mens Health* **12**, 2194–2207 (2018).
155. Halbach, S. M. *et al.* Male Breast Cancer Patients’ Perspectives on Their Health Care Situation: A Mixed-Methods Study. *Breast Care* **15**, 22–29 (2020).
156. Schemmel, N. Der Informationsbedarf von Männern mit Brustkrebs: Eine qualitative Analyse von Forenbeiträgen. (Halle (Saale), 2023).
157. Bootsma, T. I. *et al.* Unmet information needs of men with breast cancer and health professionals. *Psycho-Oncology* **29**, 851–860 (2020).
158. Wappenschmidt, B. *et al.* Criteria of the German Consortium for Hereditary Breast and Ovarian Cancer for the Classification of Germline Sequence Variants in Risk Genes for Hereditary Breast and Ovarian Cancer. *Geburtshilfe Frauenheilkd* **80**, 410–429 (2020).
159. Zang, B. *et al.* Interdisciplinary risk counseling for hereditary breast and ovarian cancer: real-world data from a specialized center. *Arch Gynecol Obstet* **307**, 1585–1592 (2022).
160. Gaddam, S., Heller, S. L., Babb, J. S. & Gao, Y. Male Breast Cancer Risk Assessment and Screening Recommendations in High-Risk Men Who Undergo Genetic Counseling and Multigene Panel Testing. *Clinical Breast Cancer* **21**, e74–e79 (2021).
161. Zheng, G. & Leone, J. P. Male Breast Cancer: An Updated Review of Epidemiology, Clinicopathology, and Treatment. *Journal of Oncology* **2022**, 1–11 (2022).
162. Buermans, H. P. J. & den Dunnen, J. T. Next generation sequencing technology: Advances and applications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1842**, 1932–1941 (2014).
163. Mardis, E. R. DNA sequencing technologies: 2006–2016. *Nat Protoc* **12**, 213–218 (2017).
164. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **74**, 5463–5467 (1977).

165. Schouten, J. P. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Research* **30**, 57e–557 (2002).

## 6. Anhang

### 6.1 Ethikvotum

Die vorliegende Studie wurde durch die Ethikkommission der Universität zu Köln geprüft und positiv bewertet (Antragsnummer 24-1381 vom 16.01.2025).

<b>Universität zu Köln</b>	
<small>Geschäftsstelle Ethikkommission • Universität zu Köln • 50937 Köln</small>	<b>Medizinische Fakultät der Universität zu Köln</b>
Zentrum Familiärer Brust- und Eierstockkrebs Uniklinik Köln Herr PD Dr. Eric Hahnen, MBA Kerpener Str. 62 50937 Köln	<b>Geschäftsstelle der Ethikkommission</b>
Per ethikPool	Vorsitzender Univ.-Prof. Dr. med. Raymond Voltz
	Leitung der Geschäftsstelle Dr. med. Guido Grass Telefon +49 221 478 87916 Stellv. Leitung Dipl.-Ges.-Ök. Karolina Mäder Telefon +49 221 478 88844
Unser Zeichen: 24-1381	Köln, 20.01.2025
Untersuchung von Risikogenen bei an Brustkrebs erkrankten Männern aus Familien des Deutschen Konsortiums Familiärer Brust- und Eierstockkrebs	Mitarbeiterinnen Dipl.-Biol. Alice Follmann Telefon +49 221 478 97773
Sehr geehrter Herr Dr. Hahnen,	Dipl.-Ges.-Ök. Christine Grimm Telefon +49 221 478 97772
die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln hat sich in ihrer Sitzung vom 16.01.2025 mit Ihrem Antrag befasst. Die Beratung erfolgte nach § 15 Abs. 1 der Berufsordnung der Nordrheinischen Ärztinnen und Ärzte in Verbindung mit § 2 Abs. 1 der Satzung für die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln.	Dipl.-Ges.-Ök. Agnieszka Hompanera Torre Telefon +49 221 478 82903
Der Antrag wird <b>zustimmend bewertet</b> .	Christin Willgodt M.A. Telefon +49 221 478 82902
<b>Besonderer Hinweis:</b>	Büroleitung Sascha Holler Telefon +49 221 478 82900
1) Wir bitten um Bestätigung, dass die Studie vor Beginn in einer öffentlich zugänglichen Datenbank gemäß Artikel 35 der Deklaration von Helsinki in der Fassung von 2013 registriert wird.	Barbara Ullhardt M. A. Telefon +49 221 478 87488
2) Bei der Beratung ist die Ethikkommission davon ausgegangen, dass ausschließlich bereits zum Zeitpunkt der Antragstellung vorhandene Daten/Proben für das Forschungsprojekt verwendet werden. Vorsorglich sei darauf hingewiesen, dass anderenfalls sich eine erheblich geänderte Einschätzung ergeben könnte.	Julian Ullhardt Telefon +49 221 478 82931
<b>Begründung</b>	<small>ek-med@uni-koeln.de www.ek.uni-koeln.de</small>
Die Unterlagen, einschließlich des Studienplans und der Modalitäten für die Auswahl der Studienteilnehmer entsprechen dem Stand der wissenschaftlichen Erkenntnisse. Die vorhersehbaren Risiken und Nachteile der Studie sind gegenüber dem Nutzen und der voraussichtlichen Bedeutung der Ergebnisse für die Heilkunde ärztlich vertretbar.	<b>Servicezeiten:</b> Mo. – Do. 9.00 – 16.00 Uhr Fr. 9.00 – 12.00 Uhr und nach Vereinbarung
	<b>Besucheradresse:</b> Gleueler Str. 269 50937 Köln
	<b>Postanschrift:</b> Kerpener Str. 62 50937 Köln
	<b>Bankverbindung:</b> Bank für Sozialwirtschaft Köln BLZ 370 205 00 Kto.-Nr. 8 150 000 BIC BFSWDE31

#### Hinweise

Die Ethik-Kommission bittet um Kenntlichmachung und optische Hervorhebung der geänderten Passagen bei erneuter Vorlage. Die Dokumente sind über das Antragsportal EthikPool zum Antrag über „Aktionen“ – „wesentliche Änderung erstellen“ einzureichen.

Wir dürfen Sie darum bitten, die Ethikkommission unverzüglich von sämtlichen nachträglichen Änderungen im Studienplan (abgesehen von rein formellen) zu unterrichten, da sie eine erneute Beratung erforderlich machen.

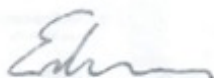
Die Ethikkommission bittet darum über alle Vorkommnisse und Änderungen des wissenschaftlichen Erkenntnisstandes, die während der Studie bekannt werden und die Sicherheit der Teilnehmer oder die Durchführung der Studie beeinträchtigen könnten, unverzüglich informiert zu werden. Diese Information soll nur in Verbindung erfolgen mit einer Stellungnahme des Studienleiters, ob aus seiner Sicht das Nutzen-/Risiko-Verhältnis des Vorhabens verändert ist.

Die Ethikkommission bittet um Unterrichtung über den Beginn der Studie sowie ferner über einen möglichen frühzeitigen Abbruch der Studie. Wir bitten um Übersendung eines jährlichen Zwischenberichtes (vgl. Artikel 23 der Deklaration von Helsinki in der Fassung von 2013). Nach Abschluss des Projektes bitten wir um Übersendung eines Schlussberichtes.

Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln setzt sich zusammen und arbeitet gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen. Hierbei werden die Grundsätze, wie sie in der „Note for Guidance on Good Clinical Practice“ (CPMP/ICH/135/95) niedergelegt sind, berücksichtigt.

Entsprechend der Funktion der Ethikkommission betrifft diese Stellungnahme nur die ethische Beurteilung der Konzeption, der vorgesehenen Methoden, Durchführung und Überwachung des betreffenden Projektes sowie der beabsichtigten Patientenaufklärung. Die ärztliche und juristische Verantwortung verbleibt jedoch uneingeschränkt beim Projektleiter und seinen Mitarbeitern, so dass alle zivil- oder haftungsrechtlichen Folgen, die sich ergeben könnten, von dieser Seite zu tragen sind.

Mit freundlichen Grüßen



Prof. Dr. Erland Erdmann



Dipl.-Ges.-Ök. A. Hompanera Torre

Schreiben der Ethikkommission vom 20.01.2025  
Antragsnummer 24-1381

**Liste der Beschluss fassenden Kommissionsmitglieder**

Erzsebet Endlein  
Dr. Anne-Christin Pieck  
Annett Falkenhahn  
Prof. Dr. Dr. Anna Greta Barbe  
Prof. Dr. Lutz Weber  
Prof. Dr. Erland Erdmann (Vorsitz)

**Folgende Unterlagen haben zur Beratung vorgelegen**

- 1) Anschreiben Ethikantrag Muriel Rolfes.pdf vom 03.10.2024
- 2) Antragsbestätigung.pdf vom 03.10.2024
- 3) CV\_Jan Hauke.pdf vom 12.11.2024
- 4) Exposé Muriel Rolfes.pdf vom 03.10.2024
- 5) formular\_kostenübernahme\_v1-04 signed.pdf vom 03.10.2024
- 6) formular\_prospektive\_vorhaben\_v1-04\_Projekt\_Muriel Rolfes.pdf vom 03.10.2024
- 7) HerediCaRe-CRF\_2024-05-24.pdf vom 03.10.2024
- 8) Herold, Natalie CV 9.09.2024.pdf vom 09.11.2024
- 9) Information und Einwilligungserklärung.pdf vom 03.10.2024
- 10) Kurzbeschreibung.pdf vom 03.10.2024
- 11) nicht verfügbar - Förderantrag.pdf vom 03.10.2024
- 12) nicht verfügbar - Studienprotokoll.pdf vom 03.10.2024
- 13) nicht verfügbar - Vertragliche Vereinbarungen.pdf vom 03.10.2024
- 14) nicht verfügbar - Vollmacht zur Antragstellung.pdf vom 03.10.2024
- 15) Zustimmung Prof. Schmutzler.pdf vom 03.10.2024

**Das Votum ist gültig für folgende Studienzentren**

PD Dr. Eric Hahnen, Muriel Rolfes, Dr. Jan Hauke, Dr. Natalie Herold,  
Uniklinik Köln, Zentrum für Familiären Brust- und Eierstockkrebs  
Kerpener Str. 62  
50937 Köln

## 6.2 Methodik

### 6.2.1 Genauswahl

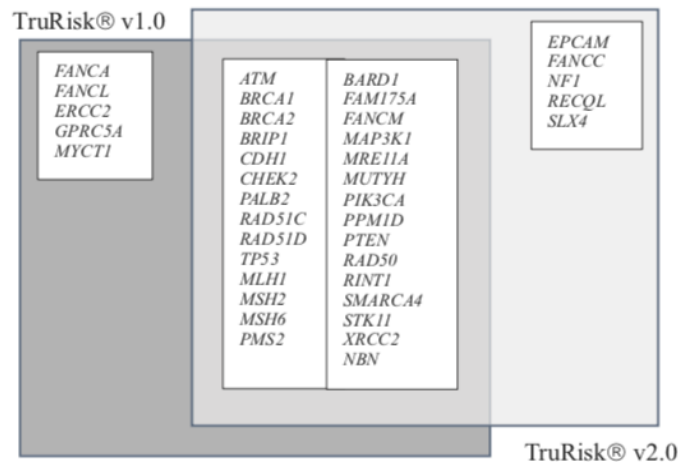
Zur molekulargenetischen Analyse der zugrundeliegenden Keimbahnmutationen in der in dieser Übersichtsarbeit untersuchten *BRCA1/2*-negativen Patientenpopulation wurde einerseits auf Ergebnisse vorangegangener Genpaneltestungen zurückgegriffen, die bereits von den jeweiligen Konsortialzentren umfassend durchgeführt und dokumentiert wurden. Zusätzlich wurden multizentrisch DNA-Proben von männlichen Brustkrebspatienten für anschließende Genpanel-Sequenzierungen gesammelt, deren genetische Untersuchung vorab primär auf die beiden Hochrisikogene *BRCA1/2* beschränkt war.

Im Rahmen der durchgeführten NGS-Analysen wurden die kodierenden Sequenzen, der auf dem PERSPECTIVE-Panel berücksichtigten Gene untersucht. Das zur Verfügung gestellte Genpanel bezieht sich auf 251 verschiedene Gene und setzt sich wie folgt zusammen.

BRIDGES genes	Quebec's genes Jacques Simard Arnaud Droit Maxime Vallée	Toronto's genes Gary Bader Irene Andrusis	Salt Lake City's genes David Goldar Sean Tavtigian Bing-Jen Feng	Cologne genes Rita Schmutzler Alfons Meindl Eric Hahnen	Cambridge's genes Doug Easton Jamie Allen			
1 AKT1	1 KRT36	1 PHF2	1 BAZ1B	36 ABCG2	1 KIF4B	36 ATRIP	71 TP53TG5	1 TYRO3
2 ATM	2 TRPM1	2 PHRF1	2 GSG2	37 ITGA10	2 CEP104	37 BLOC1S2	72 TRIM42	2 HLA-DRB5
3 BARD1	3 C4orf48	3 FGFR3	3 POLR3A	38 KIF18A	3 PBXIP1	38 C6orf211(ARMT1)	73 UVSSA	3 MED23
4 BRCA1	4 CHEK2	4 HIST1H4E	4 MST1L	39 ERCC4	4 CCDC11(CTAP5)	39 CDKN2A	74 XDH	4 DNAH11
5 BRCA2	5 DLX6	5 WRNIP1	5 PTCH1	40 LDHD	5 LAMC3	40 CDS1	75 ZFAND1	5 BPTF
6 BRE	6 RNF175	6 TXLNA	6 CLUH	41 SGSM3	6 SPATA21	41 CEACAM1	76 ZWINT	6 TTC6
7 BRIP1	7 DGAT2	7 TARDBP	7 FANCA	42 UVSSA	7 SMARCAL1	42 CEP55		7 DYNC2H1
8 CDH1	8 MYH7B	8 EPS8L2	8 FHL3	43 GRM3	8 CLEC10A	43 CTBP1		8 DNAH8
9 CHEK2	9 CLCN2	9 INPP5D	9 EAF2	44 ATP2A1	9 ADRA1A	44 DARS2		9 NIPBL
10 EPCAM	10 ERCC2	10 MAP1S	10 SUPT3H	45 ZBTB39	10 ANKK1	45 DHFRL1		10 FBXO11
11 FAM175A	11 OTOP1	11 USP5	11 SUPT6H	46 TCF7	11 PTK2B	46 EAF2		11 PRMT9
12 FANCC	12 TRIM63	12 MAPT	12 GOLGA8B	47 SLC4A7	12 NTRK3	47 EHHADH		12 ATP2C1
13 FANCM	13 SEC23B	13 TNK1	13 GRM6	48 TYRO3	13 TCF7L2	48 EML5		13 SLC22A10
14 GEN1	14 ARL14EP	14 E4F1	14 FANCD2OS	49 OR4F17	14 PIK3CG	49 FIGNL1		14 PDS5B
15 MEN1	15 CCD7	15 GSG2	15 SCN7A	50 RIC1	15 EPHA10	50 GINS4		15 CLINT1
16 MLH1	16 ENO3	16 PTPRN	16 NR3C2	51 SERPINF1	16 PAK6	51 GOLGA8B		16 PRRC2C
17 MRE11A	17 OPRM1	17 TMEM161A	17 ABCC2	52 LRIG3	17 IRAK4	52 GZMB		17 EFCAB5
18 MSH2	18 MICAL1	18 NUDT1	18 SLC4A8	53 ADRA1A	18 EGFR	53 HCAR1		18 CCDC66
19 MSH6	19 ASIP	19 NLRP12	19 LIPC	54 SIPA1L1	19 PRKCG	54 MAK		19 TIAM2
20 MUTYH	20 C6orf57 (SDHAF4)	20 DKKL1	20 NCKAP1L	55 KIF4B	20 RASA2	55 MARCO		20 PYROXD1
21 NBN	21 PLD2	21 SRRM2	21 IQGAP2	56 EPN3	21 ATR	56 MCM5		21 ADAM29
22 NF1	22 ABCC2	22 SNX33	22 TRIO	57 TSEN2	22 TAB1	57 METTL2A		22 ERCC6
23 PALB2	23 XDH	23 TACC3	23 PARP2	58 GNE	23 DNAJC11	58 NTHL1		23 ERCC3
24 PIK3CA	24 KRT40	24 WDR62	24 CDK11A	59 ADSSL1	24 SLC10A6	59 PCBPA		
25 PMS2	25 NEK1	25 SCAF1	25 AUNIP	60 MAGI1	25 C2CD4A	60 PHAX		
26 PPM1D	26 CIDEB	26 TBP	26 ZWINT		26 FRMPD1	61 PINX1		
27 PTEN	27 RECQL	27 PCF11	27 TMEM206		27 SH2D6	62 RAD1		
28 RAD50	28 SLC2A8	28 HIST1H2BD	28 COL5A2		28 FAM83B	63 RASEF		
29 RAD51C	29 DUOX2	29 SYDE1	29 BRIP1		29 UBE2U	64 RGS22		
30 RAD51D	30 PCK2	30 AGFG2	30 FARP2		30 MMP27	65 RNF181		
31 RECQL	31 TRPM4	31 ACAD9	31 SLC4A9		31 PDCC11	66 SIRT3		
32 RINT1	32 EEFSEC	32 SRRT	32 SLC22A5		32 HTN1	67 SLC22A13		
33 STK11	33 SERPINB10	33 NUP107	33 FOXM1		33 ADAMTS12	68 SLX4		
34 TP53	34 FARP2	34 YEATS4	34 MTMR11		34 ANKRD53	69 SMARCA2		
35 XRCC2	35 NADSYN1	35 ZC3H10	35 AMFR		35 ARHGEF10L	70 TNC		
	36 BLM							

Für die retrospektive Auswertung bereits dokumentierter Genpaneluntersuchungen wurden die beiden jeweils 34 Gene umfassenden TruRisk® Panel Versionen v1.0 und v2.0 verglichen. Das TruRisk® Genpanel wurde für die Analyse von Brust- und Eierstockkrebs assoziierten Risikogenen entwickelt und wird in der Routinediagnostik in den verschiedenen Zentren des GC-HBOC eingesetzt. Neben der vom GC-HBOC definierten 10 Core-Gene (*ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CHD1*, *CHEK2*, *NBN*, *PALB2*, *RAD51C*, *RAD51D*, *TP53*) werden dabei zusätzliche Forschungsgene berücksichtigt, deren Einsatz einem ständigen

Validierungsprozess unterlegen ist und in verschiedenen Versionen dem aktuellen Forschungsstand angepasst wird.



Die finale Genauswahl setzt sich letztlich aus der Überschneidungssumme der eingesetzten verschiedenen TruRisk® und PERSPECTIVE-Panelgene zusammen und schließt insgesamt 27 Gene ein. Neben der bereits aufgelisteten Core-Gene werden dabei ebenso die Gene *BARD1*, *BRIP1*, *FAM175A*, *FANCM*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *MRE11A*, *MUTYH*, *PIK3CA*, *PMS2*, *PPM1D*, *PTEN*, *RAD50*, *RINT1*, *STK11*, *XRCC1* einbezogen.

## 6.2.2 DNA-Konzentrationsbestimmung und Verdünnung

Für die DNA-Quantifizierung in Vorbereitung auf die darauffolgende NGS-Prozessierung wurden vorab 96-Well-Mikroplatten (Thermo Fisher Scientific, USA) mit den zu analysierenden Proben zusammengestellt. Um die genaue DNA-Konzentration der einzelnen Patientenproben zu ermitteln wurde das Quant-IT™ High Sensivity Kit für Proben bis 100mg/μl und das Broad Range Kit für Proben bis 1000ng/μl verwendet. Zunächst wurde entlang des Arbeitsprotokolls die Quant-IT Working Solution, bestehend aus 199μl Quant-IT Puffer und 1μl Quant-IT Reagent je Standard und Probe angesetzt. Während die Standards in einem Verhältnis von 190μl Working Solution zu 10μl Probe kombiniert wurden, entsprach das Mischungsverhältnis der zu messenden DNA-Proben 1μl Probe zu 199μl Working Solution. Für Einzelmessungen wurde darüber hinaus das Qubit™ dsDNA Assay Kit (Invitrogen, USA) verwendet. Die Quantifizierung der DNA-Lösungen erfolgte schließlich über das TECAN-Mikroplatten-Reader-System (TECAN, Männersdorf, Schweiz), sowie über das Qubit™ Fluorometer und dient als Grundlage für darauffolgende DNA-Verdünnungsschritte. Nach der DNA-Konzentrationsbestimmung wurden die Proben in mehreren Verdünnungsschritten mit H<sub>2</sub>O auf 50ng/μl und letztlich auf 10ng/μl verdünnt. Die Weitergabe der zu untersuchenden DNA-Proben erfolgte schließlich in der vorgegebenen

Zielkonzentration von 10ng/μl und einem jeweiligen Volumen von 10μl in 96-Well Platten an das Cologne Center for Genomics (CCG).

### 6.2.3 Next-Generation-Sequenzierungen (NGS)

Unter dem Begriff Next-Generation Sequencing (NGS) werden genanalytische Hochdurchsatzverfahren zusammengefasst, die die parallele Sequenzierung und gleichzeitige Vervielfältigung von DNA-Fragmenten ermöglichen. Die kostengünstige und zeitsparende NGS-Technologie wird unter anderem in der molekulargenetischen Forschung und Diagnostik eingesetzt und bietet aufgrund ihrer extrem hohen Sequenzierkapazität, höheren diagnostischen Sensitivität und vereinfachten Handhabung eine verlässliche Alternative zur klassischen Einzelsequenzierung nach Sanger. Neben Gesamtgenomsequenzierungen, werden bei Exomsequenzierungen lediglich die kodierenden Bereiche des Genoms berücksichtigt. Darüber hinaus beschränkt sich die parallele Anreicherung und Vervielfältigung der Patienten-DNA bei der Multigen-Panel-Sequenzierung auf kodierende Exons ausgewählter krankheitsspezifischer Gene von möglicher klinischer Relevanz.

Die Sequenzanalysen der zu untersuchenden Proben wurden in der vorliegenden Untersuchung als Auftrags-Sequenzierungen im Cologne Center for Genomics (CCG) auf dem HiSeq4000 sowie NovaSeq 6000 von Illumina (Illumina, San Diego, USA) vorgenommen. Für die Sequenzierung wurden die kodierenden Genabschnitte der auf dem PERSPECTIVE-Panel berücksichtigten Gene nach dem *Agilent SureSelect<sup>QXT</sup> Target Enrichment* Protokoll der Firma Agilent Technologies nach Herstellerangaben angereichert. Die Illumina-Sequenzierung folgt dem Prinzip der „Sequenzierung durch Synthese“, wobei der Einbau der unterschiedlichen Basen über Fluoreszenzsignale gemessen wird. Bei diesem Ansatz wird DNA fragmentiert und über spezifisch ligierte Adaptoren an einen Glasobjektträger (*FlowCell*) gebunden, auf dem die Sequenzierungsreaktion stattfindet. Anschließend werden die DNA-Fragmente per Brückenamplifikation vervielfältigt und es entstehen auf der Trägerplatte Clusterbereiche identischer Sequenz. Der spezifische Einbau eines zur DNA-Matrize komplementären, fluoreszenzmarkierten Nukleotids kann schließlich detektiert werden.<sup>162,163</sup> Durch den gleichzeitigen softwaregestützten Abgleich gegen das menschliche Referenzgenom GRCh38/hg19 werden die sequenzierten DNA-Fragmente, die sogenannten Reads, in die richtige Reihenfolge gebracht („Alignment“) und dargestellt. Die Daten der NGS-Analyse wurden online über die Analyse-Pipeline „Varbank“ des CCGs mit zugehöriger Benutzerplattform zur spezifischen Auswertung zur Verfügung gestellt.

#### 6.2.4 Bewertung der Varianten – Datenbanken und Software

Varbank	<a href="https://varbank.ccg.uni-koeln.de/">https://varbank.ccg.uni-koeln.de/</a>
FinchTV	Geospiza
Ensembl database	<a href="http://www.ensembl.org/index.html">http://www.ensembl.org/index.html</a>
UCSC genome browse	w
ClinVar	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar</a>
ExAC Exome Aggregation Consortium	<a href="http://www.exac.broadinstitute.org">http://www.exac.broadinstitute.org</a>

Mit der Einführung von NGS-Technologien und der damit einhergehenden enormen Erweiterung der Komplexität der generierten Daten, stiegen auch die bioinformatischen Anforderungen, diese Datenmengen sicher auszuwerten.

Um die auffälligen Sequenzen der analysierten Patienten-DNA mit der korrekten Referenzsequenz der Gene vergleichen zu können, wurden den ausgewählten Genen eine entsprechende Referenzsequenz nach der NM-Nomenklatur aus dem NCBI-National Center for Biotechnology Information, beziehungsweise nach der ENST-Nomenklatur (Ensembl genome browser) zugeordnet.

<i>ATM</i>	NM_000051.3	ENST00000278616
<i>BARD1</i>	NM_000465.3	ENST00000260947
<i>BRCA1</i>	NM_007294.3	ENST00000357654
<i>BRCA2</i>	NM_000059.3	ENST00000544455
<i>BRIP1</i>	NM_032043.2	ENST00000259008
<i>CDH1</i>	NM_004360.4	ENST00000261769
<i>CHEK2</i>	NM_007194.3	ENST00000328354
<i>FAM175A</i>	NM_139076.2	ENST00000321945
<i>FANCM</i>	NM_020937.3	ENST00000267430
<i>MLH1</i>	NM_000249.3	ENST00000231790
<i>MRE11A</i>	NM_005591.3	ENST00000323929
<i>MSH2</i>	NM_000251.2	ENST00000233146
<i>MSH6</i>	NM_000179.2	ENST00000234420
<i>MUTYH</i>	NM_0011428425.1	ENST00000450313
<i>NBN</i>	NM_002485.4	ENST00000265433
<i>PALB2</i>	NM_024675.3	ENST00000261584
<i>PIK3CA</i>	NM_006318.3	ENST00000263967
<i>PMS2</i>	NM_000535.6	ENST00000265849
<i>PPM1D</i>	NM_003620.3	ENST00000305921
<i>PTEN</i>	NM_000314.6	ENST00000371953

<i>RAD50</i>	NM_005732.3	ENST00000378823
<i>RAD51C</i>	NM_058216.2	ENST00000337432
<i>RAD51D</i>	NM_002878.3	ENST00000345365
<i>RINT1</i>	NM_021930.4	ENST00000257700
<i>STK11</i>	NM_000455.4	ENST00000326873
<i>TP53</i>	NM_000546.5	ENST00000269305
<i>XRCC2</i>	NM_005431.1	ENST00000359321

Die einzelnen identifizierten Sequenzvarianten in den betreffenden Genen wurden mit Hilfe der Software Alamut Visual version 2.4 (Interactive Biosoftware, Rouen, Frankreich) und den darin enthaltenen in-silico Programmen validiert und nach ihrer jeweiligen Pathogenität klassifiziert. Die Klassifizierung der Varianten basiert auf Kriterien des American college of medical genetics and genomics (ACMG)<sup>42</sup> Die detektierten Varianten werden entsprechend der Empfehlungen der International Agency for Research on Cancer (IARC) in fünf Gruppen eingeteilt und entlang ihrer Sequenzfunktionalität bewertet.<sup>43</sup> Klasse 1 entspricht dabei der benignen Normavariante und präsentiert sich ohne klinische Relevanz, während Klasse 2-Varianten („Likely benign“) als wahrscheinliche Normvarianten gelten. Varianten unklarer klinischer Relevanz (VUS) werden der Klasse 3 zugeordnet und stellen vor dem Hintergrund der enormen Zunahme der durch NGS-Verfahren generierten genomischen Daten die bislang größte Herausforderung in der Interpretation von Varianten dar. Genvarianten der Klasse 4 gelten als wahrscheinlich pathogen und werden mit den der Klasse 5 zugeordneten Varianten, mit einem relevanten Funktionsverlust als pathogene Varianten zusammengefasst.

### 6.2.5 Validierung der Kandidatengene

Für die laborchemische Überprüfung der detektierten Varianten durch Sequenzierungen nach Sanger und die Vervielfältigung der DNA mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) werden für jedes Gen je ein Vorwärts- und ein Rückwärts Primer benötigt. Es handelt sich dabei um Oligonukleotide, die als Startpunkt für DNA-replizierende Enzyme wie die DNA-Polymerasen dienen. Größtenteils konnte dabei auf im Labor etablierte Diagnostik-Primer, sowie bereits vorhandene Primer für Forschungszwecke der Firma Metabion international AG zurückgegriffen werden (*ATM*, *BRCA1/2*, *CDH1*, *CHEK2*, *FANCM*, *NBN*, *PALB2*, *TP53*). Für die Gene *MUTYH*, *PPM1D* und *RAD50* mussten in einem ersten Schritt passende Primer designt und bestellt werden. Dazu wurde zunächst die genaue Lokalisation der Punktmutationen aus dem NGS-Datensatz entnommen und über die Online-Plattform Ensembl dem entsprechenden Exon zugeordnet. Durch die Verwendung von Exon-flankierenden Primern, die in der Regel kurze nicht-kodierende Bereiche des Introns

abdecken werden die kodierenden Genabschnitte mittels PCR amplifiziert und anschließend mit der Kettenabbruch-Methode nach Sanger sequenziert.

### 6.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Sequenzanalyse des gewünschten Genabschnitts wird das Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet. Mittels QIAGEN®-Multiplex PCR-Kit (QIAGEN®, Hilden, Deutschland) für die Sanger Sequenzierung findet das Verfahren Anwendung in der Bestätigung von Sequenzveränderungen nach erfolgter kompletter Genanalyse über NGS. Die PCR-Technik beschreibt eine enzymatische Methode zur in vitro Amplifikation definierter DNA-Fragmente und beruht auf der zyklischen temperaturabhängigen Wiederholung von Denaturierung, Anlagerung von Primern und Elongation des DNA-Strangs. Bestimmte Sequenzabschnitte werden dabei durch die Verwendung sequenzspezifischer M13-Primer exponentiell vervielfältigt. Zunächst wird dazu ein PCR-Mastermix, bestehend aus 5µl QIAGEN®-Multiplex PCR Mix, 2µl H<sub>2</sub>O und jeweils 1µl sequenzspezifischem Forward- und Reverse-Primer pro Reaktion, angesetzt. Nach der Zugabe von 1µl der zu untersuchenden, auf 30ng/µl verdünnten DNA wird der Reaktionsansatz auf 95°C erhitzt und die DNA thermisch denaturiert. Es entstehen zwei zueinander komplementäre DNA-Einzelstränge. Die anschließende Absenkung der Temperatur auf 54-60°C ermöglicht die Hybridisierung, beziehungsweise Anlagerung der Primer an die Einzelstränge. Im Folgeschritt lagert eine bei 72°C aktive DNA-Polymerase in 3'-5' Richtung Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP) mit ihrem 5'-Ende an das 3'-OH-Ende der Primer an und es entstehen zwei Doppelstränge, die die durch den Primer festgelegte Sequenz aufweisen. Die PCR-Ansätze wurden über das vollautomatisierte zyklische Temperaturregelungssystem eines Thermocyclers mit folgender Programmierung inkubiert.

- I. Denaturierung/ Aktivierung bei 95°C für 10 Minuten
    - i. Denaturierung bei 95°C für 15 Sekunden
    - ii. Primer-Hybridisierung bei 54°C-60°C für 30 Sekunden
    - iii. Amplifikation bei 72°C für 60 Sekunden
    - iv. Finale Amplifikation bei 72°C für 7 Minuten
  - II. Inkubation/ Pause bei 4°C
- } 31 Zyklen

### **6.2.7 Enzymatische Aufreinigung der PCR-Produkte**

Damit die PCR-Produkte weiterverarbeitet werden können, ist eine enzymatische Aufreinigung erforderlich, die das Ziel verfolgt, überschüssige Desoxynucleosid-Triphosphate und Primer aus PCR- und Sequenzierungsansätzen zu entfernen. Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgt mittels ExoSAP-IT™ (Affymetrix, UK Ltd, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) und unter Verwendung des Thermocyclers. Dabei wird über den Einsatz der Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) die DNA phosphoryliert, während das Enzym Exonuclease 1 (Exo) verbliebene Nucleotide und Primer beseitigt. Im Thermocycler werden die Reaktionsansätze, bestehend aus 1,5µl ExoSAP-IT™ und 3µl PCR-Produkt pro Probe, zunächst für 15 Minuten bei 37°C inkubiert, um die Enzyme zu aktivieren. Anschließend folgt die Deaktivierung der Enzyme bei 80°C für 15 Minuten und Bereitstellung der aufgereinigten Produkte für die Sequenzierung.

### **6.2.8 Sequenzanalyse nach der Sanger Kettenabbruch-Methode**

Die Sequenzanalyse nach der Sanger Kettenabbruch-Methode dient im Allgemeinen der korrekten Bestimmung der Basenabfolge innerhalb eines bestimmten DNA-Abschnitts und wird zur Überprüfung auffälliger Befunde im Anschluss an eine NGS-Analyse durchgeführt. Seit ihrer Einführung in den 1970er Jahren, gilt die Methode als Goldstandard für die DNA-Sequenzierung. Sie basiert auf dem Einbau vier verschiedener fluoreszenzfarbstoffmarkierter Didesoxynucleosid-Triphosphate (ddNTPs), die durch das Fehlen einer 3'OH-Gruppe charakterisiert sind, und der anschließenden Detektion der entsprechenden Farbstoffsignale<sup>o</sup>. Ausgehend von einem eingesetzten Primer bekannter Sequenz wird durch die DNA-Polymerase einer der beiden komplementären DNA-Stränge dem Prinzip der Elongation folgend verlängert. Die zufällige Eingliederung eines modifizierten ddNTP Nucleotids führt zu einem vorzeitigen Kettenabbruch und zur Entstehung von Sequenzprodukten unterschiedlicher Länge. In der vorliegenden Arbeit wurde eine vollautomatisierte Sanger Sequenzierungsmethode verwendet, bei der die Kettenabbruchprodukte mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt werden und die Abfolge der detektierten Farbsignale die Sequenz der Basen des sequenzierten DNA-Strangs wiedergeben. Für die Überprüfung von auffälligen DNA-Sequenzen der vorangegangenen NGS-Analyse wurde das ABI PRISM BigDye Terminator v1.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA) eingesetzt. Der zunächst angesetzte Mastermix für die Sequenzier-PCR bestand aus 6,75µl ddH<sub>2</sub>O (doppelt destilliertem Wasser), 0,75µl BigDye™ Terminator v.1.1 und 1µl Sequencing Puffer und wurde anschließend pro zu überprüfende Probe mit 0,5µl sequenzspezifischem Primer (forward oder reverse) und jeweils 1µl des aufgereinigten PCR-Produkts versetzt. Die

Sequenzierung nach Sanger ähnelt dem temperaturabhängigen Ablauf einer herkömmlichen PCR und orientiert sich an dem wie folgt programmierten Ablaufschema des Thermocyclers.

- 6 Initiale Denaturierung bei 96°C für 30 Sekunden
    - i. Denaturierung bei 96°C für 10 Sekunden
    - ii. Primer-Hybridisierung bei 55°C für 5 Sekunden
    - iii. Amplifikation bei 60°C für 90 Sekunden
  - II. Inkubation/ Pause bei 4°C
- } 15 Zyklen

Die terminale Sequenzierung wurde über den Genetic Analyzer 3500xL (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA) durchgeführt. Infolge der kapillarelektrophoretischen Auftrennung ließen sich die verschiedenen farbstoffmarkierten ddNTPs durch Laserbestrahlung zur Fluoreszenz anregen und in einen entsprechenden Peak im Elektropherogramm abbilden. Die erhaltenen Sequenzen wurden anschließend mit dem Programm FinchTV Version 1.4.0 (Geospiza Inc, USA) ausgewertet. Ein Teil der Sanger Sequenzanalysen wurde als Auftragssequenzierung im CCG durchgeführt und im Anschluss ebenso über das Programm FinchTV und den parallelen Abgleich über die bioinformatische Analysesoftware Alamut Visual™ bestätigt.

### **6.2.9 Copy Number Variation (CNV)-Detektion und Multiplex Ligation Probe Amplification (MLPA)**

Die Ergebnisdateien der NGS-Analysen aller Proben eines Laufs werden im Folgeschritt mittels bioinformatischer Analysesoftware auf große Deletionen und Duplikationen aller Panel Gene untersucht. Die bioinformatische Auswertung wurde von Dr. Corinna Ernst, Zentrum Familiärer Brust- und Eierstockkrebs Uniklinik Köln, durchgeführt. Zum Erkennen und Auslesen der Kopienzahlvariationen (CNV) aus gezielten Panel-Sequenzierungsdaten dienen vordergründig die beiden Analysetools ExomeDepth und panelcn.MOPS. Auffällige Sequenzen wurden anschließend MLPA-gestützt überprüft, um die detektierten CNVs zu bestätigen.

Die *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA)-Analyse beschreibt eine Methode zur relativen quantitativen Darstellung von Kopienzahlveränderungen in bis zu 50 unterschiedlichen genomischen DNA bzw. RNA. Proben in einem Versuchsansatz. Die Methode wurde erstmals 2002 beschrieben und ermöglicht anhand von Dosisunterschieden Rückschlüsse aus Duplikationen und Deletionen in den betreffenden Genbereichen.<sup>165</sup>

Zunächst werden die Exon-spezifischen Sonden an der Zielsequenz hybridisiert und anschließend ligiert, sodass ein einzelnes, zusammenhängendes DNA-Fragment entsteht. Das Ligationsprodukt wird anschließend durch die Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert und letztlich für die Fragmentanalyse mittels Kapillarelektrophorese auf dem Genetic Analyzer 3500xl vorbereitet. Zur finalen Analyse der MLPA Daten konnte die Software Coffalyse DB v. 13010 der Firma MRC Holland angewandt werden.

In dieser Arbeit wurden die SALSA MLPA-Kits der Firma MRC Holland P041 ATM-1 und P042 ATM-2 zur Detektion von genomischen Deletionen und Duplikationen im ATM-Gen verwendet, sowie das MLPA-KIT P190 für die CNV-Detektion in CHEK2. Die MLPA Analysen wurden freundlicherweise von Mohammad Kayali, Zentrum Familiärer Brust- und Eierstockkrebs, Uniklinik Köln durchgeführt.