

Strahlensensibilität und ATM-Gen-Mutationen in Brustkrebspatientinnen – eine prospektive Analyse

Michael Bremer, Dirk Rades, Thilo Dörk, Regina Bendix, Manfred Stuhmann, Johann Hinrich Karstens

Zusammenfassung

Interindividuelle Unterschiede der intrinsischen Strahlenempfindlichkeit tragen trotz gleicher Behandlungsparameter zu unterschiedlichen Strahlenreaktionen bei. Die Kenntnis und mögliche Voraussage solcher intrinsischen Faktoren ist für den Strahlentherapeuten zur Festlegung der Behandlungsstrategie und Bestrahlungsdosen von besonderer Relevanz. Epidemiologischen Studien zufolge soll bei Brustkrebspatientinnen eine erhöhte Prävalenz heterozygoter Anlageträgerinnen für Ataxia teleangiectatica (AT) vorliegen und möglicherweise mit einer erhöhten Strahlensensibilität einhergehen. An einem unselektionierten Kollektiv von 903 postoperativ adjuvant bestrahlten Brustkrebspatientinnen wurden Blutproben zur DNA-Analyse entnommen und akute und chronische Strahlenreaktionen prospektiv erfaßt. Die molekulargenetische Analyse von bisher 200 Patientinnen konnte bisher vier potentiell prädisponierende Aminosäuresubstitutionen identifizieren. Die betreffenden Patientinnen zeigten keine abnormen akuten oder chronischen Strahlenreaktionen. Das Fehlen klassisch deletärer Mutationen des ATM-Gens bestätigt bisher nicht den erwarteten hohen Anteil AT-heterozygoter Genträgerinnen unter Brustkrebspatientinnen. Die Ausdehnung der molekulargenetischen Analyse auf das Gesamtkollektiv mit klinischer Evaluation der Patientinnen mit nachgewiesenen ATM-Aminosäurevarianten soll mögliche Unterschiede in der Strahlenreaktion, dem Krankheitsverlauf und der Familienanamnese im Vergleich zum Gesamtkollektiv aufdecken und auch Aussagen zur Kausalität ermöglichen.

Schlüsselwörter

Strahlentherapie, Strahlensensibilität, ATM-Gen, Brustkrebs

Summary

Radiosensitivity and ATM gene mutations in breast cancer patients – a prospective analysis

Interindividual variations in the intrinsic radiosensitivity contribute to different normal tissue reaction in patients undergoing radiotherapy. The increased radiation reaction in some patients is probably caused by genetic predisposition like AT heterozygosity. Epidemiological studies estimated a high prevalence of AT heterozygotes in breast cancer patients possibly combined with an increased radiosensitivity. Therefore we investigated 903 unselected breast cancer patients receiving adjuvant radiotherapy post-operatively at our department by taking a cancer related family history, providing blood samples for DNA analysis after informed consent and following acute and chronic radiation related toxicity prospectively. After scanning the encoding region by SSCP analysis of genomic PCR products from 192 patients, four patients were found to be heterozygous for rare amino acid substitutions of the ATM gene, whereas none was found to harbour a truncating mutation. No increased acute or late radiation related normal tissue reaction could be observed in these patients. These results do not support the high estimates for AT heterozygosity in breast cancer patients, but it will be important to extend the observed missense substitutions to the whole series and to clinically evaluate whether breast cancer patients found to be heterozygous for these substitutions differ in any parameter as radiosensitivity, cancer related family history or clinical course of disease.

Keywords

Radiotherapy, radiosensitivity, ATM gene, breast cancer

Hintergrund

Interindividuelle Unterschiede in der zellulären Strahlenempfindlichkeit von klinisch unauffälligen Bestrahlungspatienten äußern sich in unterschiedlichen Ausprägungsgraden akuter und chronischer Strahlenreaktionen (8, 12, 15). Turesson et al. (16) konnten in einer prospektiv angelegten systematischen klinischen Analyse reproduzierbare individuelle Unterschiede in der Strahlensensitivität von Brustkrebspatientinnen trotz identischer Bestrahlungsparameter (Zielvolumen, Einzel- und Gesamtdosis, Fraktionierung) nachweisen. 70% dieser Unterschiede waren mit klinischen Faktoren oder präexistierenden Komorbiditäten (z.B. Alter, Blutdruck, Rauchen, Diabetes mellitus) nicht zu erklären und intrinsischen, mitunter genetisch determinierten Prädispositoren zuzuordnen. Möglicherweise sind Patienten mit einer genetisch erhöhten Strahlensensitivität in der Gruppe von Patienten, welche schwere Strahlenreaktionen entwickeln, überrepräsentiert. Eine Identifizierung solcher Patienten könnte eine Abschätzung des Nebenwirkungsrisikos und damit eine Individualisierung von Toleranzdosen ermöglichen, um das Auftreten von schweren Bestrahlungsfolgen bei besonders sensiblen Patienten zu verhindern. Besonders dramatischer Ausdruck einer genetischen Prädisposition ist die extrem erhöhte Strahlensensibilität von Patienten, welche an Ataxia teleangiectatica (AT) erkrankt sind und eine Strahlentherapie erhalten haben. In einzelnen Fällen wurden deletäre, zum Teil tödliche Strahlenfolgen dieser Patienten beschrieben (3,9).

Es wird geschätzt, daß 10–15% der Mammakarzinomerkrankungen auf eine genetische Prädisposition zurückzuführen sind. Die große Mehrzahl der Brustkrebspatientinnen in Deutschland hat nur eine schwach positive oder unauffällige Familienanamnese. Hier könnte das Ataxia teleangiectatica-Gen (ATM-Gen) als genetische Prädisposition mit niedriger Penetranz einen besonderen Stellenwert einnehmen.

Epidemiologische Studien (1,13) haben wiederholt ein erhöhtes Risiko für eine Mammakarzinomerkrankung bei AT-heterozygoten Anlageträgerinnen

Tab 1**Familienanamnese**

	%
mindestens ein Malignom in der Familie	71,8
mindestens ein Mammakarzinom in der Familie	28,1
prämenopausales Mammakarzinom (< 50 Jahre) und mindestens ein Mammakarzinom in der Familie	7,6
postmenopausales Mammakarzinom (> 50 Jahre) und mindestens ein Mammakarzinom bei Verwandter 1. oder 2. Grades	3,3

Tab 2**Patientencharakteristika**

medianes Alter (Spannweite)	57 (27–85)	
Patientenzahl	903	
Alter		
< 40 Jahre	63	(7,0%)
< 50 Jahre	243	(26,9%)
> 50 Jahre	660	(73,1%)
bilaterales Mammakarzinom	57	(6,3%)

gezeigt. Für den Strahlentherapeuten ist von besonderem Interesse, daß bei AT-heterozygoten Brustkrebspatientinnen möglicherweise eine erhöhte Strahlensensibilität besteht, welche zumindest in vitro – bei allerdings grosser Bandbreite – nachgewiesen werden konnte (2,14). Die vermutete Prävalenz von AT-heterozygoten Brustkrebspatientinnen in einer Größenordnung von 5–9% (1, 13) unterstreicht die mögliche Bedeutung dieser genetischen Prädisposition, da nahezu alle Patientinnen nach brusterhaltender Therapie eines invasiven Mammakarzinoms eine adjuvante lokale Bestrahlung erhalten. Daten aus einem unselektierten Patientenkollektiv, welche über die tatsächliche Prävalenz Aufschluß geben könnten, fehlen jedoch bisher.

Ziel der hier vorgestellten Analyse ist deshalb die Abschätzung der klinischen Relevanz der AT-Heterozygotie bei Brustkrebspatientinnen an einem ausreichend großen unselektionierten Kollektiv durch Analyse deren Prävalenz, einer möglicherweise erhöhten Strahlensensibilität sowie des Krankheitsverlaufs und der familiären Belastung.

Patienten und Methodik

Seit 9/95 konnten bei 903 konsekutiven Brustkrebspatientinnen, die im Rahmen der Primärtherapie eine postoperativ adjuvante lokale Strahlentherapie in unserer Abteilung erhielten, nach schriftlichem informierten Einverständnis Blutproben zur DNA-Isolierung entnommen werden. Bei jeder Patientin wurde zudem eine tumorbezogene erweiterte und stan-

dardisierte Familienanamnese (Tab 1) erhoben. Die akuten und chronischen lokalen Strahlenreaktionen wurden prospektiv und nach einheitlichen Klassifizierungskriterien (akute Reaktionen: modifizierte CTC-Kriterien; chronische Reaktionen: LENT-SOMA Score) erfaßt.

Die Patientencharakteristika des Gesamtkollektivs sind in Tab2 aufgeführt. 28% erhielten eine sequentielle adjuvante Chemotherapie, 42,4% eine adjuvante Hormontherapie. Die postoperative Bestrahlung erfolgte nach CT-gestützter, rechnerplanoptimierter Bestrahlungsplanung mittels 6 MV-Photonen eines Linearbeschleunigers. Die mittlere Gesamtdosis im Bereich der Brust betrug 52 Gy (Einzeldosis: 1,8 Gy). Einen Elektronenboost (10-14 Gy) im Bereich des Tumorbettes erhielten 6,8% der Patientinnen. Eine Bestrahlung des supraklavikulären Lymphabflusses (Gesamtdosis: 45 Gy) erfolgte abhängig vom axillären Lymphknotenbefall in 14% der Fälle.

Ergebnisse

Die Patientencharakteristika unserer Patientinnen sowie die bei der Familienanamnese erhobene allgemeine Krebshäufigkeit und Brustkrebsfrequenz stimmen gut mit den in der Literatur angegebenen Daten überein, so daß von einem unselektionierten, repräsentativen Patientenkollektiv auszugehen ist (10,17). Legt man die von der Gesellschaft für Humangenetik formulierten Auswahlkriterien (6) zugrunde, so käme etwa jede 10. Patientin für ein genetisches Beratungsgespräch in Frage.

Die Darstellung der Ergebnisse der molekulargenetischen Analyse des ATM-Gens von bisher 192 zufällig ausgewählten Blutproben findet sich im Beitrag von R. Bendix in diesem Band. Eindeutig deletäre (trunkierende) Mutationen konnten bisher nicht nachgewiesen werden. Vier Patientinnen wiesen eine Heterozygotie für seltene ATM-Aminosäuresubstitutionen auf. Bei einer größeren Anzahl von Patientinnen konnten Aminosäurevarianten (missense-Mutationen) nachgewiesen werden, von denen einzelne möglicherweise eine prädisponierende Rolle bei der Brustkrebsgenese spielen könnten (7).

Die akuten und chronischen Strahlenreaktionen der oben genannten vier Patientinnen mit Heterozygotie für ATM-Aminosäuresubstitutionen (medianes Alter 59 Jahre, Spannweite: 48–68 Jahre) waren nach einem medianen follow-up von 28 Monaten nicht erhöht.

Bei einer dieser Patientinnen (59 Jahre) traten 15 Monate nach der Primärtherapie Knochenmetastasen auf, weshalb im weiteren Verlauf vier palliative Strahlenbehandlungen im Bereich der Wirbelsäule und Hüfte erforderlich wurden. Hinweise auf eine gesteigerte Radiosensibilität ergaben sich hierbei ebenfalls nicht. Die Schwester dieser Patientin war im Alter von 47 Jahren ebenfalls an Brustkrebs erkrankt. Bei der DNA-Analyse der von der Schwester gewonnenen Blutprobe konnte die betreffende ATM-Aminosäuresubstitution jedoch nicht nachgewiesen werden. Famili-

anamnese und klinischer Verlauf der übrigen drei Patientinnen wiesen keine Besonderheiten auf.

Im Gesamtkollektiv (n=903) traten keine höhergradigen (Grad 3 oder 4) Akuttoxizitäten von Haut und Unterhaut auf, hingegen konnte jeweils eine Patientin mit einer chronischen Grad 3 bzw. Grad 4 Reaktion beobachtet werden. Im letztgenannten Fall handelte es sich um eine 49-jährige Patientin mit brusterhaltend operiertem Mammakarzinom, welche sequentiell zu einer adjuvanten Chemotherapie (CMF-Schema) eine postoperative adjuvante Bestrahlung der rechten Mamma bis zu einer Gesamtdosis von 54 Gy (Einzeldosis: 1,8 Gy, 5 Fraktionen pro Woche) erhalten hatte. Neun Monate nach Abschluß der Therapie kam es zu einer chronischen fibrosierenden Reaktion der bestrahlten Brust, welche 6 Monate später eine Ablatio erforderlich machte. Die DNA-Analyse dieser Patientin ergab keinen Nachweis einer Mutation des ATM-Gens.

Diskussion

Unterschiede in der Strahlensensibilität des Normalgewebes von Bestrahlungspatienten können zumindest teilweise ihre Ursache in einer unterschiedlichen intrinsischen Strahlenempfindlichkeit der Zellen haben (8,12,15,16). Der AT-Heterozygotie könnte bei Brustkrebspatientinnen eine besondere Bedeutung zukommen (1, 13), allerdings ist deren Prävalenz an einem unselektierten Kollektiv und die klinische Relevanz der in vitro meßbaren intermediär erhöhten Strahlensensibilität unbekannt (5). Das von uns untersuchte Kollektiv von Brustkrebspatientinnen ist repräsentativ und von ausreichendem Umfang, um auf der Basis einer prospektiv Analyse Aussagen zur Prävalenz und klinischen Relevanz der AT-Heterozygotie bei Brustkrebspatientinnen machen zu können.

Bisher konnten keine nonsense-Mutationen (frame-shift-Mutationen) des ATM-Gens gefunden werden, welche mit einem Protein-Truncation-Test hätten aufgedeckt werden können. Dieses Ergebnis schließt einen möglichen Kausalzusammenhang von trunkieren-

den ATM-Mutationen bei der Brustkrebsentstehung nicht aus, bestätigt jedoch nicht die relativ hohen, auf epidemiologischen Studien beruhenden Prävalenzschätzungen.

Die nach Analyse von bisher 192 Blutproben gefundenen 4 Patientinnen mit ATM-Aminosäuresubstitutionen zeigten nach einer medianen Nachbeobachtungszeit von 28 Monaten keine abnormen akuten oder chronischen Strahlenreaktionen als möglichen Hinweis auf eine erhöhter Strahlensensibilität. Die wenigen bisher in der Literatur beschriebenen AT-heterozygoten Brustkrebspatientinnen, welche eine Strahlentherapie erhalten hatten, zeigten ebenfalls keine abnormen Strahlenreaktionen (4, 11). Aus klinischer Sicht konnten somit bisher keine Anhaltspunkte gefunden werden, die gegen ein brusterhaltendes Vorgehen mit adjuvanter Nachbestrahlung bei AT-heterozygoten Brustkrebspatientinnen sprechen würden.

Gegenstand der weiteren Untersuchungen ist die Ausdehnung der Analyse der bisher nachgewiesenen Aminosäurevarianten (missense-Mutationen) auf das Gesamtkollektiv. Die klinische Evaluation der AT-heterozygoten Brustkrebspatientinnen soll mögliche Unterschiede in den Strahlenreaktionen, dem Krankheitsverlauf sowie der Familienanamnese im Vergleich zum Gesamtkollektiv aufdecken. Auf der Grundlage der bisherigen Ergebnisse sind Probenanalysen von ca. 1000 Brustkrebspatientinnen erforderlich, um statistisch signifikante Aussagen zu ATM-Genmutationen und deren mögliche Bedeutung für Brustkrebskrankungen in der deutschen Bevölkerung machen zu können.

Literatur

1. Athma P, Rappaport R, Swift M (1996) Molecular genotyping shows that ataxia-telangiectasia heterozygotes are predisposed to breast cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 92: 130-134
2. Chen PC, Lavin MF, Kidson C (1978) Identification of ataxia-telangiectasia heterozygotes, a cancer prone population. *Nature* 274: 484-486
3. Cunliffe PN, Mann, JR, Cameron AH, Roberts KD (1975) Radiosensitivity in ataxia telangiectasia. *Br J Radiol* 48: 374-376
4. FitzGerald M, Bean J, Hegde SR, Unsal H, MacDonald DJ, Harkin DP, Finkelstein DM, Isselbacher KJ, Haber DA (1997) Heterozygous ATM

mutatons do not contribute to early onset breast cancer. *Nat Genet* 15: 307-310

5. Gatti RA (1998) Ataxia-Telangiectasia. In B Vogelstein, KW Kinzler (Hrsg) *The genetic basis of human cancer*. McGraw-Hill, New York: 275-300

6. Kommission für Öffentlichkeitsarbeit und ethische Fragen der Gesellschaft für Humangenetik (1995) Stellungnahme zur Entdeckung des Brustkrebsgens BRCA-1. *Med Genetik* 1: 8-10

7. Larson G, Zhang G, Ding S, Foldenhauer K, Udari N, Gatti RA, Neuberger D, Lunetta KL, Ruckdeschel JC, Longmate J, Flanagan S, Krontiris TE (1998) An allelic variant at the ATM locus is implicated in breast cancer susceptibility. *Genetic Testing* 1: 165-170

8. Loeffler JS, Harris JR, Dahlberg WK, Little JB (1990) In vitro radiosensitivity of human diploid fibroblasts derived from women with unusually sensitive clinical responses to definitive radiation therapy for breast cancer. *Radiat Res* 121: 227-231

9. Morgan JL, Holcomb TM, Morrissey RW (1968) Radiation reaction in ataxia telangiectasia. *Amer J Dis Child* 116: 557-558

10. Mose S, Adamietz IA, Thilmann C, Saran F, Pahnke R, Böttcher HD (1995) Die Prognose des bilateralen Mammakarzinoms im Vergleich zum unilateralen Mammatumor. *Strahlenther Onkol* 171: 207-213

11. Ramsay J, Birell G, Lavin M (1996) Breast cancer and radiotherapy in ataxia telangiectasia. *Lancet* 347: 1627

12. Smith KC, Hahn GM, Hoppe, RT, Earle JD (1980) Radiosensitivity in vitro of human fibroblasts derived from patients with a severe skin reaction to radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 6: 1573-1575

13. Swift M, Morrel D, Massey RB, Chase CI (1991) Incidence of cancer in 161 families affected by ataxia-telangiectasia. *N Engl J Med* 325: 1831-1836

14. Tchirkov A, Bay JO, Pernin D, Bignon YJ, Rio P, Grancho M, Kwiatkowski F, Giollant M, Malet, P, Verrelle P (1997) Detection of heterozygous carriers of the ataxia-telangiectasia (ATM) gene by G2 phase chromosomal radiosensitivity of peripheral blood lymphocytes. *Hum Genet* 101: 312-316

15. Tucker SL, Turesson I, Thames HD (1992) Evidence for individual differences in the radiosensitivity of human skin. *Eur J Cancer* 28A: 1783-1791

16. Turesson I, Nyman J, Holmberg E, Oden A (1996) Prognostic factors for acute and late skin re-actions in radiotherapy patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 36: 1065-1075

17. Weber W, Mosimann S, Müller HJ (1992) Die Bedeutung der Familienanamnese bei Frauen mit Mammakarzinom. *Schweiz. med. Wschr* 122: 345-347