

Frauenklinik und Poliklinik
der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktorin: Univ.-Prof. Dr. M. B. Kiechle)

Genetische Niedrigrisikovarianten beim familiären Mammakarzinom

Magdalena Lochmann

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. A. Meindl
2. Univ.-Prof. Dr. M. B. Kiechle

Die Dissertation wurde am 26.03.2012 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 18.07.2012 angenommen.

Abkürzungsverzeichnis

ACTL7B	Actin-like protein 7B
ADAM7	ADAM metallopeptidase domain 7
A	Adenin
CASP8	Apoptosis related cysteine peptidase 8
ATM	Ataxia teleangiectatica mutated
A2BP1	Ataxin 2-binding protein 1
Bp	Basenpaar
BRIP1	BRCA interactin protein C-terminal helicase 1
BASC	BRCA1 associated genome surveillance complex
BRCA1	Breast cancer 1, early onset
BRCA2	Breast cancer 2, early onset
BCAC	Breast cancer association consortium
CDH23	Cadherin like 23
CGEMS	Cancer genetisk markers of susceptibility project
CHEK2	Checkpoint homolog 2
CLLU1	Chronic lymphocytic leukemia up-regulated 1
CCDC93	Coiled coil domain containing 93
COGS	Collaborative oncological gene environment study
CIMBA	Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2
COX11	Cytochrome c oxidase assembly homolog
C	Cytosin
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid
ddNTP	Didesoxyribonukleotid
EGFLAM	EGF-like, fibronectin type III and laminin G domains
ESR1	Estrogen receptor 1
FGFR2	Fibroblast growth factor 2
GWAS	Genom wide association study
G	Guanin
HWE	Hardy-Weinberg equilibrium
KANK1	KN motif and ankyrin repeat domains 1

KORA	Kooperative Gesundheitsforschung in der Region Augsburg
LSP1	Lymphocyte specific protein 1
MMAB	Methylmalonic aciduria
MRPS30	Mitochondrial ribosomal protein S30
MAPKAPK2	Mitogen activated protein kinase activated protein kinase 2
MAP3K1	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1
MAF	Mutation analysis facility
NAD	Neutrophil actin dysfunktion
NEK10	NIMA (never in mitosis gene a)- related kinase 10
PALP2	Partner and localizer of BRCA2
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PKC	Protein kinase C
RAD51C	RAD51 homolog C
RAD51D	RAD51 homolog D
RDBP	RD RNA binding protein
RELN	Reelin
RNS	Ribonukleinsäure
STK11	Serin/Threonin proteinkinase 11
SNP	Single nukleotid polymorphism
SLC4A7	Solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter 7
SLC8A3	Solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger), member 3
T	Thymin
TLR1/TLR6	Toll-like receptor 1/Toll-like receptor 6
TLE1	Transducin like enhancer of split 1
TNRC9	TOX high mobility broup box family member 3
TNNT3	Troponin T type 3
TP53	Tumor protein 53
XRCC2	X-ray repair complementing defective repair 2

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	2
1 Einleitung	8
1.1 Das Mammakarzinom	8
1.2 Die Genetik und das Mammakarzinom	8
1.3 Gene mit hoher Penetranz.....	10
1.3.1 Gene mit hoher Mutationsfrequenz in Risikofamilien	10
1.3.2 Gene mit niedriger Mutationsfrequenz in Risikofamilien	12
1.4 Moderat penetrante Gene.....	13
1.5 Niedrigrisikovarianten	14
1.5.1 <i>FGFR2</i>	16
1.5.2 <i>TNRC9/TOX3</i>	16
1.5.3 <i>LSP1</i>	16
1.5.4 <i>MAP3K1</i>	16
1.5.5 2q35.....	17
1.6 Studien des Deutschen Konsortiums für Familiären Brust- und Eierstockkrebs (GC-HBOC)	17
1.6.1 Chip1.....	17
1.6.2 Chip2.....	17
1.6.3 Validierung neuer Kandidaten SNPs.....	17
1.7 Fragestellungen	18
2 Material und Methoden.....	19
2.1 Art der Studie.....	19
2.1.1 Aufklärung und Einverständnis.....	19
2.2 Studienkriterien.....	19

2.3	Chemikalien	20
2.4	Analysemethoden	20
2.4.1	Extraktion genomischer DNS	20
2.4.2	Konzentrationsbestimmung der DNS	20
2.4.3	Sequenzanalyse.....	21
2.4.4	MALDI-TOF®-Massenspektrometrie.....	27
2.5	Teile der Studie.....	29
2.5.1	<i>LSP1</i> -Genotypisierung	29
2.5.2	<i>LSP1</i> -Metaanalyse.....	29
2.5.3	Erweiterte Validierung	30
2.5.4	Sequenzanalyse <i>LSP1</i>	31
2.6	Statistische Methoden	31
2.6.1	<i>LSP1</i>	31
2.6.2	Validierung	33
2.6.3	BCAC und COGS.....	33
3	Ergebnisse	34
3.1	Validierungen eines zweiten Risikoallels im <i>LSP1</i> -Gen.....	34
3.1.1	Das Gen <i>LSP1</i>	34
3.1.2	Validierung des SNPs rs2271439	36
3.1.3	Metaanalyse <i>LSP1</i>	37
3.1.4	Statistische Berechnungen.....	39
3.2	Validierungen weiterer Kandidaten SNPs.....	44
3.2.1	Beschreibung der Varianten.....	46
3.3	Sequenzanalyse <i>LSP1</i>	49

3.3.1	Exon 1 der Isoform 1	50
3.3.2	Exon 1 der Isoform 2.1	50
3.3.3	Exon 1 der Isoform 2.2	50
3.3.4	Exon 2 der Isoform 2.1	51
3.3.5	Exon 1 der Isoform 2.3	51
3.3.6	Exon 3 der Isoform 1	51
3.3.7	Exon 4 der Isoform 1	51
3.3.8	Exon 5 der Isoform 1	51
3.3.9	Exon 6 der Isoform 1	51
3.3.10	Exon 7, Exon 8 und Exon 9 der Isoform 1	52
3.3.11	Exon 10 der Isoform 1	52
3.3.12	Exon 11 der Isoform 1	52
3.4	Auswahl von Kandidatengen-SNPs für „High-throughput“-Methoden innerhalb des BCAC	52
4	Diskussion	53
4.1	Diskussion der Methoden	53
4.2	Eigene Daten	54
4.2.1	Die Assoziation von rs2271439 mit dem Brustkrebsrisiko	54
4.2.2	Die Sequenzierung des Gens <i>LSP1</i>	56
4.3	Andere <i>LSP1</i> -Varianten	57
4.4	Das Protein LSP1	58
4.4.1	Expression in unterschiedlichen Geweben	58
4.4.2	Funktionen des Proteins	60
4.4.3	Einfluss von LSP1 bei der Entstehung des Mammakarzinoms	61

4.5	Validierung und Fortsetzung der Studien des GC-HBOC	62
4.6	BCAC.....	63
4.7	Stand der Forschung und Zukunftsaussichten	63
5	Zusammenfassung.....	70
Anhang		83
	DNS-Extraktion (Volumenangaben beziehen sich auf 2-3 ml Blut).....	83
	<i>LSP1</i> Genotypisierung.....	84
	Validierung.....	88
Abbildungsverzeichnis:		104
Tabellenverzeichnis:		105
Danksagung.....		107

1 Einleitung

1.1 Das Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist in Deutschland, mit einem Anteil von 28% an allen Tumorerkrankungen, mit Abstand die am häufigsten diagnostizierte Krebserkrankung der Frau (Robert-Koch-Institut 2010). Zwischen zehn und zwölf Prozent der Frauen erkranken im Laufe ihres Lebens an einem bösartigen Tumor der Brustdrüse (Robert-Koch-Institut 2010). Die Inzidenz der Brustkrebserkrankungen steigt seit den 1980er Jahren stetig, die Mortalität hingegen sinkt (Robert-Koch-Institut 2010). Die 5-Jahres-Überlebensrate, der in den Jahren 2000 bis 2004 diagnostizierten Patientinnen, lag bei 81% über alle Stadien (Robert-Koch-Institut 2010). Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 63 Jahren und damit niedriger als bei den meisten Krebserkrankungen (Robert-Koch-Institut 2010). Höheres Lebensalter, eine frühe Menarche, Kinderlosigkeit oder ein höheres Alter bei der ersten Geburt gelten ebenso als Risikofaktoren, wie ein später Beginn der Wechseljahre, Adipositas, Bewegungsmangel, ionisierende Strahlung, Rauchen und regelmäßiger Alkoholkonsum (Robert-Koch-Institut 2010; Terry et al. 2007; Schäffler et al. 2007; Apter et al. 1989). Auch die Einnahme hormoneller Antikonzeptiva und eine Hormonersatztherapie in Klimakterium und Postmenopause erhöhen das Brustkrebsrisiko (Robert-Koch-Institut 2010). Frauen, in deren Verwandtschaft Brustkrebserkrankungen aufgetreten sind, tragen ein vergleichsweise höheres Risiko (Robert-Koch-Institut 2010).

1.2 Die Genetik und das Mammakarzinom

Im Jahre 1757 verfasste Le Dran im *Mémoires de l'Académie Royale de Chirurgie* den ersten Bericht über eine familiäre Belastung mit Brustkrebs (Eisinger et al. 1998). Er berichtete über eine im Alter von 19 Jahren erkrankte Frau, deren Großmutter und Großonkel an einem Mammakarzinom verstorben waren (Eisinger et al. 1998). Die Frau gab an, die vorgeschlagene Mastektomie für sinnlos zu halten, da sie den Grund für ihre Erkrankung in einer familiären „Verunreinigung des Blutes mit einem krebserregenden Ferment“ sah (Eisinger et al. 1998). Heute ist bekannt, dass in 10-15% aller Brustkrebsfälle und in 25-40% aller Fälle vor dem 35. Lebensjahr eine familiäre

Prädisposition vorliegt (Lux et al. 2006). Die meisten Fälle von Brustkrebs treten somit sporadisch, also ohne familiäre Häufung auf. Es gibt verschiedene Gruppen von Genen, welche das Risiko für Brustkrebs erhöhen. Eine einzige Mutation in einem hochpenetranten Gen kann die Erkrankung auslösen. Typische Vertreter dieser Gruppe sind die Gene *BRCA1* und *BRCA2*, welche im Jahr 1994 entdeckt wurden (Miki et al. 1994; Wooster et al. 1994). Mutationen in diesen beiden Genen sind verantwortlich für etwa 3-8% aller und 25% familiärer Brustkrebsfälle, es handelt sich also um, in Risikofamilien, häufig auftretende Veränderungen (Lux et al. 2006; Meindl et al. 2011). Die anfangs vermutete Existenz eines weiteren Gens dieser Gruppe „*BRCA3*“ konnte bisher nicht bestätigt werden (Thompson et al. 2002). Typisch für die monogen vererbten Fälle sind ein frühes Erkrankungsalter und die Assoziation mit Ovarialkarzinomen (Lux et al. 2006). Es gibt eine weitere Gruppe von Genen mit hoher Penetranz, welche aber nur sehr selten mutiert sind, teilweise im Rahmen eines sogenannten Tumorsyndroms. Es wird angenommen, dass etwa 5% der familiären Fälle durch Syndrom-assoziierte Gene und weitere 45% durch andere, teilweise noch unbekannte hochpenetrante Gene verursacht werden (Ripperger et al. 2009; Meindl et al. 2011).

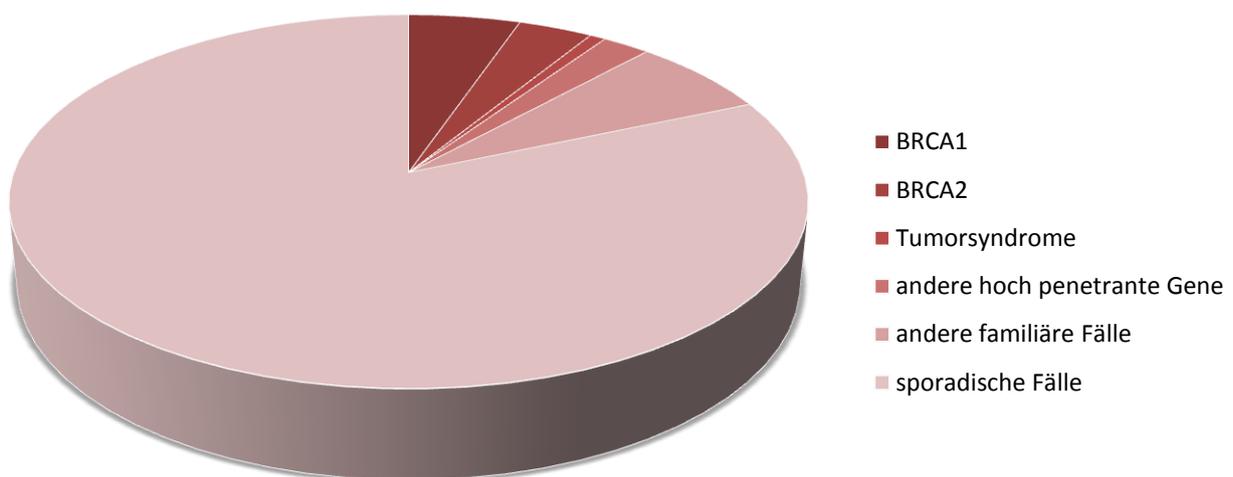


Abbildung 1.1: Anteil erblich bedingter Fälle an der Gesamtzahl aller Brustkrebsfälle (Meindl et al. 2011).

Die anderen familiären Fälle werden wahrscheinlich nicht durch Mutationen in einem hochpenetranten, sondern durch die kombinierte Wirkung einer oder mehrerer (3-4)

Risikovarianten in moderat penetranten Genen, welche teilweise noch unbekannt sind, verursacht (Smith et al. 2006; Meindl et al. 2011; Byrnes et al. 2008). Die Niedrigrisikovarianten spielen vor allem eine Rolle bei der Modifikation des Risikos bei hoch und moderat penetranten Genen (Meindl et al. 2011). Zur Ermittlung letzterer Varianten eignen sich genomweite Assoziationsstudien (GWAS).

1.3 Gene mit hoher Penetranz

1.3.1 Gene mit hoher Mutationsfrequenz in Risikofamilien

Die beiden einzigen bekannten Vertreter dieser Gruppe sind *BRCA1* (*Breast cancer 1, early onset*) und *BRCA2* (*Breast cancer 2, early onset*). Der durch sie monogen bedingte Brustkrebs wird autosomal-dominant, mit hoher, aber unvollständiger Penetranz vererbt (Murken 2006). Die Genprodukte der Tumorsuppressorgene *BRCA1* (17q21) und *BRCA2* (13q12) sind Proteine, welche eine Rolle in der Reparatur von Brüchen in der doppelsträngigen DNS spielen. Die Proteine bilden zusammen mit anderen Faktoren einen aus vielen Untereinheiten bestehenden Komplex, welcher „BRCA1 associated genome surveillance complex (BASC)“ genannt wird (University of California Santa Cruz). Durch das Prinzip des somatischen Verlusts des Wildtyp-Allels (loss of heterocycocyty) kann die Tumorentstehung in Trägern einer heterozygoten Keimbahnmutation erklärt werden (Niederacher et al. 1997). Tumore, welche aufgrund von Keimbahnmutationen in *BRCA1* entstanden sind, haben häufig bestimmte histopathologische Merkmale, für Tumoren in *BRCA2* Mutationsträgerinnen gilt dies dagegen nicht (Chappuis et al. 2000; Young et al. 2009). Bei *BRCA1* bedingten Tumoren handelt es sich meist um gering differenzierte (WHO G3) Tumoren vom duktalem Typ, welche keine Östrogen-, Progesteron- und HER2/neu-Rezeptoren exprimieren („Triple negative Tumoren“) (Chappuis et al. 2000; Young et al. 2009). Es gibt kontrovers diskutierte Hinweise darauf, dass neben dem Risiko für Brust- und Eierstockkrebs bei Trägerinnen einer Mutation in *BRCA1* auch das Risiko für bösartige Neubildungen in Uterus, Pankreas und Kolon erhöht sei (Lavie et al. 2000; Lal et al. 2000; Lin et al. 1999). Eine Risikoerhöhung für das Pankreas-, Magen-, Gallenblasen-, und Gallengangskarzinom sowie für das Melanom gilt,

bei Trägerinnen einer Mutation in *BRCA2*, hingegen als gesichert (Easton 1999). Bei Männern bewirken Keimbahnmutationen, ebenso wie bei Frauen, eine Erhöhung des Risikos für Pankreaskarzinome (Lal et al. 2000). Auch die Erkrankungsgefahr für Hodentumoren und früh auftretende Prostatakarzinome ist erhöht (Warner et al. 1999). Das Brustkrebsrisiko bei Männern mit Keimbahnmutationen in *BRCA2* ist stark erhöht, während Mutationen in *BRCA1* nur in Einzelfällen zum Mammakarzinom des Mannes führen (Easton 1999; Thompson und Easton 2002; Bauerfeind 2011). Wie auch bei sporadischen nimmt bei erblich bedingten Fällen das Erkrankungsrisiko mit jeder Dekade zu (Janni 2007). Dabei ist das mittlere Erkrankungsalter bei Trägerinnen einer *BRCA1*-Mutation bei Mitte bis Ende Vierzig und somit ein bis zwei Dekaden unter dem von sporadischen und *BRCA2* bedingten Fällen liegt (Janni 2007). Das kumulative Risiko für Frauen mit einer Mutation bis zu einem bestimmten Alter an Brust- oder Eierstockkrebs zu erkranken kann aus Abbildung 1.2 entnommen werden (Janni 2007; Bauerfeind 2011).

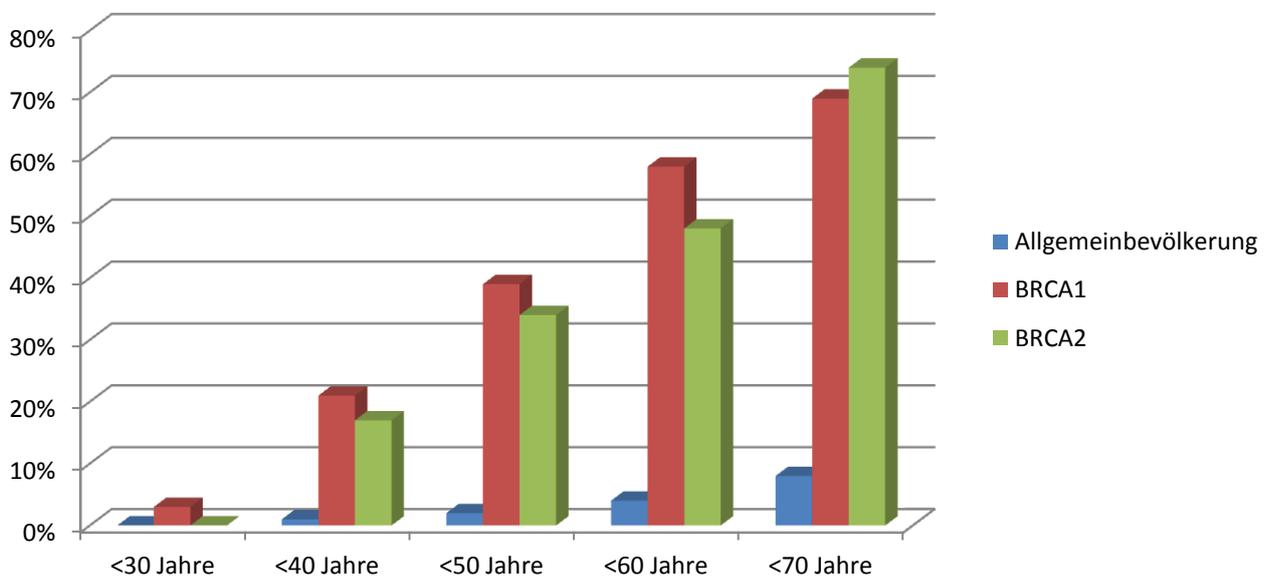


Abbildung 1.2: Kumulatives Brust- und Eierstockkrebsrisiko bei Trägerinnen von *BRCA1*- und *BRCA2*- Mutationen im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung (Janni 2007; Bauerfeind 2011).

Auch wenn das Brustkrebsrisiko für Trägerinnen einer Mutation in *BRCA1* und *BRCA2* stark erhöht ist, erkranken nicht alle Frauen. Die Betroffenen zeigen auch was das Alter bei Diagnose angeht eine große Variabilität (Rebbeck 2002). Ein Teil dieser Variabilität durch den Mutationstyp und die Lage der Mutation in den Genen zu erklären (Gayther et

al. 1997; Grade et al. 1997). Es zeigt sich jedoch auch eine interindividuelle Variabilität zwischen Frauen, welche verwandt sind und dieselbe Mutation tragen (Goldgar et al. 1994). Dies lässt vermuten, dass die durch die Mutation bedingte Risikoerhöhung nicht für alle Frauen gleich ist und es noch weitere Faktoren geben muss, welche die Risiken modifizieren (Rebbeck 2002). Es gibt Hinweise dafür, dass, ebenso wie bei sporadischen Fällen, Umweltfaktoren eine Rolle spielen (Rebbeck 2002). Auch eine Ovariectomie, welche mit einem reduzierten Östrogenspiegel einhergeht, vermindert das Brustkrebsrisiko bei Mutationsträgerinnen von *BRCA1* um etwa die Hälfte (Domchek et al. 2006; Domchek et al. 2010). Ein weiterer Faktor, welcher das Erkrankungsrisiko beeinflusst, ist die gesamte genetische Information einer Person außerhalb des mutierten Gens. So beeinflussen häufig vorkommende Varianten in verschiedenen Genen die Anfälligkeit für Brustkrebs (Rebbeck 2002). Es sind bereits einige solcher Gene bekannt, wahrscheinlich gibt es aber auch noch weitere, zurzeit noch unbekannte Risiko-modifizierende Gene. Viele dieser Varianten führen auch ohne zusätzliche Mutation in *BRCA1* oder *BRCA2* zu einer Risikoerhöhung und gehören damit auch zu einer der im Folgenden genannten Gruppen (Rebbeck 2002). Beispiele für Gene, welche mit einer Modifikation des Risikos für *BRCA1* und *BRCA2* Mutationsträgerinnen in Verbindung gebracht wurden, sind *RAD51*, *FGFR2*, *MAP3K1* und *LSP1* (Antoniou et al. 2007; Antoniou et al. 2008; Antoniou et al. 2009).

1.3.2 Gene mit niedriger Mutationsfrequenz in Risikofamilien

Erblich bedingter Brustkrebs tritt auch im Rahmen von weiteren autosomal-dominant vererbten Tumorsyndromen, wie dem Li-Fraumeni-, dem Cowden- und dem Peutz-Jeghers-Syndrom, auf (Hirshfield et al. 2010). Diesen Syndromen ist gemeinsam, dass sie auf Mutationen in Tumorsuppressorgenen, welche für Proteine, die eine Rolle in der Regulation des Zellzyklus und der Apoptose spielen, beruhen und zur Bildung von multiplen Tumoren, teilweise in jungen Jahren führen. Angeborene heterozygote Defekte im Gen *TP53* (*Tumor Protein 53*) führen zum Li-Fraumeni-Syndrom, für welches neben Sarkomen, Hirntumoren, akuten Leukämien und Nebennierentumoren auch früh auftretende Mammakarzinome typisch sind (Nichols et al. 2001). Das Cowden-Syndrom,

ein heterozygoter Defekt im Gen *PTEN* (*Phosphatase and tensin homolog*), führt neben anderen Krebserkrankungen auch zu Endometrium- und Mammakarzinomen (Hirshfield et al. 2010). Eine Keimbahnmutation im Gen *STK11* (*Serin/Threonin proteinkinase 11*) verursacht das Peutz-Jeghers-Syndrom, welches sich neben der Risikoerhöhung für viele Tumoren durch Hamartome und Pigmentflecken auszeichnet (Lim et al. 2003). Neben *BRCA1* und *BRCA2* scheint es noch weitere, teilweise unbekannte, hoch penetrante Brustkrebsgene zu geben, welche jedoch nicht so häufig mutiert sind. Ein Beispiel hierfür ist *RAD51C*, welches für ein Protein aus dem BRCA-assoziierten DNS-Reparaturweg kodiert (Meindl et al. 2010).

1.4 Moderat penetrante Gene

Die moderat penetranten Gene sind jeweils nur in wenigen Familien mit Brustkrebs (ca. 1 - 2%) verändert (Janni 2007). Wahrscheinlich ist die kombinierte Wirkung mehrerer dieser Genvarianten für etwa 50% der familiären Mammakarzinome bei Fehlen von *BRCA1*- und *BRCA2*- Mutationen verantwortlich (Meindl et al. 2011). Beispiele für diese Gruppe von Genen sind *CHEK2* (*Checkpoint homolog 2*), *ATM* (*Ataxia teleangiectatica mutated*), *BRIP1* (*BRCA interacting protein C-terminal helicase 1*) und *PALB2* (*Partner and localizer of BRCA2*) (Easton 2004; Renwick et al. 2006; Rahman et al. 2007; Meindl et al. 2011). Die Risikoerhöhung, zu welcher die jeweiligen Gene im nicht familiären Kontext bei heterozygotem Defekt führen, ist in Tabelle 1.1 angeführt (Meindl; Easton et al. 2007; Meindl et al. 2011). Im familiären Kontext scheinen die Varianten in diesen Genen einen stärkeren Effekt auf das Erkrankungsrisiko zu haben (Weischer et al. 2008; Meindl et al. 2011). So zeigt sich bei heterozygotem Vorliegen einer *CHEK2*-Mutation in nicht familiären Fällen eine Risikoerhöhung um den Faktor 2-3, während dieser im familiären Kontext bis zu 5 beträgt (Weischer et al. 2008; Meindl et al. 2011). Diese moderat penetranten Gene kodieren für Proteine aus dem DNS-Reparatursystem, an welchem auch *BRCA1* und *BRCA2* beteiligt sind (University of California Santa Cruz).

Gen	Risikoerhöhung bei heterozygotem Defekt
<i>CHEK2</i>	10-15%
<i>ATM</i>	14%
<i>PALB2</i>	10-15%

Tabelle 1.1: Erhöhung des relativen Brustkrebsrisikos bei heterozygoten Defekten in nicht familiärem Kontext.

1.5 Niedrigrisikovarianten

Das Genom der einzelnen Menschen unterscheidet sich voneinander durch das Vorhandensein unterschiedlicher genetischer Varianten, z.B. Mikrosatelliten und Einzelbasenpolymorphismen, sogenannten „Single nukleotid polymorphisms (SNP)“ (Murken 2006). Der Großteil der genetischen Diversität beruht auf solchen Unterschieden in einzelnen Basenpaaren (Murken 2006). Die Genome zweier nicht verwandter Menschen unterscheiden sich durchschnittlich alle 1000 Basenpaare (Murken 2006). Bis heute wurden mehr als 10 Millionen SNPs kartiert, etwa 60 000 davon liegen im kodierenden Bereich (Murken 2006). Während früher vorwiegend Mikrosatelliten für genomweite Kopplungsanalysen benutzt wurden, geht man heute zunehmend auf SNPs über (Murken 2006). Bei einer Assoziationsstudie werden die genetischen Merkmale, in diesem Fall die SNPs einer Patientengruppe, mit jenen einer Kontrollgruppe verglichen. Ziel dabei ist es Polymorphismen zu finden, welche mit der Krankheit assoziiert sind. Auch wenn ein statistischer Zusammenhang gefunden wird, muss der SNP selbst nicht die Ursache für die erhöhte Erkrankungswahrscheinlichkeit sein. Es ist auch möglich, dass dieser in einem Kopplungsungleichgewicht mit einer anderen, risikoerhöhenden genetischen Variante ist. Durch diese Tatsache reicht es aus, einige hunderttausend SNPs zu überprüfen, um eine Aussage darüber treffen zu können, welche Bereiche des Genoms bei Veränderungen zu einer Erhöhung des Erkrankungsrisikos führen (Hinds et al. 2005). Eine genomweite Assoziationsstudie wird in mehreren Phasen durchgeführt. In Phase 1 werden mehrere 100 000 SNPs bei einigen hundert DNS-Proben typisiert, anschließend wird eine geringere Zahl (etwa 10 000) vielversprechendster SNPs ausgewählt und in Phase 2 mit weiteren tausend DNS-Proben bestimmt. Es können auch noch eine 3. und 4. Phase durchgeführt werden, in welchen nur noch wenige SNPs weiter untersucht werden (Ahmed et al. 2009). In den letzten Jahren wurden weltweit mehrere

dieser Studien bezüglich des Mammakarzinoms durchgeführt (Easton et al. 2007; Hunter et al. 2007; Gold et al. 2008; Thomas et al. 2009; Ahmed et al. 2009). Eine Auswahl der SNPs, welche im Rahmen dieser Studien auffällig waren, findet sich in Tabelle 1.2. Für Varianten in manchen Genen, z.B. *FGFR2* und *TOX3/TNRC9*, gilt eine Risikoerhöhung für das Mammakarzinom als erwiesen (Meindl 2010). Für weitere Genorte, wie *LSP1*, *MAP3K1* und 2q35 gilt ein solcher Effekt als wahrscheinlich. Die Risikoerhöhung bei Vorliegen einer heterozygoten Variante liegt bei 1-3%, bei Homozygotie bei 2-6% (Meindl 2010). Verschiedene dieser folgenden Varianten sind mit unterschiedlichen klinischen Tumorentitäten assoziiert. So sind z.B. *FGFR2* und *TOX3* mit Östrogen-Rezeptor-positivem, oder *ATM*, ein moderat penetrantes Gen, mit Östrogen-Rezeptor-negativem Brustkrebs assoziiert (Tapper et al. 2008).

SNP	Lokus/Gen	Publikation
rs2981582	<i>FGFR2</i> (Intron2)	(Easton et al. 2007)
rs1219648	<i>FGFR2</i> (Intron2)	(Hunter et al. 2007)
rs2420946	<i>FGFR2</i> (Intron2)	(Hunter et al. 2007)
rs12443621	<i>TNRC9</i> (LD-Block)	(Easton et al. 2007)
rs8051542	<i>TNRC9</i> (LD-Block)	(Easton et al. 2007)
rs889312	<i>MAP3K1</i> (LD-Block)	(Easton et al. 2007)
rs3817198	<i>LSP1</i> (Intron10)	(Easton et al. 2007)
rs13281615	8q	(Easton et al. 2007)
rs7696175	<i>TLR1/TLR6</i>	(Hunter et al. 2007)
rs17157903	<i>RELN</i>	(Hunter et al. 2007)
rs10510126	10q	(Hunter et al. 2007)
rs12505080	4p	(Hunter et al. 2007)
rs2180341	6q22.33	(Gold et al. 2008)
rs11249433	1p11.2	(Thomas et al. 2009)
rs999737	<i>RAD51L1</i>	(Thomas et al. 2009)
rs4973768	3q24	(Ahmed et al. 2009)
rs56504950	17q23.2	(Ahmed et al. 2009)
rs13387042	2q35	(Stacey et al. 2007)
rs3803662	16q12	(Stacey et al. 2007)
rs1045484	<i>CASP8</i>	(Cox et al. 2007)

Tabelle 1.2: Bisher identifizierte Niedrigrisikovarianten mit dem Gen, bzw. Genort in welchem sie liegen.

1.5.1 *FGFR2*

Das Gen *FGFR2* (*Fibroblast growth factor receptor 2*) liegt auf Chromosom 10q26.13 und kodiert für ein Protein, welches als membranständiger Rezeptor für den Fibroblasten-Wachstumsfaktor eine Funktion in der Zellteilung, dem Zellwachstum, der Blutgefäßbildung und der Wundheilung hat (US National Library of Medicine, National Institutes of Health 2010). Der Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 spielt eine Rolle in der Entstehung verschiedener menschlicher Tumoren (Byron et al. 2010). Genetische Varianten im Gen für diesen Rezeptor, vor allem in Intron 2, sind eine der zurzeit am besten validierten Niedrigrisikovarianten für das Mammakarzinom.

1.5.2 *TNRC9/TOX3*

Das Gen *TNRC9/TOX3* (*TOX high mobility group box family member 3*) liegt auf Chromosom 16q12.1. Die Struktur des kodierten Proteins lässt vermuten, dass dieses eine Funktion bei der Änderung der Chromatinstruktur hat (University of California Santa Cruz).

1.5.3 *LSP1*

Das Gen *LSP1* (*Lymphocyte-specific protein 1*) liegt auf Chromosom 11p15.5. Beim kodierten Protein handelt es sich um ein intrazelluläres F-Actin bindendes Protein, welches in Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Endothelzellen exprimiert wird. Wahrscheinlich reguliert es die Neutrophilenmotilität, die Adhäsion an Matrixproteinen und die transendotheliale Migration (University of California Santa Cruz).

1.5.4 *MAP3K1*

Das Gen für die *MAP3K1* (*Mitogen-activated protein kinase kinase kinase*) liegt auf Chromosom 5q11.2. Das kodierte Protein ist eine Serin/Threonin-Kinase, welche in einem intrazellulärem, Signalweg zur Weiterleitung von Wachstumssignalen beteiligt ist (University of California Santa Cruz).

1.5.5 2q35

Der mit erhöhtem Brustkrebsrisiko assoziierte SNP rs13387042 liegt auf Chromosom 2q35 in keinem bekannten Gen (University of California Santa Cruz). Die nächstgelegenen Gene liegen alle mindestens 1 kb vom SNP entfernt (University of California Santa Cruz).

1.6 Studien des Deutschen Konsortiums für Familiären Brust- und Eierstockkrebs (GC-HBOC)

Die ehemals zwölf, nun 15 Zentren des Deutschen Konsortiums für Familiären Brust- und Eierstockkrebs führen gemeinsam Studien zur Entdeckung neuer Risikovarianten für Brustkrebs durch. Dabei arbeiten sie international mit anderen Konsortien z.B. dem „Breast cancer association consortium (BCAC)“ und dem “Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2 (CIMBA)” zusammen (Breast Cancer Association Consortium; Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2).

1.6.1 Chip1

Es wurden 438 Proben von Frauen aus Hochrisikofamilien ausgewählt und auf einem Affymetrix® 5 kb Chip analysiert.

1.6.2 Chip2

Eine Auswahl von 688 Proben von Frauen aus Hochrisikofamilien wurde mit Hilfe eines Affymetrix® 5 kb Chips analysiert. Die kompletten Ergebnisse der zweiten Untersuchung wurden, ebenso wie die des ersten Chips, bis jetzt nur partiell veröffentlicht (Hemminki et al. 2009; Ghossaini et al. 2012)

1.6.3 Validierung neuer Kandidaten SNPs

Ziel dieser Validierung war es 105 SNPs, welche in den vorangegangenen Assoziationsstudien als mögliche Niedrigrisikovarianten identifiziert worden waren, im Kollektiv des Deutschen Konsortiums für familiären Brust- und Eierstockkrebs zu validieren. Es wurden in Zusammenarbeit mit dem Helmholtzzentrum SNPs in den bekannten Genorten *FGFR2*, *TOX3*, *LSP1*, *MAP3K1*, 2q35 und 6q22.33 typisiert, außerdem wurden weitere 99 vielversprechende SNPs aus der Assoziationsstudie des

„Cancer Genetic Markers of Susceptibility Project“ (CGEMS) ausgewählt (Easton et al. 2007). Neben der Bestätigung von bereits bekannten SNPs konnte eine neue Niedrigrisikovariante, der SNP rs2271439 in Intron 2 des Gens *LSP1* gefunden werden (Hemminki et al. 2009).

1.7 Fragestellungen

Mit der vorliegenden Arbeit soll an die bisherige Forschung des Deutschen Konsortiums für familiären Brust- und Eierstockkrebs angeknüpft werden. In Zusammenarbeit mit den anderen beteiligten Zentren und Instituten sollte eine zweite Validierung mit weiteren Proben durchgeführt werden, mit dem Ziel neue Risikovarianten für das Mammakarzinom zu finden. Die neu entdeckte Risikovariante rs2271439 im Gen *LSP1* sollte in weiteren Proben typisiert werden, mit dem Ziel die so erhaltenen Werte mit den bereits bekannten zu verrechnen und somit genauere, statistisch signifikante Ergebnisse zu erzielen. Zusätzlich wurden aus dem Kollektiv des GC-HBOC sechs Proben ausgewählt, von denen zwei homozygot für die eine, zwei für die andere und zwei heterozygot für die Variante rs2271439 im Gen *LSP1* waren. Mit diesen Proben sollte eine Sequenzierung der Exons und der flankierenden intronischen Sequenzen durchgeführt werden, außerdem sollte der aus einer Assoziationsstudie bekannte SNP rs3817198 sequenziert werden. Dies hatte zum Ziel eventuell vorhandene weitere genetische Veränderungen oder Varianten zu finden und dies in Zusammenhang mit den Genotypen in den bekannten Risiko-SNPs zu bringen. Außerdem werden SNPs bzw. Proben aus dem Kollektiv des GC-HBOC für „High-throughput“ Projekte von BCAC ausgewählt. Im Rahmen des BCAC sollen mit einer großen Zahl von Proben aus den unterschiedlichen teilnehmenden Zentren neue Niedrigrisikovarianten gefunden werden.

2 Material und Methoden

2.1 Art der Studie

Es handelt sich um eine Fortführung der Fall-Kontroll-Studien des Deutschen Konsortiums für Familiären Brust- und Eierstockkrebs (GC-HBOC), welche das Ziel verfolgten neue genetische Niedrigrisikovarianten für das familiäre Mammakarzinom zu erkennen (Hemminki et al. 2009). Bei den Studienteilnehmerinnen handelte es sich um Frauen aus den ausgewählten Zentren des GC-HBOC, wobei jeweils nur ein Fall pro Familie in die Studie eingeschlossen wurde. Als Kontrollpopulation wurden die Studienpopulationen KORA (Kooperative Gesundheitsforschung in der Region Augsburg) S3 und S4 herangezogen. Es handelt sich dabei um 25- bis 74-jährige Populationskontrollen, welche in den Jahren 1994/95 (S3) und 1999/2001 (S4) in der Region von Augsburg gesammelt wurden (Wichmann).

2.1.1 Aufklärung und Einverständnis

Die Studienteilnehmerinnen wurden über die Studien des GC-HBOC aufgeklärt und gaben ihr Einverständnis für die Aufnahme ins Forschungsprojekt.

2.2 Studienkriterien

An der Studie nahmen erkrankte Frauen teil, welche aus Familien stammten, in denen mehrere (≥ 2) Fälle von Brustkrebs aufgetreten waren, jedoch keine Mutation in den Genen *BRCA1* und *BRCA2* gefunden wurde. Die Einteilung in Hochrisikofamilien (Gruppe A und B) und in Familien mit moderatem Risiko (Gruppe C, D und G) aus den vorangegangenen Studien wurde beibehalten (Hemminki et al. 2009; Engert et al. 2008). Für die Validierung, welche in Punkt 2.5.3 beschrieben wird wurden, im Gegensatz zu den anderen Untersuchungen, auch Proben aus Familien mit gehäuftem Auftreten von Eierstockkrebs (Gruppe E und F) sowie mit bilateralem Brustkrebs (Gruppe I), herangezogen.

Gruppe	Kriterien
A	Drei oder mehr Fälle, davon zwei von dem 50. Lebensjahr
B	Drei oder mehr Fälle, einer oder keiner vor dem 50. Lebensjahr
C	Zwei Fälle, beide vor dem 50. Lebensjahr
D	Zwei Fälle, einer vor dem 50. Lebensjahr
E	Zwei Fälle, davon eine Frau mit Mamma- und Ovarialkarzinom
F	Zwei Fälle von Ovarialkarzinomen
G	Ein Mammakarzinom vor dem 36. Lebensjahr
I	Bilaterales Mammakarzinom vor dem 41. Lebensjahr

Tabelle 2.1: Kriterien für die Einteilung der Fälle in die Risikogruppen A bis I.

2.3 Chemikalien

In der folgenden Tabelle findet sich eine Aufstellung der Zusammensetzung einiger wichtiger Chemikalien. Die Anwendung dieser und weitere verwendete Materialien werden im Rahmen der einzelnen Analysemethoden beschrieben.

TE	1 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan-HCl, 10 mM EDTA
TBE	89 mM Tris-Borsäure, 2 mM EDTA
SE	44 g Natrium und 125 g EDTA pro Liter H ₂ O
Auftragspuffer	2 g Ficoll® PM400, 10 ml TE, 1 µl OrangeG, 1 µl NaBromphenolblau, 1 µl Xylencyanol
Agarosegel 1,5%	1,5 g Agarose, 100 ml TBE, 0,2 µl Ethidiumbromid

Tabelle 2.2: Verwendete Chemikalien.

2.4 Analysemethoden

2.4.1 Extraktion genomischer DNS

Den Studienteilnehmerinnen wurden vom behandelnden Arzt 5 ml venöses Blut in EDTA-Röhrchen entnommen.

Die DNS wurde von den zuständigen Technischen Assistenten des jeweiligen Instituts extrahiert und in TE gelöst. Eine Beschreibung der Methode der DNS-Extraktion, wie sie im Labor der Gynäkologischen Tumorgenetik am Klinikum rechts der Isar durchgeführt wurde, findet sich im Anhang.

2.4.2 Konzentrationsbestimmung der DNS

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels Spektrophotometrie. Dabei wurde die optische Dichte der Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Die

Nukleinsäurekonzentration wurde aus der optischen Dichte bei 260 nm und einem für DNS, RNS beziehungsweise Oligonukleotiden spezifischen Multiplikationsfaktor berechnet (Mülhardt 2009). Die Messung wurde mit Hilfe des Nanodrop® ND1000 Spektrophotometers und mittels der zugehörigen NanoDrop® 1000 Operating Software version 3.1.2 durchgeführt.

2.4.3 Sequenzanalyse

2.4.3.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Durch die PCR ist es möglich, DNS in vitro zu amplifizieren. Dazu werden Primer benötigt, dies sind kurze RNS-Fragmente, welche komplementär zu den flankierenden Bereichen des zu amplifizierenden DNS-Abschnitts sind. Diese werden zusammen mit Desoxynukleotiden (dNTP), welche alle vier in der DNS vorkommenden Basen enthalten, Puffer und Polymerase in ein Reaktionsgefäß gegeben. Im Thermocycler, einem eigens dafür konzipierten Gerät, wird das Gemisch erhitzt, damit sich die normalerweise in Doppelsträngen vorkommende DNS zu Einzelsträngen aufspaltet (Denaturierung). Anschließend wird die Temperatur gesenkt, damit die Primer binden (Annealing). Danach kann die Polymerase das Produkt vervollständigen. Dieser Zyklus wird etwa 35 Mal wiederholt.

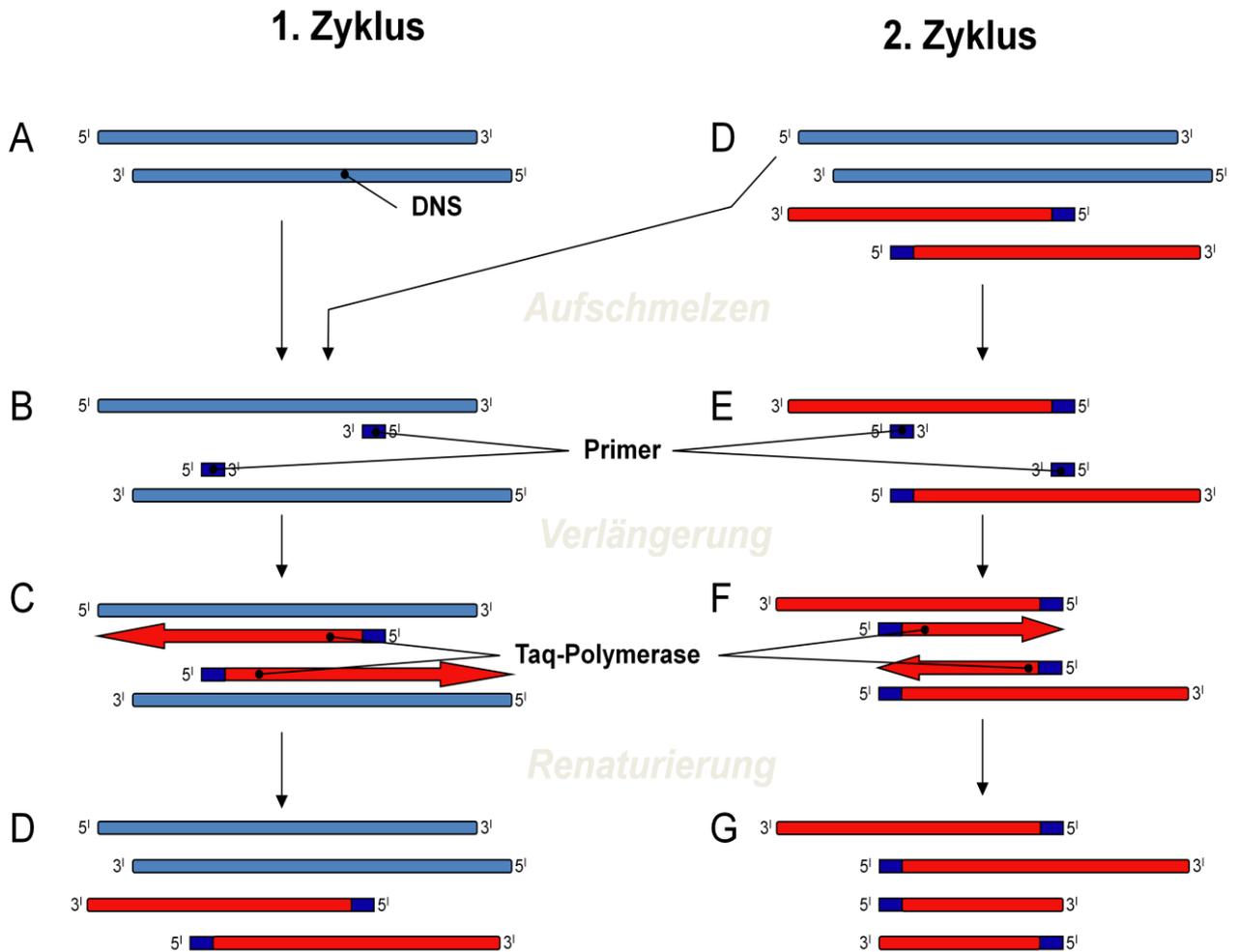


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Prinzips der Polymerasekettenreaktion

2.4.3.1.1 Primer design

Die Sequenz des zu amplifizierenden Abschnitts wurde der USCS Genome Browser (University of California Santa Cruz) entnommen. Eine geeignete Primersequenz wurde ausgewählt und die Oligonukleotide wurden bei der Metabion® International AG bestellt.

Name	Sequenz	Tm	Kommentar
Isoform1-Exon1-F	5'-TCCTCTCCTTTGTAGCAAC-3'	58°C	
Isoform1-Exon1-R	5'-ACCCGTGGACACGGCACAGG-3'	67°C	
Isoform2.1-Exon1-F	5'-CAGCAGGACAGGAGCCTTTG-3'	63°C	
Isoform2.1-Exon1-R	5'-TCGCTGCCACGCTTGGGGC-3'	69°C	
Isoform2.1-Exon2-F	5'-GAGCTAAGTGGGGTCTGAGG-3'	63°C	
Isoform2.1-Exon2-R	5'-TCTCCTCCCAGGTCCACAGG-3'	67°C	
Isoform2.2-Exon1-F	5'-TCCAGGCCTGAGATCCTGAG-3'	63°C	
Isoform2.2-Exon1-R	5'-AGGGCTTCTCTCCACAAGC-3'	63°C	
Isoform2.3-Exon1-F	5'-AGGGACTGGTTGCGTGTCCC-3'	65°C	
Isoform2.3-Exon1-R	5'-TCAGAGCAGGGTCCAGAACC-3'	63°C	
Isoform1-Exon2-F	5'-TCGGCTGTGGCGTGACTGTC-3'	65°C	
Isoform1-Exon2-R	5'-ATAGGGGCTAGAGCCCAGGC-3'	65°C	
Isoform1-Exon3-F	5'-TCTGACCACAGGAGACACAG-3'	60°C	
Isoform1-Exon3-R	5'-CAGAGGGAGCCCTGCTCTGC-3'	67°C	
Isoform1-Exon4-F	5'-AAAGGAAGGGGTCAACCAAG-3'	58°C	
Isoform1-Exon4-R	5'-AGTGGTGACAGACAGCCAAGG-3'	63°C	
Isoform1-Exon5-F	5'-ACAGAGAACCTGGGGCTCAG-3'	63°C	
Isoform1-Exon5-R	5'-TCCCCAGCTACTCCAACCAC-3'	63°C	
Isoform1-Exon6/7-F	5'-ATATAAGGGTTGGGGTTGG-3'	58°C	
Isoform1-Exon6/7-R	5'-TTGGATGAAGGAATGGTGCC-3'	58°C	
Isoform1-Exon8-F-spezifisch	5'-TGAACCAATACGGCTCTATC-3'	56°C	Verwendung: PCR
Isoform1-Exon8-R-spezifisch	5'-TCCCTCTTTGCCCTCCCCTG-3'	65°C	Verwendung: PCR
Isoform1-Exon8-F	5'-AAGCAGACGGTTGCCAGTG-3'	63°C	Verwendung: Sequenzierung
Isoform1-Exon8-R	5'-TAACAAGGAAACCCGGCCTG-3'	60°C	Verwendung: Sequenzierung
Isoform1-Exon9/10-F	5'-TGGCCAGGTAAGGCAAGGCG-3'	65°C	
Isoform1-Exon9/10-R	5'-TTGCCAAGTTCCAGCACAG-3'	60°C	
Isoform1-Exon11-F	5'-TGTGGGCTTGACAGGAGGAG-3'	65°C	
Isoform1-Exon11-R	5'-AGCCCTGCCCTTAGTGAG-3'	65°C	
rs3817198-F	5'-AAGGGTGGACTCCGAGTTGG-3'	63°C	
rs3817198-R	5'-TTCCTCACGAGCCCTGCTG-3'	65°C	
Tm=Schmelztemperatur			

Tabelle 2.3: Liste der für die PCR und Sequenzierung der Exons des Gens *LSP1* verwendeten Primer, ihre Sequenz sowie ihre Schmelztemperatur.

2.4.3.1.2 Verwendete Materialien

Die Polymerasekettenreaktion wurde in Thermocyclern der Marke Bio-Rad® MJ Research DNA Engine PTC-200 durchgeführt, die Reagenzien befanden sich in 150 µl Eppendorf® Reaktionsgefäßen. Das Polymeraseset Amplitaq-GOLD®, bestehend aus Polymerase und Puffer, sowie die Desoxyribonukleotide von GE® Healthcare IllustratM dNTP Polymerisation Mix wurden verwendet.

2.4.3.1.3 Reaktionsansatz

Die Mischverhältnisse der Reagenzien sind aus Tabelle 2.4 zu entnehmen, die Volumenangaben beziehen sich auf je eine Probe. Zusätzlich wurde bei jedem Thermocycling eine Negativkontrolle, also ein Reaktionsansatz ohne DNS, durchgeführt (Rassow 2006).

H ₂ O	39 µl
Puffer	5 µl
dNTP	4 µl
Primer F	1 µl
Primer R	1 µl
Polymerase	0,1 µl
DNS	2 µl

Tabelle 2.4: Reaktionsansatz zur Durchführung einer PCR.

2.4.3.1.4 Thermocycling

Das für die Polymerase Amplitaq-GOLD® geeignete Programm (siehe Tabelle 2.5) wurde mit den für die Primer spezifischen Annealingtemperaturen (siehe Schmelztemperaturen in Tabelle 2.3) verwendet.

Arbeitsschritt	Dauer	Temperatur	Zyklen
Anfangsdenaturierung	10 min	95°C	1
Cycle Denaturierung	30 s	95°C	32
Annealing	30 s	Primerspezifisch	
Vervollständigung	45 s	72°C	
Abschlussvervollständigung	10 min	72°C	1

Tabelle 2.5: Ablauf des Thermocyclings.

2.4.3.1.5 Erfolgskontrolle

Zur Kontrolle des Erfolgs der PCR wurden 3 µl des PCR-Produkts zusammen mit 7 µl Auftragspuffer auf ein Agarosegel aufgetragen und eine Elektrophorese durchgeführt. Anschließend wurde die Gelplatte unter einer UV-Lampe UV-Solo Biometra® bei einer Wellenlänge von 240/280 nm und einer Belichtungszeit von 0,8 s betrachtet. Bei Erfolg konnte das PCR-Produkt als Bande erkannt werden.

2.4.3.1.6 Reinigung des PCP-Produkts

Die verbleibenden 47 µl des PCR-Produkts wurden zusammen mit 100 µl H₂O in eine Platte MSNU® 030 PCR gefüllt. Die Platte, in welcher sich ein Filter befand, wurde auf eine dafür vorgesehene Millipore® Vakuumpumpe gestellt. Die kleinen DNS-Fragmente, z.B. die Primer, werden entfernt, während die größeren PCP-Produkte im Filter hängen bleiben. Diese wurden anschließend mit 30 µl H₂O aus dem Filter gelöst und in ein neues Eppendorf® Reaktionsgefäß gefüllt.

2.4.3.2 Kettenabbruch

Für die Sequenzanalyse wurde die Kettenabbruchmethode nach Sanger verwendet. Dabei wurde ein Sequenzierset, welches neben den Desoxynukleotiden auch fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide (ddNTP) und eine Polymerase enthält, zusammen mit dem PCR-Produkt des zu sequenzierenden Abschnitts und einem passenden Primer in ein Reaktionsgefäß gefüllt und ein Thermocycling durchgeführt. Da die Didesoxynukleotide am dritten Kohlenstoffatom der Ribose keine Alkoholgruppe besitzen, führt der Einbau eines solchen zum Abbruch der DNS-Synthese (Rassow 2006).

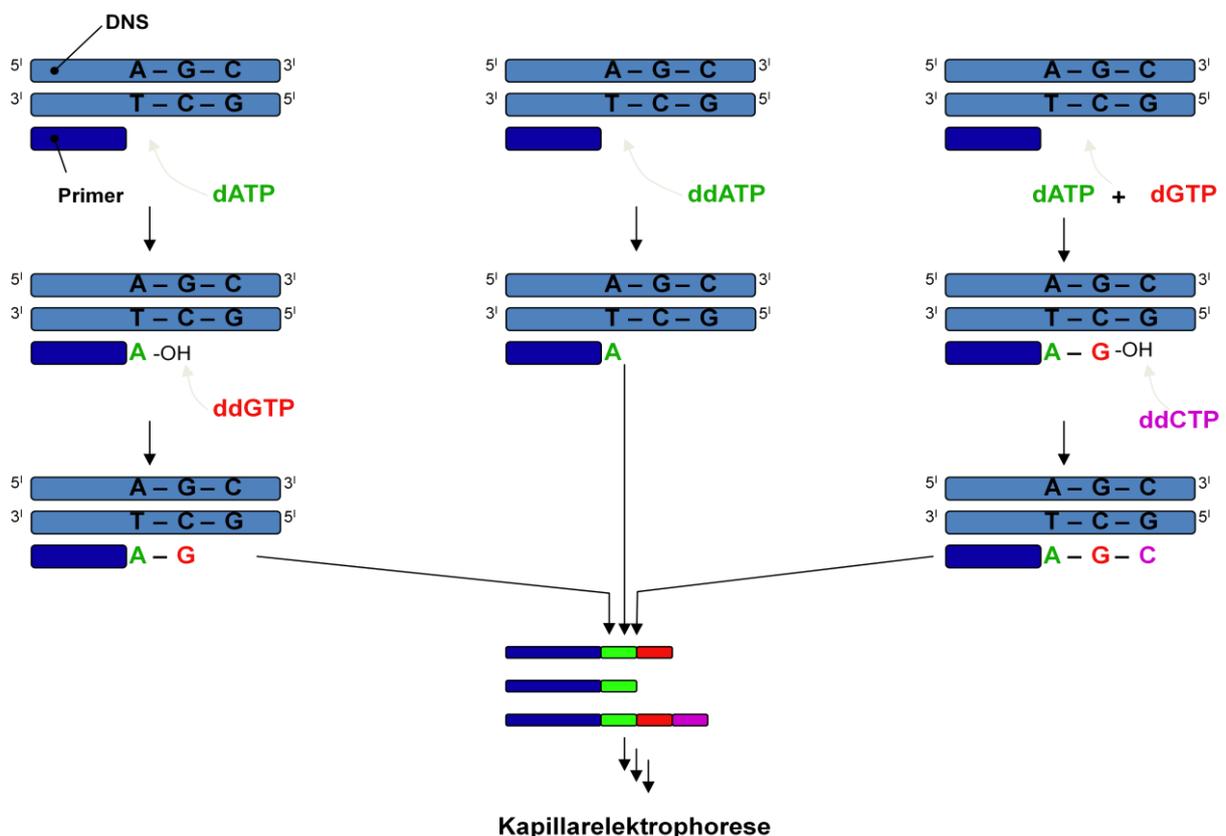


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Sequenzierung durch die Methode des Kettenabbruchs nach Sanger.

2.4.3.2.1 Verwendete Materialien

Das Sequenzierkit BigDye® Terminator v1.1 wurde verwendet.

2.4.3.2.2 Reaktionsansatz

Der Ansatz wurde so wie vom Hersteller des Kits empfohlen hergestellt. Die angegebenen Volumina beziehen sich auf eine Probe.

PCR-Produkt	8 µl
BigDye®	1,8 µl
Primer	0,4 µl

Tabelle 2.6: Reaktionsansatz für die Sequenzierung mit Hilfe der Kettenabbruchmethode nach Sanger.

2.4.3.2.3 Programm

Das vom Hersteller des Sets empfohlene Programm wurde in den Thermocycler eingegeben.

Arbeitsschritt	Dauer	Temperatur	Zyklen
Denaturierung	30 s	95°C	27
Annealing	30 s	52°C	
Vervollständigung	1 min	60°C	

Tabelle 2.7: Ablauf des Thermocyclings bei der Sequenzierung nach Sanger.

2.4.3.3 Fällung der DNS mit Ethanol

Das sich in einem Eppendorff® Reaktionsgefäß befindende Produkt der Kettenabbruch-PCR wurde mit 30 µl Ethanol 100Vol% versetzt. Nach 15 min Reaktionszeit wurde das Gemisch in einer Zentrifuge des Modells Hareaus® Biofuge zentrifugiert (13 000 U/min, 15 min). Anschließend wurde der Überstand abpipettiert und es wurden 100 µl Ethanol 70% zugesetzt. Nach weiteren 10 min Zentrifugation wurde der Überstand erneut abpipettiert und das offene Eppendorff® Reaktionsgefäß wurde einige Stunden stehen gelassen, damit das restliche Ethanol verdampfen konnte. Anschließend wurde die sich im Reaktionsgefäß befindliche DNS in 30 µl Aqua destillata gelöst.

2.4.3.4 Kapillarelektrophorese

Die Sequenz wurde in einem Sequenzierautomaten Applied® Biosystems 3100 durchgeführt. Es wurden 1 µl der Probe und 24 µl H₂O in eine Mikrotiterplatte pipettiert.

Falls die Sequenz zu schwach war, wurde ein neuer Lauf mit erhöhter Probenkonzentration durchgeführt. Im Sequenzierautomaten findet eine Kapillarelektrophorese statt. Die beim Kettenabbruch entstandenen Fragmente werden der Größe nach aufgetrennt. Ein Detektor erfasst die Fluoreszenz der Didesoxynukleotide. Die Auswertung erfolgte durch die Programme Sequence Analysis Alias® und Sequence navigator®.

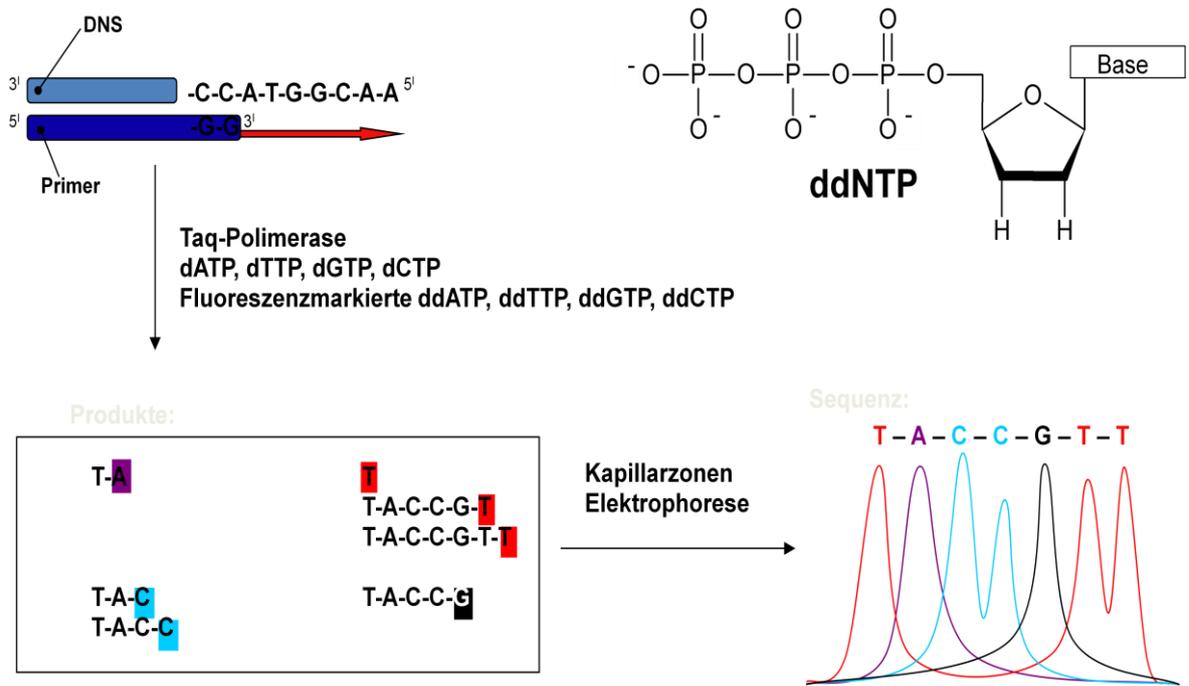


Abbildung 2.3: Prinzip der Sequenzermittlung durch die Kapillarelektrophorese von fluoreszenzmarkierten DNS-Bruchstücken.

2.4.4 MALDI-TOF®-Massenspektrometrie

Mit Hilfe der MALDI-TOF®-Massenspektrometrie (matrix assisted laser desorption/ionisation time of flight mass spectrometry) konnten in kurzer Zeit viele SNPs analysiert werden. Am Institut für Humangenetik im Helmholtzzentrum wurden die Proben in Mikrotiterplatten pipettiert, wobei auch Positiv- und Negativkontrollen zugegeben wurden. Nachdem eine PCR durchgeführt wurde, wurde ein Enzym („Shrimp Alkaline Phosphatase“) zur Inaktivierung der nicht eingebauten Nukleotide hinzugefügt. Anschließend wurde ein Extensionsprimer hinzugefügt, welcher direkt neben dem zu untersuchenden SNP bindet. Danach wurde ein Gemisch von Nukleotiden hinzugefügt, welches drei verschiedene Didesoxynukleotide und ein Desoxynukleotid enthielt. So wurden allelspezifisch unterschiedlich lange DNS-Fragmente gebildet. Nachdem die DNS

gereinigt wurde, konnte die eigentliche MALDI-TOF®-Massenspektrometrie durchgeführt werden. Die Probe wurde bei der matrixunterstützten Laser-Desorption/Ionisation (MALDI Technik) mit einem 100- bis 1000-fachen Überschuss an Matrix versetzt und anschließend im Hochvakuum des Massenspektrometers für einige Nanosekunden einem Laserpuls ausgesetzt. Die so erzeugten Molekülonen, welche in die Gasphase übertreten, wurden in einem elektrischen Feld beschleunigt und abhängig von ihrer Masse und Ladung getrennt. Die DNS-Fragmente werden beim Auftreffen auf einen Detektor erkannt. Da es bei diesem Verfahren die Flugzeit ist, welche registriert wird, nennt man es „Time-of-Flight -Analysator (TOF-Analysator)“. Durch eine Software konnte anhand der Flugzeit der Genotyp ermittelt werden (Illig). Die MALDI-TOF®-Massenspektrometrie wurde mit Hilfe eines Sequenom® Geräts durchgeführt (Autoflex HT and SpectroTYPER RT 3.4 analysis software). Die Proben wurden mit Hilfe des Assay Design® 3.1.2.2, mittels iPLEX® Gold Standards, zusammengestellt. Die Qualitätskontrolle erfolgte mittels Call rate <97%, MAF (mutation analysis facility) <4% und $p < 0.001$ für die Abweichung von den HWE (hardy weinberg equilibrium) in den Kontrollen.

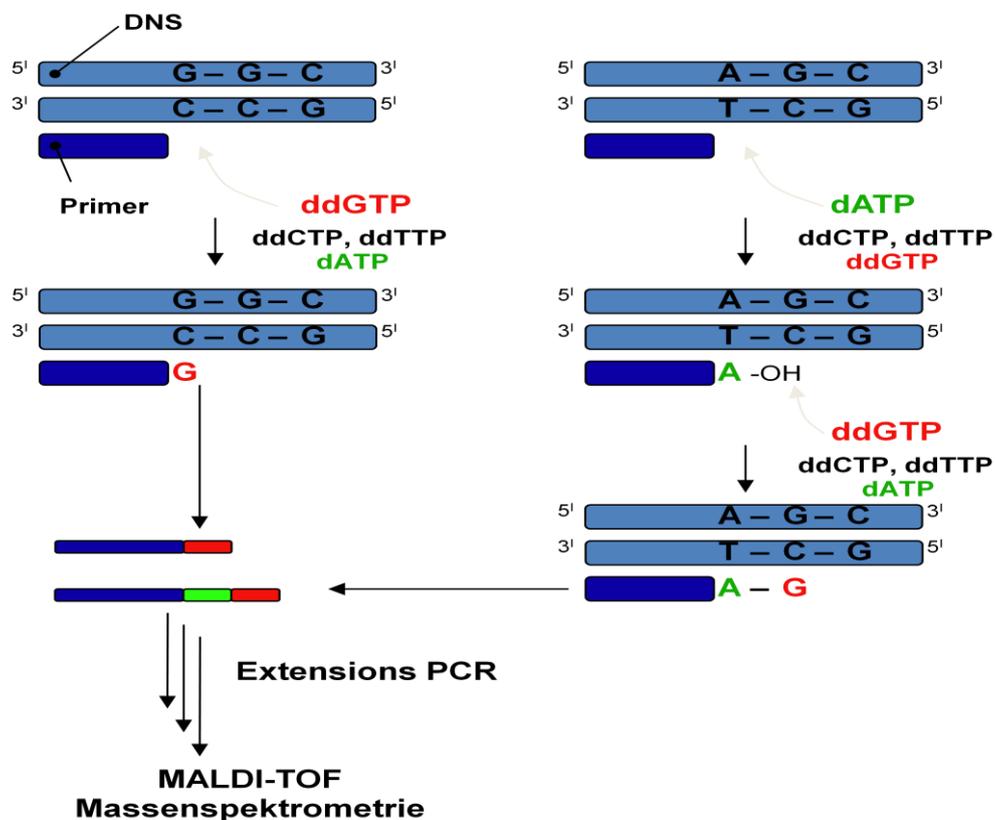


Abbildung 2.4: Prinzip der Herstellung von allelspezifisch unterschiedlich langen Fragmenten.

2.5 Teile der Studie

2.5.1 *LSP1*-Genotypisierung

Es wurden 368 Proben aus dem Studienkollektiv des GC-HBOC ausgewählt, die nicht in der ersten Validierung analysiert worden waren. Die Proben wurden in TE auf eine DNS-Konzentration von 50 ng/µl verdünnt. Je 1µl dieser Grundlösung wurde zusammen mit 150 µl 1/10 TE in eine Mikrotiterplatte pipettiert und an das Institut für Humangenetik im Helmholtzzentrum geschickt, wo die Typisierung des SNP rs2271439 mittels MALDI-TOF®-Massenspektrometrie durchgeführt wurde. Eine Liste der Proben und der Position, an welcher sie sich in den Platten befanden, findet sich im Anhang. Die Tabelle 2.8 zeigt eine Übersicht über die Anzahl, Risikogruppenzugehörigkeit und Herkunft der Proben.

Zentrum/Risikogruppe	Risikogruppe A	Risikogruppe B	Unbekannt	Summe
Düsseldorf	27	21	0	48
Kiel	10	17	1	28
Köln	32	31	30	93
Leipzig	0	0	14	14
München	82	64	39	185
Summe	151	133	84	368

Tabelle 2.8: Anzahl, Risikogruppe und Herkunft der Proben für die *LSP1*-Genotypisierung.

2.5.2 *LSP1*-Metaanalyse

Die Ergebnisse der Genotypisierung wurden mit Daten aus vorangegangenen Studien des GC-HBOC verrechnet. Bei einer dieser Studien handelte es sich um die erste Validierung von 625 Proben der Risikogruppen A und B sowie weiteren 637 Proben anderer Risikogruppen mittels MALDI-TOF® (Hemminki et al. 2009). Auch die Ergebnisse des ersten Affymetrix® 5 kb Chips, mit welchem 422 Proben typisiert wurden, flossen in die Metaanalyse mit ein. Außerdem wurden die Daten, welche in Düsseldorf mittels einer Replikation ermittelt wurden, in die Studie aufgenommen. Diese 1646 Proben stammten im Gegensatz zu allen anderen Proben der Studien nicht von Patientinnen aus Risikofamilien, sondern von Frauen, welche an einem sporadischen Brustkrebs erkrankt waren. Zusätzlich zu diesen in Deutschland durchgeführten Studien wurden auch die von Yeager et. al. und Hunter et. al. bereits publizierten Daten des US National Cancer Institute funded Cancer Genetic Markers of Susceptibility (CGEMS) (Yeager et al. 2007; Hunter et

al. 2007) zur Metaanalyse herangezogen. Insgesamt wurden 3694 Fälle aus dem GC-HBOC, wovon 1415 den Hochrisikogruppen A und B angehörten, sowie 1145 Fälle aus dem CGEMS mit 2467 Kontrollen aus dem GC-HBOC und 1142 Kontrollen aus dem CGEMS verglichen. Insgesamt handelte es sich also um 4839 Fälle und 3609 Kontrollen. Anzahl der Fälle in den einzelnen Studien, die Methode mit welcher der Genotyp ermittelt wurde, eventuell bereits vorhandene Publikationen dieser Studien und, falls bekannt, die Risikogruppenzugehörigkeit sind aus der folgenden Tabelle 2.9 zu entnehmen.

	Anzahl	Methode	Publikation	Gruppe A und B
GC-HBOC				
Fälle				
Validierung Gruppe A und B	625	MALDI-TOF®	(Hemminki et al. 2009)	625
Validierung Nicht-A/B	637	MALDI-TOF®	(Hemminki et al. 2009)	0
Replikation aus Düsseldorf	1646	MALDI-TOF®		0
Chip 1	422	Affymetrix®		422
LSP1 Genotypisierung	368	MALDI-TOF®		368
Summe Fälle GC-HBOC	3694			1415
Kontrollen				
Replikation	1647	MALDI-TOF®	(Hemminki et al. 2009)	
Chip 1	822	Affymetrix®		
Summe Kontrollen GC-HBOC	2469			
CGEMS				
Fälle	1145	Perlegen®	(Yeager et al. 2007), (Hunter et al. 2007)	
Kontrollen	1142	Perlegen®	(Yeager et al. 2007), (Hunter et al. 2007)	

Tabelle 2.9: Übersicht über die Proben für die LSP1-Metaanalyse.

2.5.3 Erweiterte Validierung

Analog zur vom GC-HBOC durchgeführten Validierung (Hemminki et al. 2009) wurde eine zweite Versuchsreihe gestartet. Dazu wurden 1501 geeignete DNS-Proben ausgewählt, welche in der ersten Validierung nicht analysiert worden waren. Die DNS wurde ebenso wie bei der Genotypisierung verdünnt, auf Mikrotiterplatten aufgetragen und an das Institut für Humangenetik im Helmholtzzentrum gesandt, wo die Genotypisierung mittels MALDI-TOF®-Massenspektrometrie durchgeführt wurde. Die folgende Tabelle zeigt eine

Übersicht über die Herkunft und Risikogruppenzugehörigkeiten der Proben. Eine Liste der sich in den Platten befindenden Proben findet sich im Anhang.

Zentrum/Risikokategorie	A	B	C	D	E	F	G	Unbekannt	Summe
Dresden	5	5	15	48	31	0	10	0	114
Düsseldorf	19	25	34	40	60	0	0	0	178
Hannover	15	19	19	30	8	2	6	70	169
Leipzig	16	11	14	22	22	4	5	0	94
Münster	7	10	13	40	16	1	9	0	96
Ulm	13	4	15	58	40	2	0	0	132
Kiel	3	2	2	5	0	0	1	0	13
Würzburg	7	14	6	14	6	1	4	0	52
Köln	81	40	72	14	0	30	0	0	237
München	47	29	74	86	95	0	53	0	384
Berlin	5	3	0	0	0	0	0	0	8
Heidelberg	0	0	0	0	24	0	0	0	24
Summe	218	162	264	357	302	40	88	70	1501

Tabelle 2.10: Herkunft und Risikokategorie der Proben für die zweite Validierung.

2.5.4 Sequenzanalyse *LSP1*

Sechs Proben, deren Genotyp im SNP rs2271439 aus den vorangegangenen Studien des GC-HBOC bekannt war, wurden ausgewählt. Die Exons des Gens *LSP1* und die flankierenden Intronbereiche (etwa 50 bp 3' und 5') wurden mittels oben angeführten Methoden sequenziert. Zusätzlich wurde der aus der genomweiten Assoziationsstudie von CGEMS bekannte SNP rs3817198 typisiert.

Probennummer	18444	19023	18730	19091	20522	21101
rs2271439	cc	cc	ca	ca	aa	aa

Tabelle 2.11: Probennummer der Proben für die Sequenzierung der Exons des Gens *LSP1* und ihr Genotyp im SNP rs2271439.

2.6 Statistische Methoden

2.6.1 *LSP1*

Die Daten aus der Sequenzierung des Gens *LSP1* wurden aufgrund der kleinen Probenanzahl keiner statistischen Berechnung zugeführt.

Die durch die MALDI-TOF® erhaltenen Daten wurden an Prof. Bertram Müller-Myhsok von der Arbeitsgruppe „Statistische Genetik“ am MPI für Psychiatrie übermittelt, wo die statistische Auswertung erfolgte.

Die Daten aus der Genotypisierung wurden nicht eigens berechnet, sondern flossen in die Metaanalyse ein. Es wurden Berechnungen für die Assoziation der Varianten mit dem Risiko nach den Modellen der Allelfrequenz, einem homozygoten Modell, einem heterozygoten Modell, der Test der „Allel positivity“ und der „Armitage trend test“ durchgeführt. (Sasieni 1997). Das Konfidenzintervall betrug 95%, der Chi-Quadrat-Test wurde für alle Berechnungen durchgeführt. Außerdem wurden Tests für die Abweichung vom Hardy-Weinberg-Equilibrium durchgeführt.

2.6.1.1 Allelfrequenz

Da jeder Mensch für autosomale Gene zwei Allele besitzt, werden beim Test für die Allelfrequenz die beiden Allele miteinander verglichen. Somit ist die Testgröße in diesem Test doppelt so groß, wie die Anzahl der Probandinnen welche an der Studie teilgenommen haben.

2.6.1.2 Heterozygoten Modell

Bei diesem Test wird der Genotyp der Individuen miteinander verglichen, so werden beim Test für die Heterozygoten die Homozygoten jedes Allels mit den Heterozygoten verglichen. Es wird also der Genotyp der Individuen miteinander verglichen, so werden beim Test für die Heterozygoten, die Homozygoten jedes Allels mit den Heterozygoten verglichen.

2.6.1.3 Homozygoten Modell

Beim Test für die Homozygoten werden die Homozygoten beider Allele bezüglich ihres Risikos miteinander verglichen.

2.6.1.4 Allel positivity

Beim „Allel positivity test“ werden die Homozygoten eines Allels mit der Summe der Homozygoten des anderen und der Heterozygoten verglichen.

2.6.1.5 Armitages Trend test

Dieser ist dem Test der Allelfrequenz ähnlich geht von einem linearen Anstieg des Risikos aus.

2.6.1.6 Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Durch das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht kann die erwartete Genotypenhäufigkeit in Abhängigkeit von der Allelhäufigkeit berechnet werden. Damit dies anwendbar ist, müssen einige Voraussetzungen erfüllt sein, nämlich die Panmixie, eine ausreichende Bevölkerungsgröße und die Abwesenheit von Mutation und Selektion. Für die Versuchspopulationen trifft dies meist zu, deswegen muss, falls die gemessene Verteilung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht abweicht, an einen Fehler, wie zum Beispiel eine Fehltypisierung im Labor, gedacht werden (Ganten und Bader 2003).

2.6.2 Validierung

Die statistische Berechnung der Ergebnisse der Validierung wurde am Institut für Humangenetik im Helmholtzzentrum durchgeführt. Die statistischen Assoziationen wurden mit PLINK (V1.03)® und WGPIMER (<http://www.mpipsykl.mpg.de/wg-permer/>) durchgeführt. Die Bonferroni-Korrektur für multiples Testen wurde angewandt. Die Daten wurden nach dem genotypischen, dem Trend-Test, einem allelischen, einem dominanten und einem rezessiven Modell berechnet.

2.6.3 BCAC und COGS

Im internationalen Konsortium BCAC (Breast Cancer Association Consortium) arbeiten verschiedene Forschergruppen zusammen, um durch die Kombination ihrer Daten neue Risikovarianten zu finden (Breast Cancer Association Consortium).

Innerhalb von BCAC wurde ein „High-throughput-Projekt“ durchgeführt. Dazu wurden 800 SNPs, welche im Rahmen unserer genomweiten Assoziationsstudie auffällig waren, ausgewählt (Breast Cancer Association Consortium). Eine weitere Kooperative, welche die Erkennung neuer Niedrigrisikovarianten zum Ziel hat, ist die COGS (Collaborative Oncological Gene-environment Study) (Collaborative oncological Gene-environment study). Durch diese internationale Kooperative erhofft man sich, durch die etwa 200 000 eingeschlossenen Personen, die benötigten hohen Fallzahlen zu erreichen (Collaborative oncological Gene-environment study).

3 Ergebnisse

3.1 Validierungen eines zweiten Risikoallels im *LSP1*-Gen

3.1.1 Das Gen *LSP1*

3.1.1.1 Das Gen

Das Gen *LSP1* (*Lymphocyte specific protein 1*) liegt auf Chromosom 11p15.5. Durch alternatives Spleißen kommt es zu verschiedenen Isoformen. Das Gen enthält elf Exons, wovon zehn kodierend sind. Eine Darstellung des Gens und der beiden mit Brustkrebs assoziierten SNPs findet sich in folgender Grafik (University of California Santa Cruz).

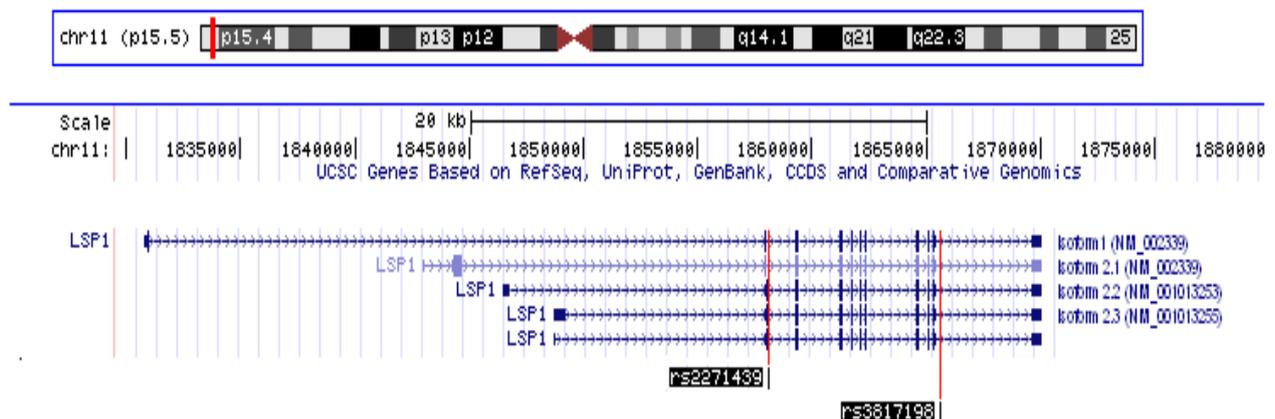


Abbildung 3.1: Darstellung des Gens *LSP1* sowie der beiden SNPs rs2271439 und rs3817198.

3.1.1.2 Der SNP rs2271439

Der Einzelbasenpolymorphismus rs2271439 befindet sich an der Position chr11:1901467-1901467 in Intron 2 des Gens *LSP1*. Er liegt an Position 13 stromabwärts des letzten kodierenden Nukleotids des Exon 2, dies entspricht der Position c.191+13 innerhalb des Gens (University of California Santa Cruz). Ausgehend vom Positivstrang der DNS finden sich an dieser Stelle des Genoms zwei Varianten, nämlich Cystein (C) oder Adenin (A). Für die europäische Bevölkerung sind Werte von 14,2% für die Häufigkeit von Allel A und von 85,8% für das Allel C angegeben (National Center for Biotechnology Information 2010). Das häufigere Allel C wurde in einer vorangegangenen Studie des GC-HBOC als Risikoallel identifiziert (Hemminki et al. 2009).

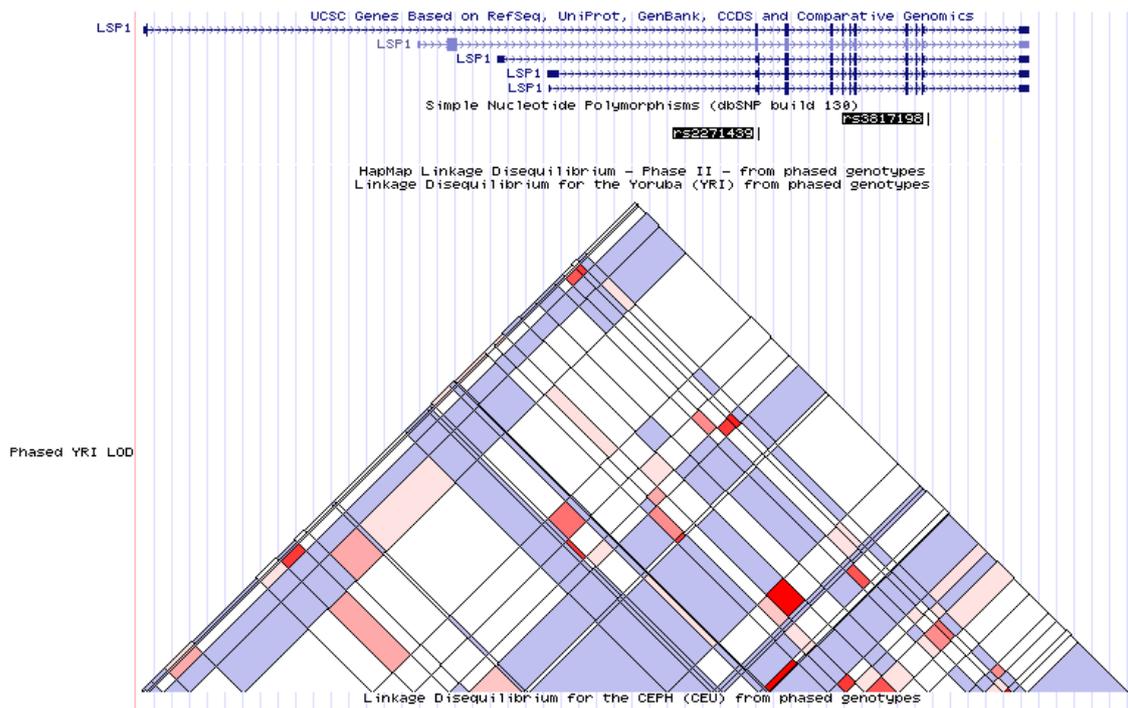


Abbildung 3.3: LD-Blocks im Bereich des untersuchten Gens *LSP1*.

3.1.2 Validierung des SNPs rs2271439

Die MALDI-TOF®-Analyse für die Validierung von rs2271439 lieferte für 364 der 368 Proben brauchbare Ergebnisse. Dies entspricht einer Erfolgsquote von 98,91%. Die Anzahl der Proben und die Häufigkeit der einzelnen Genotypen in diesen sind in der folgenden Tabelle 3.1 dargestellt.

Gesamtzahl	Homozygot C	Heterozygot	Homozygot A
364	249	106	9

Tabelle 3.1: Absolute Genotypenhäufigkeit im SNP rs2271439.

Die Genotypenhäufigkeit in der untersuchten Gruppe ist in Abbildung 3.4 dargestellt. So waren 68,40% der Proben homozygot für das Allel C, 29,10% waren heterozygot und 2,50% waren homozygot für das Allel A.



Abbildung 3.4: Relative Genotypenhäufigkeit im SNP rs2271439.

Diese Genotypenverteilung entspricht einer Allelhäufigkeit von 83,0% für das Allel C und von 17,0% für das Allel A (siehe Abbildung 3.5).

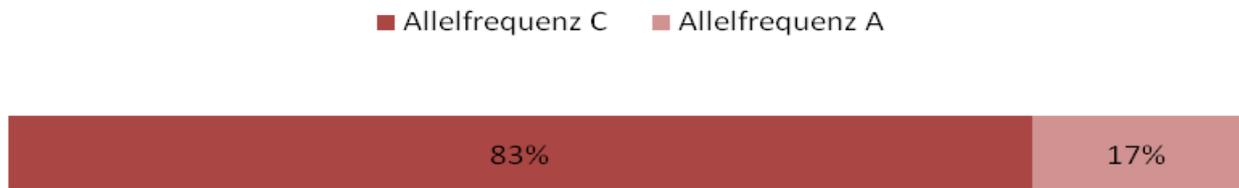


Abbildung 3.5: Allelfrequenzen im SNP rs2271439.

3.1.3 Metaanalyse *LSP1*

3.1.3.1 Ermittelte Genotypen und Allelhäufigkeiten

Neben den Ergebnissen der Validierung des Polymorphismus rs2271439 wurden Ergebnisse vorangegangener Studien des GC-HBOC zu einer Metaanalyse herangezogen. Die Tabelle 3.2 zeigt die Häufigkeiten der einzelnen Genotypen in rs2271439 in den verschiedenen Studien.

	Gesamtzahl	Homozygot C	Heterozygot	Homozygot A	Publikation
GC-HBOC					
Fälle					
Validierung A und B	625	450	161	14	(Hemminki et al. 2009)
Validierung Nicht-A/B	637	424	194	19	(Hemminki et al. 2009)
Replikation Düsseldorf	1646	1098	505	43	
Chip 1	422	302	110	10	
<i>LSP1</i> Genotypisierung	364	249	106	9	
Summe Fälle GC-HBOC	3694	2523	1076	95	
Davon A und B	1411	1001	377	33	
Kontrollen					
Replikation	1647	1072	507	68	(Hemminki et al. 2009)
Chip 1	822	584	216	22	
Kontrollen GC-HBOC	2469	1656	723	90	

Tabelle 3.2: Häufigkeiten der einzelnen Genotypen in rs2271439 in den verschiedenen Studien.

3.1.3.1.1 GC-HBOC

Die Genotypenhäufigkeiten im untersuchten Polymorphismus, in Fällen und Kontrollen, welche sich bei Summation aller Daten des Deutschen Konsortiums für familiären Brust- und Eierstockkrebs ergeben, sind im folgenden Diagramm dargestellt. Außerdem ist auch die Genotypenhäufigkeit in Fällen, welche aus den Hochrisikokategorien A und B stammen, abgebildet. Unter den Kontrollen des GC-HBOC waren 67,10% der Proben homozygot für das Allel C, 29,20% heterozygot und 3,60% homozygot für das Allel A. Bei den Fällen lag die Anzahl der Homozygoten für das Allel C bei 68,30%, die Anzahl der Heterozygoten bei 29,10% und die Zahl der Homozygoten für das Allel A bei 2,60%. Betrachtet man nur jene Personen, welche aus einer Hochrisikofamilie der Gruppe A oder B stammen, so ergab sich eine Homozygotenhäufigkeit für das Allel C von 71,00%, eine Heterozygotenhäufigkeit von 26,70% und eine Homozygotenhäufigkeit für das Allel A von 2,30%.

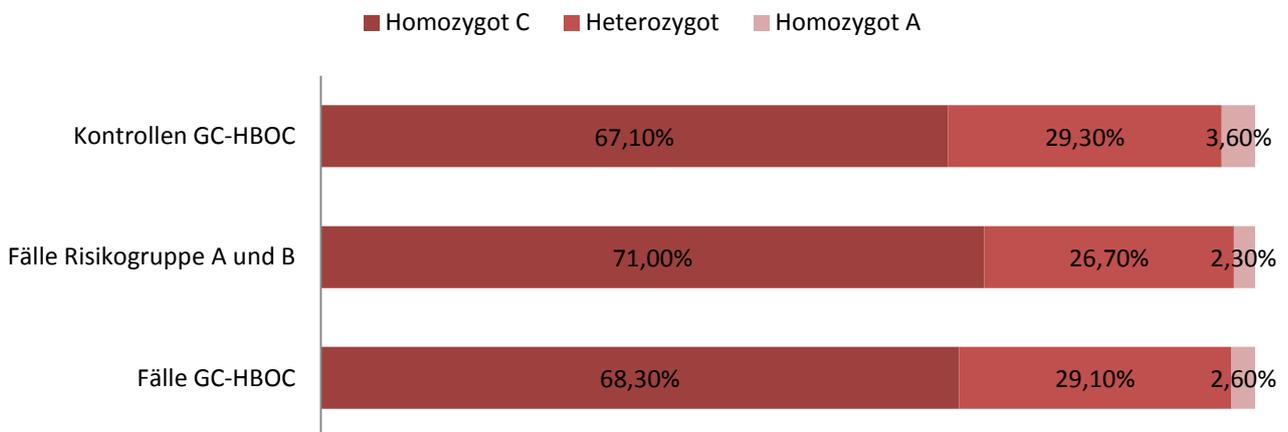


Abbildung 3.6: Relative Genotypenhäufigkeiten für die untersuchte Risikovariante in der Metaanalyse.

Die sich aus diesen Genotypenhäufigkeiten ergebenden Allelfrequenzen für die Allele C und A werden in der folgenden Tabelle dargestellt. Bei den Kontrollen betrug die Allelfrequenz des Allels C 81,70% und jene des Allels A 18,30%. Für die Fälle ergaben sich Allelfrequenzen von 82,90% für das Allel C und von 17,10% für das Allel A. Bei alleiniger Betrachtung der Fälle aus den Hochrisikofamilien zeigte sich eine Allelfrequenz für das Allel C von 84,30% und eine Allelfrequenz von 15,70% für das Allel A.

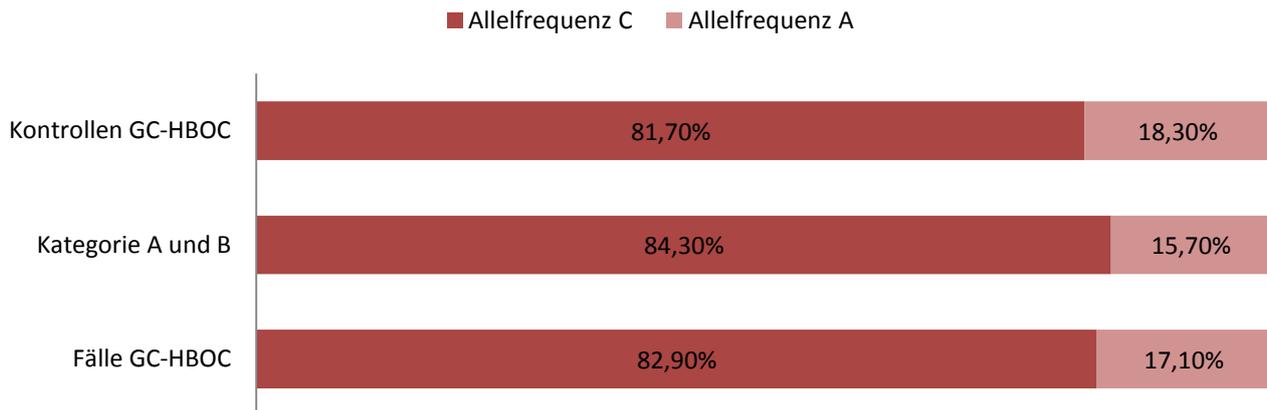


Abbildung 3.7: Allelfrequenzen für die untersuchte Risikovariante in der Metaanalyse.

3.1.4 Statistische Berechnungen

3.1.4.1 GC-HBOC

3.1.4.1.1 Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Die folgende Tabelle 3.3 zeigt die Werte, welche sich aus der Berechnung für die Abweichung der erhaltenen Daten vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ergaben. Es konnte keine signifikante Abweichung vom Gleichgewicht festgestellt werden, dies spricht gegen einen Typisierungsfehler.

	Kontrollen	Fälle
Anzahl CC	1656 (1648,56)	2523 (2536,47)
Anzahl CA	723 (737,87)	1076 (2536,47)
Anzahl AA	90 (82,56)	95 (108,47)
f_a1	0,82 +/- 0,006	0,83 +/- 0,004
F	F= 0,02015	F= 0,02568
Pearson	p= 0,316632	p= 0,118566
Llr	p= 0,320832	p= 0,113533
Exact	p= 0,312677	p= 0,131747

Tabelle 3.3: Statistische Tests zur Berechnung der Abweichung vom Hardy-Weinberg-Equilibrium für die Gesamtheit der Fälle des GC-HBOC.

3.1.4.1.2 Tests für die Assoziation

Die folgende Tabelle 3.4 enthält die Ergebnisse der Berechnung der Assoziation der Varianten mit dem Risiko an Brustkrebs zu erkranken. Die statistisch signifikanten p-Werte

sind fett hervorgehoben. Grundlage hierfür ist die Verteilung der Häufigkeiten der zwei Varianten am Genort des SNP rs2271439 in den Fällen und Kontrollen des GC-HBOC.

Test	Allelfrequenz	Heterozygot	Homozygot	Allel positivity	Armitage
	Risikoallel A				
	[C] ↔ [A]	[CC] ↔ [CA]	[CC] ↔ [AA]	[CC] ↔ [CA+AA]	common OR
Odds Ratio	OR = 0,924	OR = 0,977	OR = 0,693	OR = 0,945	OR = 0,905
95%-KI	[0,841-1,015]	[0,873-1,015]	[0,516-0,930]	[0,848-1,054]	
χ^2	2,7	0,17	6,01	1,02	2,72
p-Wert	p= 0,10013	p= 0,68373	p= 0,01424	p= 0,31186	p= 0,09902
	Risikoallel C				
	[A] ↔ [C]	[AA] ↔ [CA]	[AA] ↔ [CC]	[CC+CA] ↔ [AA]	common OR
Odds Ratio	OR = 1,082	OR = 1,410	OR = 1,434	OR = 1,433	OR = 1,111
95%-KI	[0,985-1,189]	[1,041-1,910]	[1,075-1,938]	[1,069-1,921]	
χ^2	2,7	4,96	6,01	5,86	2,72
p-Wert	p= 0,10013	p= 0,02589	p= 0,01424	p= 0,01552	p= 0,09902

Tabelle 3.4: Statistische Berechnung der Assoziation des Risikoallels C im SNP rs2271439 mit dem Brustkrebsrisiko für alle Fälle des GC-HBOC.

3.1.4.1.2.1 Allelfrequenz

Beim Vergleich der Allelfrequenzen der beiden Allele A und C zwischen den Fällen und Kontrollen konnte kein statistisch signifikantes Ergebnis erzielt werden. Die errechnete Odds Ratio betrug 1,082 [0,985-1,189] bei Betrachtung des Allels C als Risikovariante, der p-Wert betrug 0,10013.

3.1.4.1.2.2 Heterozygotes Modell

Der Vergleich der Homozygoten jedes Allels mit dem heterozygoten Genotyp erbrachte beim Vergleich des Genotyps CC mit den Heterozygoten kein signifikantes Ergebnis. Bei Betrachtung des Allels A als Risikoallel betrug die Odds Ratio 0,977 [0,873-1,093] und der p-Wert 0,68373. Der Vergleich des Genotyps A mit den Heterozygoten wurde, unter Betrachtung des Allels C als Risikoallel, ein signifikantes Ergebnis, mit einem p-Wert von 0,02589 erzielt. Die Odds Ratio lag bei 1,140 [1,041 – 1,910]. Dies entspricht einer Risikoerhöhung um 14% für Trägerinnen des Genotyps CA im Vergleich zu den Homozygoten des Allels A.

3.1.4.1.2.3 Homozygotes Modell

Beim Vergleich der Homozygoten des einen mit den Homozygoten des anderen Allels kam es zu einem statistisch signifikanten Ergebnis. Eine Odds Ratio von 0,693 [0,516 – 0,930] für das Allel A beziehungsweise von 1,443 [1,075 – 1,938] für das als Risikoallel bekannte Allel C wurde berechnet. Der p-Wert betrug 0,01424. Dies entspricht einer Erhöhung des Brustkrebsrisikos um 44% für Trägerinnen des Genotyps CC im Vergleich zu Trägerinnen des Genotyps AA.

3.1.4.1.2.4 Allel positivity

Die Berechnung des Risikounterschieds zwischen Trägerinnen der homozygoten Variante mit der Summe der Trägerinnen der heterozygoten Variante und den Homozygoten des anderen Allels brachte für beide Allele kein signifikantes Ergebnis. Beim Vergleich der Trägerinnen des Genotyps CC mit allen anderen ergab sich eine Odds Ratio von 0,945 [0,848-1,054] bei einem p-Wert von 0,31186. Für den Vergleich der Trägerinnen des Genotyps AA mit dem Rest ergab sich eine Odds Ratio von 1,433 [1,069-1,921] bei einem p-Wert von 0,01552.

3.1.4.1.2.5 Armitage's trend test

Die durch den „Armitage's trend test“ ermittelte Odds Ratio betrug 0,905 für das Allel A, beziehungsweise 1,111 für das Allel C als Risikoallel und war mit einem p-Wert von 0,09902 nicht signifikant.

3.1.4.2 Hochrisikofamilien der Gruppen A und B

3.1.4.2.1 Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Die folgende Tabelle 3.5 zeigt die Ergebnisse der Berechnungen zur Abweichung der erhaltenen Ergebnisse von Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Es zeigt sich keine signifikante Abweichung vom Gleichgewicht, somit kann davon ausgegangen werden, dass keine Typisierungsfehler vorliegen.

	Kontrollen	Fälle
Anzahl CC	1656 (1648,56)	1001 (1002,77)
Anzahl CA	723 (737,87)	377 (373,46)
Anzahl AA	90 (82,56)	33 (34,77)
f_a1	0,82 +/- 0,006	0,84 +/- 0,007
F	F= 0,02015	F= -0,00949
Pearson	p= 0,316632	p= 0,721604
Llr	p= 0,320832	p= 0,720066
Exact	p= 0,312677	p= 0,840400

Tabelle 3.5: Statistische Tests zur Berechnung der Abweichung vom Hardy-Weinberg-Equilibrium für die Fälle der Hochrisikogruppen A und B.

3.1.4.2.2 Tests für die Assoziation

Die folgende Tabelle 3.6 zeigt die Ergebnisse der Assoziation der unterschiedlichen Varianten in rs2271439 mit dem Risiko an Brustkrebs zu erkranken. Die statistisch signifikanten p-Werte sind fett hervorgehoben. Bei diesen Berechnungen wurden nur Proben von Frauen miteinbezogen, welche aus einer Hochrisikofamilie der Kategorie A oder B stammten. Dabei zeigte sich eine stärkere Assoziation des SNPs als bei den gesamten Fällen. Diese Daten wurden mit den Kontrollen des GC-HBOC verglichen.

Test	Allelfrequenz	Heterozygot	Homozygot	Allel positivity	Armitage
Risikoallel A					
	[C] ↔ [A]	[CC] ↔ [CA]	[CC] ↔ [AA]	[CC] ↔ [CA+AA]	common OR
Odds Ratio	OR = 0,832	OR = 0,863	OR = 0,607	OR = 0,834	OR = 0,823
95%-KI	[0,735-0,942]	[0,745-0,999]	[0,404-0,911]	[0,724-0,962]	
χ^2	8,39	3,88	5,92	6,23	8,3
p-Wert	p= 0,00377	p= 0,04901	p= 0,01498	p= 0,01254	p= 0,00396
Risikoallel C					
	[A] ↔ [C]	[AA] ↔ [CA]	[AA] ↔ [CC]	[CC+CA] ↔ [AA]	common OR
Odds Ratio	OR = 1,202	OR = 1,422	OR = 1,649	OR = 1,580	OR = 1,221
95%-KI	[1,061-1,361]	[0,936-2,160]	[1,098-2,475]	[1,054-2,367]	
χ^2	8,39	2,02	5,92	4,99	8,3
p-Wert	p= 0,00377	p= 0,09723	p= 0,01498	p= 0,02546	p= 0,00396

Tabelle 3.6: Statistische Berechnung der Assoziation des Risikoallels C im SNP rs2271439 mit dem Brustkrebsrisiko für die Fälle der Hochrisikogruppen A und B.

3.1.4.2.3 Allelfrequenzen

Der Vergleich der Allelfrequenzen ergab für das Risikoallel C eine Odds Ratio von 1,202 [1,061-1,361] beziehungsweise von 0,832 [0,735-0,942] für das Allel A bei einem p-Wert von 0,00377. Dieser p-Wert entspricht einer Irrtumswahrscheinlichkeit von unter einem Prozent, somit ist das Ergebnis sehr signifikant.

3.1.4.2.4 Heterozygoten Modell

Für den Vergleich der Homozygoten des Allels C mit den Heterozygoten ergab sich eine Risikoverminderung für die Heterozygoten. Die Odds Ratio betrug 0,863 [0,745-0,999] bei einem p-Wert von 0,04901. Der Vergleich der Homozygoten des Allels A mit den Heterozygoten erbrachte als einziges Berechnungsmodell bei den Hochrisikofamilien kein signifikantes Ergebnis. Die ermittelte Odds Ratio lag bei 1,422 [0,877-2,252] bei einem p-Wert von 0,09723.

3.1.4.2.5 Homozygoten Modell

Beim Vergleich der Homozygoten des einen mit den Homozygoten des anderen Allels zeigte sich eine Odds Ratio von 1,649 [1,098-2,475] für das Allel C. Dies entspricht einer Risikoerhöhung um etwa 65%. Der p-Wert lag bei 0,01489.

3.1.4.2.6 Allel positivity

Die Berechnung der Allelpositivität zeigte für den Vergleich der Homozygoten des Allels C mit den Heterozygoten und den Homozygoten des Allels A eine Risikoverminderung für die Träger eines oder zweier Allele A mit einer Odds Ratio von 0,843 [0,724-0,962] bei einem signifikanten p-Wert von 0,01498. Der Vergleich der Träger mindestens eines Allels C mit den Homozygoten für A zeigte eine signifikante Risikoerhöhung mit einer Odds Ratio von 1,580 [1,054-2,367] und einem p-Wert von 0,02546. Dies entspricht einer Risikoerhöhung um 58%.

3.1.4.2.7 Armitage's trend test

Für die durch den Armitage's trend test ermittelte Common Odds Ratio ergab sich eine mit einem p-Wert von 0,00396 sehr signifikante Risikoerhöhung für das Allel C bei einer Odds Ratio von 1,221. Die entsprechende Odds Ratio für das Allel A beträgt 0,823.

3.2 Validierungen weiterer Kandidaten SNPs

Die folgende Tabelle 3.7 zeigt die validierten SNPs, den Genort, an welchem sich der Polymorphismus befindet, und die p-Werte für die verschiedenen Tests. Die statistisch signifikanten p-Werte sind fett hervorgehoben.

SNP	Genort	Allel 1	Allel 2	Test	p-Wert	Publikation
rs10483813	<i>Rad51L1</i>	A	T	Geno	0,01458	(Thomas et al. 2009)
				Trend	0,003698	
				Allelisch	0,003855	
				Dominant	0,007764	
				Rezessiv	0,06334	
rs1078806	<i>FGFR2</i>	C	T	Geno	9,62E-05	
				Trend	3,30E-05	
				Allelisch	3,84E-05	
				Dominant	4,16E-05	
				Rezessiv	0,01037	
rs11249433	LOC647121	C	T	Geno	0,01308	(Thomas et al. 2009)
				Trend	0,1742	
				Allelisch	0,1714	
				Dominant	0,8648	
				Rezessiv	0,006667	
rs1175332	<i>TLE1</i>	T	G	Geno	0,01887	
				Trend	0,00932	
				Allelisch	0,09393	
				Dominant	0,004858	
				Rezessiv	0,3438	
rs1610374	Ohne Gen	C	T	Geno	0,1118	
				Trend	0,03697	
				Allelisch	0,03846	
				Dominant	0,03991	
				Rezessiv	0,3888	
rs2378556	<i>TLE1</i>	T	C	Geno	0,02178	
				Trend	0,01096	
				Allelisch	0,01122	
				Dominant	0,005682	

				Rezessiv	0,3647	
rs2394829	<i>CDH23</i>	G	A	Geno	0,08429	
				Trend	0,0262	
				Allelisch	0,02464	
				Dominant	0,03822	
				Rezessiv	0,1598	
rs2981582	<i>FGFR2</i>	T	C	Geno		(Easton et al. 2007)
				Trend	0,00597	
				Allelisch	0,007296	
				Dominant	0,001379	
				Rezessiv	0,3407	
rs400161	<i>TLE1</i>	G	A	Geno	0,01657	
				Trend	0,008664	
				Allelisch	0,008824	
				Dominant	0,004194	
				Rezessiv	0,3583	
rs11067165	<i>MMAB</i>	A	G	Geno	0,8711	
				Trend	0,6271	
				Allelisch	0,6251	
				Dominant	0,6997	
				Rezessiv	0,6514	
rs12005362	<i>KANK1</i>	T	C	Geno		
				Trend	0,4182	
				Allelisch	0,4189	
				Dominant		
				Rezessiv		
rs1339880	<i>ACTL7B</i>	G	C	Geno	0,4405	
				Trend	0,8214	
				Allelisch	0,82	
				Dominant	0,6465	
				Rezessiv	0,3317	
rs11765251	<i>SLC8A3</i>	G	A	Geno	0,7314	
				Trend	0,5391	
				Allelisch	0,541	
				Dominant	0,4666	
				Rezessiv	0,8975	
rs2731968	<i>EGFLAM</i>	C	T	Geno	0,7474	
				Trend	0,5857	
				Allelisch	0,5854	
				Dominant	0,6819	
				Rezessiv	0,475	
rs2747648	<i>ESR1</i>	C	T	Geno		
				Trend	0,6743	
				Allelisch	0,6755	

				Dominant	
				Rezessiv	
rs918854	<i>CCDC93</i>	A	T	Geno	0,4509
				Trend	0,2071
				Allelisch	0,197
				Dominant	0,2745
				Rezessiv	0,3293
rs9267673	<i>RDBP</i>	T	C	Geno	0,5707
				Trend	0,3049
				Allelisch	0,3068
				Dominant	0,3425
				Rezessiv	0,5223
rs9598797	<i>CLLU1</i>	G	A	Geno	0,8397
				Trend	0,8941
				Allelisch	0,8935
				Dominant	0,7407
				Rezessiv	0,709
rs9922599	<i>A2BP1</i>	T	C	Geno	0,171
				Trend	0,06532
				Allelisch	0,06475
				Dominant	0,1156
				Rezessiv	0,1491
rs999574	<i>ADAM7</i>	C	T	Geno	0,4253
				Trend	0,5025
				Allelisch	0,4969
				Dominant	0,6983
				Rezessiv	0,1923

Tabelle 3.7: Ergebnisse der zweiten Validierung: SNPs, Gene und Odds Ratio von unterschiedlichen Risikovarianten.

3.2.1 Beschreibung der Varianten

3.2.1.1 *RAD51L1*

Der Polymorphismus rs10483813 liegt im Intronbereich des Gens *RAD51L1* (*RAD51 like 1*) an der Position chr14:68101037. Die Varianten sind A und T, wobei T die häufigere ist. In diesem Gen ist bereits ein SNP, nämlich rs999737, als Risikovariante für Brustkrebs beschrieben (Thomas et al. 2009). Die beiden Polymorphismen liegen im selben Intron, der Abstand zwischen ihnen beträgt ungefähr 3,4 kb. Das kodierte Protein ist ein Mitglied der RAD51-Proteinfamilie. Diese Proteine spielen eine Rolle bei der DNS-Reparatur durch homologe Rekombination (National Center for Biotechnology Information 2010). In der Validierung zeigte sich für die meisten Berechnungsmodelle ein signifikanter Wert. So

ergab das genotypische Berechnungsmodell einen p-Wert von 0,01458, der Trend-Test einen p-Wert von 0,003698, das allelische Modell einen Wert von 0,003855 und das dominante Modell einen p-Wert von 0,007764. Nur im rezessiven Modell konnte keine signifikante Risikoerhöhung nachgewiesen werden, der p-Wert betrug 0,06334.

3.2.1.2 *FGFR2*

Polymorphismen in diesem Gen gelten als gesicherte Risikovarianten für Brustkrebs. Die SNPs rs2981582, rs1219648 und rs2420946, welche in Intron 2 des Gens liegen, sind bereits beschrieben worden (Easton et al. 2007; Hunter et al. 2007). In der Validierung wurden rs1078806 und rs2981582 untersucht. Für den SNP rs1078806, ebenfalls in Intron 2 gelegen, zeigte sich in der Validierung in allen Berechnungsmodellen mit Ausnahme des rezessiven Modells eine signifikante Risikoerhöhung. Der p-Wert für das genotypische Berechnungsmodell lag bei 9,62E-05, für den Trend-Test bei 3,30E-05, für das allelische Modell bei 3,84E-05, für das dominante Modell bei 4,16E-05 und für das rezessive bei 0,01037. Auch für den Polymorphismus rs2981582 zeigten sich in einigen Modellen signifikante Risikoerhöhungen. So lag der p-Wert im Trend-Test bei 0,00579, im allelischen Modell bei 0,007296 und im dominanten Modell bei 0,001379. Im rezessiven Modell konnte bei einem p-Wert von 0,3407 keine signifikante Risikoerhöhung gefunden werden.

3.2.1.3 Der SNP rs11249433

Der SNP rs11249433 liegt an Position chr1:120982136 im Intron 1 des Gens *LOC647121*. Es gibt die beiden Varianten C und T. Für diesen SNP ist bereits in einer genomweiten Assoziationsstudie ein Zusammenhang mit dem Brustkrebsrisiko beschrieben worden (Thomas et al. 2009). Dieser SNP wurde außerdem mit einer erhöhten Expression des in der Nähe liegenden Gens *NOTCH2* in Verbindung gebracht, wobei das Genprodukt bei Trägern der Risikoallele CT und CC stärker exprimiert wurde als in den Trägern des Allels TT (Fu et al. 2010). Außerdem konnten weitere Hinweise auf eine Assoziation dieses Polymorphismus mit östrogenrezeptorpositiven Mammakarzinomen gewonnen werden (Fu et al. 2010). Der NOTCH-Signalweg ist wichtig bei der Differenzierung von

Östrogenrezeptor tragenden Zellen der Brust (University of California Santa Cruz). In der Validierung konnte nur im Modell der Genotypen, bei einem p-Wert von 0,01308 und im rezessiven Berechnungsmodell, bei einem p-Wert von 0,006667 eine statistisch signifikante Risikoerhöhung ermittelt werden. Keine signifikanten Ergebnisse konnten im Trend-Test, bei einem p-Wert von 0,1742, im allelischen Modell, bei einem p-Wert von 0,1714 und im dominanten Modell, bei einem p-Wert von 0,8648 erzielt werden.

3.2.1.4 *TLE1*

Im Bereich des Gens *TLE1* (*Transducin like enhancer of split 1*) wurden die SNPs rs1175332, rs2378556 und rs400161 untersucht. Der SNP rs1175332 liegt in Position chr9:82825194. Die Varianten T und G sind bekannt. Alle Berechnungsmodelle mit Ausnahme des rezessiven Modells zeigten eine signifikante Risikoerhöhung. Der Polymorphismus rs2378556 liegt ebenfalls in der Nähe des Gens *TLE1* und es zeigte sich wiederum eine Risikoerhöhung in allen Berechnungsmodellen bis auf das rezessive. Im SNP rs1175332 sind die beiden Varianten G und A bekannt. Wie in den anderen Polymorphismen zeigt sich in diesem SNP eine Risikoerhöhung im Berechnungsmodell der Genotypen, dem Trend Test, dem allelischen und dem dominanten Modell, nur im rezessiven Modell konnte keine signifikante Risikoerhöhung ermittelt werden.

3.2.1.5 Der SNP rs1610374

Der Polymorphismus rs1610374 liegt auf Position chr9:82849844, die beiden Varianten C und T sind bekannt. Dieser SNP liegt in einem Bereich, in welchem sich kein bekanntes Gen befindet. Eine signifikante Risikoerhöhung konnte im Trend-Test, dem allelischen und dem dominanten Berechnungsmodell ermittelt werden.

3.2.1.6 *CDH23*

Der SNP rs2394829 liegt auf Position chr10:73015136, die Varianten G und A sind bekannt. Der Polymorphismus liegt in Intron 7 des Gens *CDH23* (*Cadherin like 23*). Dieses Gen ist Mitglied der Cadherin-Genfamilie, welche für Glycoproteine kodieren, die eine Rolle in der kalziumabhängigen Zell-Zell-Adhäsion spielen. Außerdem spielt das Protein eine Rolle in der Organisation von Stereozilien (University of California Santa Cruz). Für

den untersuchten SNP konnte im Trend-Test dem allelischen und dem dominanten Modell ein statistisch signifikantes Ergebnis erzielt werden.

3.3 Sequenzanalyse *LSP1*

Um zu klären, ob die SNP-Variante mit einer kodierenden Variante assoziiert ist, wurde das *LSP1*-Gen aus verschiedenen Patientinnen sequenziert. Der Genotyp stimmte in allen sechs Proben mit dem vorab Ermittelten überein. Auch der Genotyp dieser sechs Proben im aus den Studien des CGEMS bekannten SNP rs3817198 wurde ermittelt. Anschließend wurden alle Exons aller bekannten Isoformen des Gens bei diesen sechs Proben sequenziert. Die Genotypen der einzelnen Proben an den verschiedenen Genorten, die Position dieser Genorte in den Genen sowie ein eventuell erfolgter Aminosäureaustausch im kodierten Protein kann aus der folgenden Tabelle 3.8 entnommen werden. Die Benennung der Proben erfolgte mit den Nummern, unter welchen die DNS-Proben in München zu finden sind.

<i>LSP1</i>		18444	19023	18730	19091	20101	20522	
Isoform1 Exon1								
(NM_002339)	rs907612 (c.-154)	CT	CT	TT	CT	CT	CC	5'UTR
	rs2089909 (c.-109)	CC	CC	CC	CT	CT	TT	5'UTR
	rs907613 (c.-93)	GA	GA	GA	GA	GA	GG	5'UTR
	rs2089910 (c.30)	CC	CC	CC	CT	CT	TT	kein AS Austausch
Isofor2.1 Exon1								
(NM_002339)		wt	wt	wt	wt	wt	wt	
Isofor2.1 Exon2								
	rs7938342 (c.102)	AT	AT	AT	AT	AT	AT	A->T (Gln34Leu)
Isofor2.2 Exon1								
(NM_001013253)		wt	wt	wt	wt	wt	wt	
Isofor2.3 Exon1								
(NM_001013255)	rs4980389 (c.-191)	GG	GA	GA	AA	AA	AA	5'UTR
	c.-211	GG	GG	GT	GG	GG	GG	5'UTR
Isoform1 Exon2								
	rs2271439 (c.191+13)	cc	cc	ca	ca	aa	aa	
Isoform1 Exon3								
	rs621679 (c.298)	GG	GA	GA	AA	AA	AA	G->A (Ala100Thr)

Isoform1 Exon4								
		wt	wt	wt	wt	wt	wt	
Isoform1 Exon5								
	rs661348 (c.591+38)	aa	ag	ag	gg	gg	gg	
Isoform1 Exon6								
	rs56024612 (c.636-77)	cc	gg	cg	gg	gg	gg	
Isoform1 Exon7								
		wt	wt	wt	wt	wt	wt	
Isoform1 Exon8								
		wt	wt	wt	wt	wt	wt	
Isoform1 Exon9								
		wt	wt	wt	wt	wt	wt	
Isoform1 Exon10								
		wt	wt	wt	wt	wt	wt	
	rs3817198 (c.*13+200)	tt	tc	tt	tt	tt	tt	
Isoform1 Exon11								
		wt	wt	wt	wt	wt	wt	
wt = Wildtyp								

Tabelle 3.8: Ergebnisse der Sequenzierung der Exons des Gens *LSP1*.

3.3.1 Exon 1 der Isoform 1

Im Exon 1 der Isoform 1 konnten Varianten in vier bekannten SNPs gefunden werden. Die SNPs rs907612, rs2089909 und rs907613 liegen in der 5'-untranslatierten Region und rs2089910 liegt im kodierenden Bereich. Dieser SNP führt aber aufgrund des degenerierten genetischen Kodes zu keinem Aminosäureaustausch.

3.3.2 Exon 1 der Isoform 2.1

In diesem Exon wurde keine Abweichung von der im USCS Genome Browser angegebenen Referenzsequenz gefunden.

3.3.3 Exon 1 der Isoform 2.2

In keiner der untersuchten Proben war eine Abweichung von der Referenzsequenz zu eruieren.

3.3.4 Exon 2 der Isoform 2.1

In Exon 2 der Isoform 2.1 waren alle sechs Proben heterozygot in einem SNP, welcher dazu führt, dass an Position 34 des Proteins ein Leucin anstelle eines Glutamins eingebaut wird.

3.3.5 Exon 1 der Isoform 2.3

Im intronischen Bereich, welcher flussaufwärts des Exon 1 der Isoform 1.3 liegt, wurden Varianten in rs4980389 gefunden, außerdem wurde in einer der Proben ein Basenaustausch an der Position c.-211 gefunden, welche nicht als SNP registriert ist.

3.3.6 Exon 3 der Isoform 1

In Exon 3 der Isoform 1, welches auch für die anderen Isoformen in Exon ist, fanden sich Varianten in rs621679. Diese Variante führt zum Austausch eines Alanins durch ein Threonin an Position 100 des Peptids. Aufgrund der Nähe der Genorte und der ähnlichen Verteilung der verschiedenen Varianten in den Proben wurde vermutet, dass die Variante C im SNP rs2271439 häufig auf demselben Allel mit einem G in rs621679 liegt. Somit käme dieser Aminosäureaustausch für die Risikoerhöhung in Frage.

3.3.7 Exon 4 der Isoform 1

In keiner der untersuchten Proben wurde im Bereich des Exon 4 der Isoform 1 eine Abweichung von der Referenzsequenz gefunden.

3.3.8 Exon 5 der Isoform 1

Im flankierenden intronischen Bereich des Exons 5 fanden sich Varianten im Polymorphismus rs661348, welcher 38 Basen stromabwärts der letzten kodierenden Base des Exons liegt.

3.3.9 Exon 6 der Isoform 1

Der Polymorphismus rs56024612 liegt ebenso wie rs661348 im Intron 5 und zwar 77 Basen stromaufwärts des Beginns von Exon 6.

3.3.10 Exon 7, Exon 8 und Exon 9 der Isoform 1

In diesen Exons konnte bei keiner der Proben eine Abweichung von der Referenzsequenz eruiert werden.

3.3.11 Exon 10 der Isoform 1

In einer der Proben konnte eine heterozygote Variante im SNP rs3817198 gefunden werden.

3.3.12 Exon 11 der Isoform 1

Die Sequenzen aller untersuchten Proben stimmten mit der Referenzsequenz überein.

3.4 Auswahl von Kandidatengen-SNPs für „High-throughput“-Methoden innerhalb des BCAC

Eine weitere Validierung von, im Rahmen dieser Arbeit definierten, Varianten wird gegenwärtig im Rahmen eines neuartigen „High-throughput-Projekts“ innerhalb von BCAC (Breast Cancer Association Project) durchgeführt. Dazu gehören noch weitere ca. 800 SNPs, die am auffälligsten im Rahmen einer genomweiten Assoziationsstudie waren (Chip2). Dabei wurden insgesamt ca. 770 Indexpatientinnen aus deutschen Familien, in denen keine *BRCA1/2*-Mutation gefunden wurde, untersucht. Hintergrund dieser Auswahl ist, dass nach den Erfahrungen dieser Arbeit und inzwischen auch internationaler Arbeiten, einige SNPs erst dann als Niedrigrisikovarianten identifiziert werden können, wenn eine ausreichende Anzahl an Erkrankten und gesunden Kontrollen zur Verfügung steht. Für das erwähnte Projekt sind dies jeweils ca. 20.000 Personen.

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Methoden

Die Aufnahme der Patientinnen in die Studie und die Einteilung in Risikogruppen erfolgte vom GC-HBOC. Die Diagnose Mammakarzinom wurde vom jeweils behandelnden Arzt gestellt. Die Einteilung in die Risikogruppen erfolgte nach Anamnese und Beratung. Dabei ist zu beachten, dass die Familiengröße einen Einfluss auf die Einteilung haben könnte. So gibt es in kleinen Familien mit wenigen Geschwistern auch weniger Fälle, was eventuell zu einer falsch niedrigen Einstufung geführt haben könnte. Analog dazu ist auch in großen Familien das Risiko höher, dass mehrere Brustkrebsfälle auftraten. Fehler in der Gruppeneinteilung könnten auch durch unzureichende oder falsche Informationen bezüglich der Erkrankung von Angehörigen aufgetreten sein. Bei genetischen Studien muss immer auch die ethnische Herkunft der Teilnehmer berücksichtigt werden. Die Teilnehmerinnen aus der Studie stammten alle aus Deutschland, eine darüber hinausgehende Erfassung der ethnischen Herkunft erfolgte nicht. Als Vergleichspopulation wurden KORA-Kontrollen hinzugezogen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass diese nur im Raum Augsburg gesammelt wurden, während die Studienteilnehmerinnen aus ganz Deutschland kamen. Die Auswahl des Gens *LSP1* erfolgte aufgrund der Assoziation von Varianten in diesem Gen in voran gegangenen Studien. So hatte eine genomweite Assoziationsstudie eine Assoziation des SNPs rs3817198 mit dem Brustkrebsrisiko aufgezeigt (Easton et al. 2007). Die daraufhin durchgeführte Validierung des GC-HBOC zeigte eine Assoziation des SNPs rs2271439 mit dem Erkrankungsrisiko (Hemminki et al. 2009). Inzwischen konnte in weiteren Validierungsstudien eine Assoziation für Varianten in diesem Gen in unterschiedlichen Populationen, nämlich bei Afroamerikanerinnen und bei Chinesinnen, eruiert werden (Barnholtz-Sloan et al. 2010; Long et al. 2010). Diese Reproduzierbarkeit spricht dafür, dass es sich tatsächlich um einen Effekt handelt und nicht um eine zufällige Assoziation. Die Auswahl der weiteren SNPs für die Validierung erfolgte nach einem ähnlichen Prinzip. Dabei wurden die vielversprechendsten Varianten aus vorangegangenen Studien herangezogen. Da für die meisten dieser Varianten noch keine hinreichende Evidenz für ihre Assoziation mit einem Brustkrebsrisiko vorliegt, ist es

geplant, die Ergebnisse dieses Studienteiles als Grundlage für weitere Forschungsschritte zu verwenden.

4.2 Eigene Daten

4.2.1 Die Assoziation von rs2271439 mit dem Brustkrebsrisiko

4.2.1.1 Validierung eines zweiten Risikoallels in *LSP1*

Die aus der Genotypisierung gewonnenen Daten wurden im Rahmen einer Fall-Kontroll-Studie mit den Daten der voran gegangenen Studien des GC-HBOC verrechnet. Dabei zeigte sich in verschiedenen Berechnungsmodellen eine signifikante Assoziation des SNPs rs2271439. Wurden nur die Fälle, welche aus einer der Hochrisikofamilien A oder B stammten, mit der Kontrollgruppe verglichen, zeigte sich ein stärkerer Effekt und eine höhere statistische Signifikanz. Eine positive Assoziation zwischen einer Genvariante und einem Phänotyp kann jedoch drei verschiedene Gründe haben (Goldberg und Weinberger 2004):

- Die Variante selbst kann Ursache für den Phänotyp sein.
- Die Assoziation kann daraus resultieren, dass die untersuchte Variante mit einer anderen, den Phänotyp verursachenden Variante im Kopplungsungleichgewicht vorliegt.
- Oder die Assoziation kann ein Artefakt sein.

Die Tatsache, dass bei Personen aus Hochrisikofamilien eine stärkere Assoziation vorliegt, kann dadurch erklärt werden, dass in familiären Fällen aufgrund des restlichen, weitere Risikovarianten tragenden Genoms ein stärkerer Effekt auftritt. Dabei kann es sein, dass mehrere Risikovarianten im Genom nebeneinander liegen, somit im Kopplungsungleichgewicht sind und gemeinsam vererbt werden. Es ist aber auch möglich, dass mehrere Risikovarianten auf unterschiedlichen Chromosomen für den Effekt verantwortlich sind.

4.2.1.2 Vergleich mit dem Studienkollektiv des CGEMS

Um die Ergebnisse der unterschiedlichen Studien vergleichbar zu machen, wurde aus den Daten des CGEMS berechnet, welche Genotypen in den dort verwendeten Proben im SNP rs2271439 vorlagen. Die Ergebnisse dieser Berechnung sind in der folgenden Tabelle 4.1 dargestellt.

Test	Allelfrequenz	Heterozygot	Homozygot	Allel positivity	Armitage
	Risikoallel A				
	[C] ↔ [A]	[CC] ↔ [CA]	[CC] ↔ [AA]	[CC] ↔ [CA+AA]	common OR
Odds Ratio	OR = 1,067	OR = 0,966	OR = 1,634	OR = 1,017	OR = 1,117
KI	[0,915-1,244]	[0,804-1,160]	[1,002-2,665]	[0,852-1,214]	
χ ²	0,68	0,14	3,94	0,03	0,67
p-Wert	p= 0,41008	p= 0,70918	p= 0,04724	p= 0,85421	p= 0,41306
	Risikoallel C				
	[A] ↔ [C]	[AA] ↔ [CA]	[AA] ↔ [CC]	[CC+CA] ↔ [AA]	common OR
Odds Ratio	OR = 0,937	OR = 0,591	OR = 0,612	OR = 0,606	OR = 0,906
KI	[0,804-1,093]	[0,357-0,978]	[0,375-0,998]	[0,373-0,985]	
χ ²	0,68	4,26	3,94	4,15	0,67
p-Wert	p= 0,41008	p= 0,03901	p= 0,04724	p= 0,04151	p= 0,41306

Tabelle 4.1: Statistische Berechnung der Assoziation des Risikoallels A im SNP rs2271439 mit dem Brustkrebsrisiko für alle Fälle des CGEMS.

Die meisten durchgeführten Berechnungsmodelle führten zu einem signifikanten Ergebnis. Bei genauerer Betrachtung zeigt sich jedoch, dass der Effekt dabei in eine andere Richtung geht als der bei den Daten des GC-HBOC. Die wahrscheinlichste Ursache für diese Beobachtung ist ein sogenanntes Flip-Flop-Phänomen (Lin et al. 2007). Ähnliche Fälle, in welchen die unterschiedlichen Allele eines SNPs in verschiedenen Studien mit einem Phänotyp assoziiert waren, traten in der Vergangenheit mehrmals auf. So wurden zum Beispiel unterschiedliche Allele des Serotonintransportergens in mehreren Studien mit Autismus in Verbindung gebracht (Devlin et al. 2005), (Betancur et al. 2002), (Maestrini et al. 1999), (McCauley et al. 2004), (Tordjman et al. 2001; Yirmiya et al. 2001). Auch bei der Assoziation eines SNPs im *Catechol-O-Methyltransferase* Gen mit der Schizophrenie zeigte sich ein solcher Effekt (Chen et al. 2004), (Glatt et al. 2003), (Park et al. 2002),

(Sanders et al. 2005). Das in diesen Studien beobachtete Phänomen wird Flip-Flop-Phänomen genannt. Dieses Phänomen kann dadurch erklärt werden, dass unterschiedliche ethnische Gruppen untersucht wurden, welche einen anderen genetischen Hintergrund aufweisen (Lin et al. 2007). Durch den unterschiedlichen genetischen Hintergrund kommt es zu Unterschieden in der Kopplung der verschiedenen Genbereiche. Wenn ein SNP getestet wird, welcher selbst nicht kausal für den Phänotyp ist, sondern mit einem weiteren kausalen in den verschiedenen Genbereichen (Lin et al. 2007). Da aber auch ein zufälliges Zustandekommen dieses inkonsistenten Ergebnisses möglich ist, wäre es nötig, dieses in weiteren Studien zu validieren.

4.2.2 Die Sequenzierung des Gens *LSP1*

Die Sequenzierung der Exons und der angrenzenden intronischen Bereiche des Gens *LSP1* in sechs Proben zeigte, dass der als Risikovariante bekannte SNPs rs3817198, welcher aus der GWAS von Easton et. al. bekannt ist, und der vom GC-HBOC gefundene SNP rs2271439 nicht im Kopplungsungleichgewicht liegen (Easton et al. 2007). Es kann also davon ausgegangen werden, dass es sich um ein weiteres, vom bereits bekannten Allel unabhängiges Risikoallel handelt. Ein Ziel dieser Sequenzierung war es, eine Kopplung des SNPs rs2271439 mit einer anderen Variante zu finden. Aufgrund der Verteilung der Allele konnte dabei ein gewisses Kopplungsungleichgewicht mit rs621679 beobachtet werden, eine eindeutige Aussage ist mit den vorliegenden Daten aber noch nicht möglich. Dieser SNP liegt im kodierenden Bereich und führt zum Austausch eines Alanins durch ein Threonin an Position 100 des Proteins. Eine weitere Auffälligkeit ist die Tatsache, dass alle sechs Proben unabhängig vom Genotyp rs2271439 heterozygot für den SNP rs7938342 waren. Dieser SNP liegt im kodierenden Bereich und führt in Isoform 2.1 zum Austausch eines Glutamins durch ein Leucin an Position 34 des Proteins. Die geringe Probenanzahl in diesem Versuch lässt keine statistisch signifikanten Aussagen zu, weswegen die beobachteten Ergebnisse für eine klare Aussage mit größeren Probenzahlen bestätigt werden müssten.

4.3 Andere *LSP1*-Varianten

Der erste Polymorphismus im Bereich des Gens *LSP1*, welcher in Zusammenhang mit dem Brustkrebsrisiko gebracht wurde, war rs3817198, welcher 2007 von Easton et.al. publiziert wurde (Easton et al. 2007). Er wurde im Rahmen einer genomweiten Assoziationsstudie entdeckt und in mehreren Validierungsstudien bestätigt (Barnholtz-Sloan et al. 2010; Long et al. 2010). Für diesen SNP, welcher in Intron 10 des Gens *LSP1* liegt, sind die Varianten T und C bekannt. T ist die häufigere Variante und C die seltenere. In der genomweiten Assoziationsstudie konnte C als Risikovariante identifiziert werden. Beim zweiten Polymorphismus handelt es sich um den hier besprochenen SNP rs2271439, welcher 2009 vom GC-HBOC beschrieben wurde (Hemminki et al. 2009). Der Polymorphismus liegt im Intron 2 des Gens *LSP1* und die häufigere Variante C wurde mit einer Risikoerhöhung in Verbindung gebracht. Die seltenere Variante A zeigte einen protektiven Effekt. Im Jahr 2010 wurde eine dritte Variante entdeckt, nämlich rs909116 (Turnbull et al. 2010). Dieser SNP liegt ungefähr 28 kb stromabwärts des Gens *LSP1* in Intron 1 des Gens *TNNT3*. Das Gen *TNNT3* kodiert für Troponin T3, ein Kalzium bindendes Protein, welches einen Teil des Troponin-Komplexes bildet, welcher eine wichtige Rolle im Muskel spielt (University of California Santa Cruz). In diesem SNP sind die beiden Varianten C und T bekannt, wobei T die häufigere und die Risikovariante ist (University of California Santa Cruz). Die Assoziation dieses genomischen Bereiches mit dem Brustkrebsrisiko ist reproduzierbar. Es ist aber noch nicht bekannt, welche der Varianten für diese Risikoerhöhung verantwortlich ist. Es besteht auch die Möglichkeit, dass eine weitere noch nicht bekannte Variante, welche mit den untersuchten SNPs im Kopplungsungleichgewicht liegt, die entscheidende ist. Die Auswirkungen von genetischen Veränderungen auf die entstehenden Proteine und somit auf den Zellstoffwechsel können unterschiedlich sein. Es kann durch Basenaustausch zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz kommen oder bei SNPs im nicht kodierenden Bereich zu verändertem Spleißen oder zu Änderungen in der Genregulation. Da die beschriebenen SNPs nicht im kodierenden Bereich liegen, wäre es in weiterführenden Studien sinnvoll, nach einem Kopplungsungleichgewicht mit einem kodierenden SNP zu suchen oder mit

Hilfe von Expressionsanalysen nach unterschiedlicher Expression des Genprodukts bei Vorhandensein der unterschiedlichen SNPs zu suchen. Der SNP rs2271439 liegt sehr nahe am kodierenden Bereich, was ein Hinweis darauf sein könnte, dass er einen Effekt auf Spleißvorgänge hat. Die Variante rs3817198 liegt im intronischen Bereich des Gens *LSP1* und ein Einfluss auf die Genregulation sollte in weiteren Studien untersucht werden. Der SNP rs909116 liegt 28 kb stromabwärts des Gens *LSP1*, was einen Einfluss auf die Genregulation dieses Gens aber keinesfalls ausschließt, da regulatorische Bereiche von Genen häufig in einiger Entfernung derselben liegen. Auch ein Einfluss dieser Varianten auf das Gen *TNNT3* muss in weiteren Studien untersucht werden.

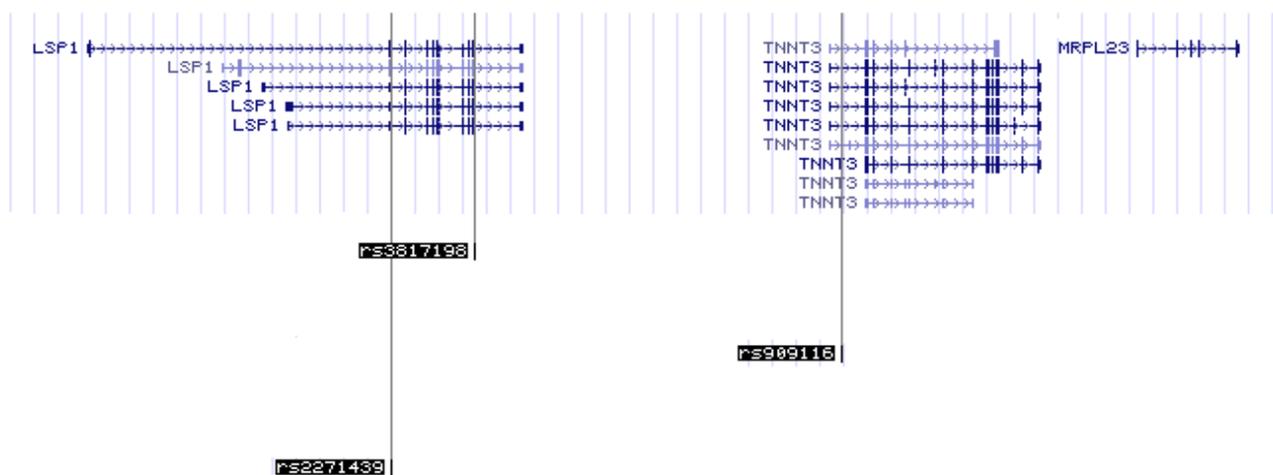


Abbildung 4.1: Die SNPs, welche eine Assoziation mit dem Brustkrebsrisiko zeigen, und ihre Lage im Genom

4.4 Das Protein LSP1

4.4.1 Expression in unterschiedlichen Geweben

Das Gen *LSP1* wird in B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, Makrophagen, Neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen exprimiert (Jongstra-Bilen und Jongstra 2006; Li et al. 1995). In einigen Subpopulationen von T-Lymphozyten fehlte die Expression des Gens jedoch, so enthielten z.B. 10 bis 13% der CD3-positiven Zellen kaum LSP1-Protein (Pulford et al. 1999). In einigen Leukämien und Lymphomen, zum Beispiel dem klassischen Hodgkin-Lymphom, wurde dagegen eine vermehrte Expression des Gens gefunden. (Pulford et al. 1999). Das Gen könnte eine Rolle bei der Differenzierung der hämatopoetischen Zellen spielen und wird in unterschiedlichen Reifestadien dieser Zellen

unterschiedlich stark exprimiert (Li et al. 1995). So steigt die Expression des Gens während der T-Zell-Reifung im Thymus. Während die unreifen, doppelt positiven (CD4+CD8+) Thymozyten nur sehr geringe Spiegel des Proteins aufweisen, haben reife, einfach positive (CD4-CD8+ und CD4+CD8-) Thymozyten hohe Spiegel von LSP1. Die folgende Grafik zeigt die Expression des Gens *LSP1* in den verschiedenen Gewebetypen, wobei aber leider keine Informationen über die Expression im Brustdrüsengewebe vorliegt (University of California Santa Cruz).

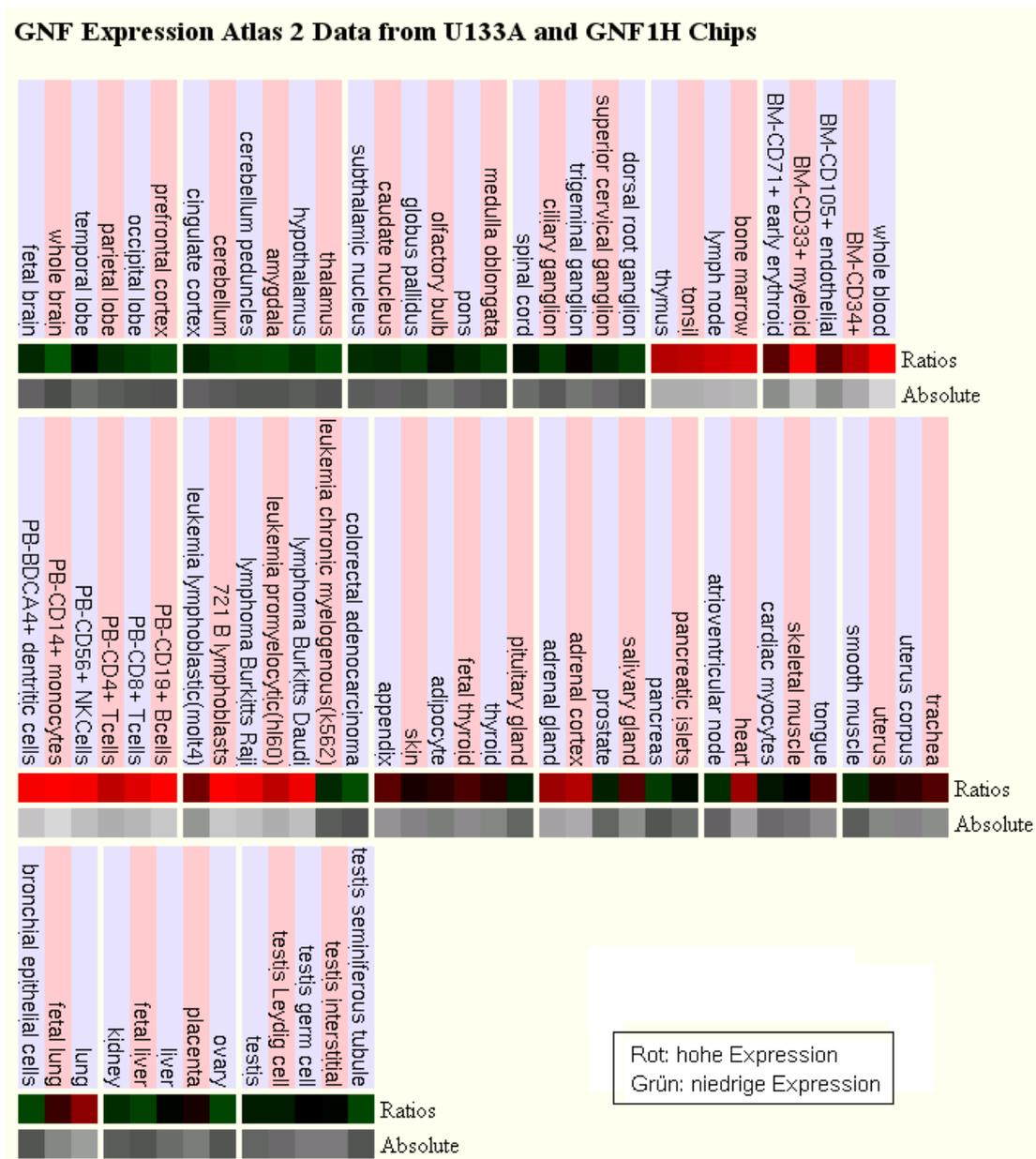


Abbildung 4.2: Expression des Gens *LSP1* in unterschiedlichen Geweben

4.4.2 Funktionen des Proteins

Von Patienten mit dem Neutrophil actin dysfunction (NAD) Syndrom ist bekannt, dass erhöhte LSP1-Spiegel vorliegen. Dieses autosomal rezessiv vererbte Syndrom führt zu schweren Infektionen, da die Neutrophilen eine verminderte Aktinpolymerisation und Chemotaxis zeigen (Howard et al. 1994). Untersuchungen an Lymphozyten von *LSP1*-knock-out Mäusen haben gezeigt, dass das Protein die Chemotaxis und die Motilität dieser Zellen hemmt (Jongstra-Bilen et al. 2000). Auch die Zellmorphologie wird vom LSP1-Spiegel beeinflusst, so z.B. zeigen Zellen einem erhöhten LSP1-Spiegel vermehrt Lamellopodien und andere Oberflächenveränderungen (Li et al. 2000). Die anfänglich gegensätzlichen Ergebnisse der Studien konnten dadurch erklärt werden, dass nur die Fibrinogen-abhängige Motilität beeinflusst und nicht die Fibronectin-abhängige Motilität beeinflusst wird (Jongstra-Bilen et al. 2000). Dies kommt dadurch zustande, dass durch LSP1 das Integrin Mac1 herab reguliert wird (Wang et al. 2002). Außerdem bilden Zellen, welche kein LSP1 exprimieren, mehr Superoxide, was dadurch erklärt werden kann, dass Mac1 die Superoxidproduktion beeinflusst (Hannigan et al. 2001). Für die transendotheliale Migration konnte gezeigt werden, dass diese vor allem von dem Vorhandensein von LSP1 in den Endothelzellen und nicht in den Leukozyten abhängig ist (Liu et al. 2005). LSP1 ist an unterschiedlichen intrazellulären Signalkaskaden beteiligt. Das Protein enthält Phosphorylierungsstellen, an welchen es durch die „Mitogen activated protein kinase-activated protein kinase 2“ (MAPKAPK2) und die Protein Kinase C (PKC) phosphoryliert werden kann (Huang et al. 1997). Die Phosphorylierung durch die PKC induziert eine Translokation des Proteins von der Membran ins Zytoplasma (Huang et al. 1997; Matsumoto et al. 1995). Die MAPKAPK2 ist ein Protein, welches durch verschiedene Zytokine, bei Stress und durch chemotaktische Faktoren aktiviert wird. Neben dem Hitzeschockprotein p27 ist LSP1 eines der wichtigsten Substrate der MAPKAPK2 (Huang et al. 1997). Die MAPKAPK2 ist ein Targetprotein für die p38 MAPK, welche unter anderem eine Rolle in der neutrophilen Chemotaxis spielt (Zu et al. 1998). Auch Inositoltriphosphat ist wichtig für die Regulation dieses Proteins (Jongstra-Bilen und Jongstra 2006). Ein hoher LSP1-Spiegel und inflammatorische Stimuli induzieren eine

Aktivierung der MAPKAPK2, was wiederum zu einer Phosphorylierung von LSP1 führt. Über die Negativregulation von Mac1 wurde die Adhäsion gehemmt, die hohen Spiegel von phosphoryliertem LSP1 führten zu einem Zytoskeletumbau. Diese Vorgänge führen zu einer Negativregulation der Transmigration (Jongstra-Bilen und Jongstra 2006). Ein niedriger LSP1-Spiegel führt somit zu einer Faszilitation der Adhäsion und Migration (Jongstra-Bilen und Jongstra 2006). LSP1 wird von der PKC an einer anderen Stelle phosphoryliert, als durch die MAPKAPK2. Das Protein kann nur von der PKC β 1 aktiviert werden, nicht von der PKC α und PKC β 2. Diese Phosphorylierung hat keinen Einfluss auf den p38-MAPK-Signalweg, sondern führt zu einer Aktivierung eines Signalwegs, welcher eine Rolle in der Apoptose spielt. In Versuchen mit Lymphomzellen konnte gezeigt werden, dass Zellen, in welchen das Protein LSP1 vorhanden war, susceptibler für Anti-IgM induzierte Apoptosen waren. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass LSP1 eine Rolle in der kalziumabhängigen Phase der Anti-IgM vermittelten Apoptoseinduktion spielt (Jongstra-Bilen et al. 1999). Bei der Suche nach apoptoseassoziierten Proteinen in Zellen eines Burkitt-Lymphoms wurde festgestellt, dass LSP1 in apoptotischen Zellen stärker exprimiert wird als in nicht apoptotischen (Brockstedt et al. 1998).

4.4.3 Einfluss von LSP1 bei der Entstehung des Mammakarzinoms

Wie es durch genetische Polymorphismen zu einer Veränderung des Brustkrebsrisikos kommt, ist noch nicht endgültig geklärt. Durch solche Polymorphismen ist es möglich, dass es zu einer veränderten, also vermehrten oder verminderten Expression des Genprodukts oder zu einem veränderten Genprodukt kommt. Es sind mehrere Mechanismen denkbar, wie es durch eine veränderte Expression oder durch ein verändertes LSP1-Protein zu einer Änderung des Brustkrebsrisikos kommen könnte:

- Das Protein könnte eine noch nicht bekannte Funktion im Brustgewebe haben. Um die Bedeutung im Brustgewebe zu untersuchen, wäre es eventuell sinnvoll, die Expression des Proteins in gesundem Brustgewebe und Brustkrebsgewebe zu messen. Deshalb sollte eine Studie durchgeführt werden, ob die bekannten Risikovarianten zu einer Änderung der Expression von *LSP1* im Brustgewebe

führen. Es ist z.B. vorstellbar, dass das Protein deshalb eine Rolle in der Krebsentstehung spielt, weil es die Apoptose beeinflusst. Eine Rolle in der Apoptose von lymphatischen Zellen konnte für das Protein nachgewiesen werden (Brockstedt et al. 1998). Ob das Protein auch in der Apoptose von Brustdrüsenzellen eine Rolle spielt, ist noch unklar.

- Bei der Karzinogenese spielen Lymphozyten, auch schon in frühen Phasen, eine wichtige Rolle (Watanabe et al. 2010). LSP1 ist in Lymphozyten stark exprimiert. Es ist bekannt, dass es eine Rolle in der Leukozytentransmigration, -motilität und -funktion spielt (Jongstra-Bilen und Jongstra 2006). Es ist somit möglich, dass die genetischen Varianten einen Einfluss auf die Lymphozyten haben, welcher die Brustkrebsentstehung beeinflusst. Es sind noch weitere Studien nötig, welche die Rolle von LSP1 in Lymphozyten und die Rolle der Lymphozyten in der Brustkrebsentstehung untersuchen.
- Bei der Karzinogenese spielten nicht nur die eigentlichen Drüsenzellen, sondern das ganze Gewebe, inklusive der extrazellulären Matrix eine Rolle (Bagnoli et al.). In weiteren Studien sollte deshalb untersucht werden, ob die Varianten in LSP1 einen Einfluss auf die extrazelluläre Matrix haben.

4.5 Validierung und Fortsetzung der Studien des GC-HBOC

Einige der SNPs, welche in der Validierung auffällig waren, sind bereits vorher in mehreren Studien als Risikovarianten für Brustkrebs identifiziert und publiziert worden. Zusätzlich sind einige neue SNPs in den vorangegangenen Studien des GC-HBOC aufgefallen und wurden in die Validierung aufgenommen.

Dass Varianten im Gen *RAD51L* mit einer Risikoerhöhung für Brustkrebs assoziiert sind, wurde bereits publiziert und konnte auch mit unserer Validierung bestätigt werden. Dasselbe gilt für Varianten im Gen *FGFR2*. Der SNP rs11249433 ist auch schon als Risikovariante beschrieben und zeigte in der Validierung nur im rezessiven Modell eine signifikante Risikoerhöhung. Auch in der Veröffentlichung von Thomas et.al. war diese Rezessivität aufgefallen (Thomas et al. 2009). Im Gen *TLE1* zeigten gleich drei SNPs eine

Assoziation mit dem Brustkrebsrisiko. Auch die SNPs rs2394829 im Gen *CDH23* und rs1610374 zeigten eine signifikante Risikoerhöhung. Die restlichen untersuchten SNPs waren in der Validierung nicht signifikant. Diese Ergebnisse der Validierung sind nicht als endgültig anzusehen, sondern als Teil der weiteren Studien des CG-HBOC.

4.6 BCAC

Die Ergebnisse der BCAC-Studie innerhalb von COGS, in welcher die insgesamt etwa 800 SNPs auffällig waren, liegen zurzeit noch nicht vor.

4.7 Stand der Forschung und Zukunftsaussichten

Bei der Suche nach Genen, welche für die familiäre Häufung von Brustkrebsfällen verantwortlich sind, ist es wichtig, Hochpenetranzgene von Niedrigpenetranzgenen zu unterscheiden. Die wichtigsten Hochpenetranzgene *BRCA1* und *BRCA2* wurden schon Mitte der Neunzigerjahre des letzten Jahrhunderts gefunden. Die Suche nach weiteren dieser relativ häufig mutierten, hochpenetranzen Gene war nicht sehr erfolgreich. Es wurden zwar einige hochpenetrante Gene gefunden, diese sind jedoch in der Bevölkerung sehr selten mutiert. Deshalb kann nur ein geringer Teil der familiären Häufung von Brustkrebsfällen durch diese Gene erklärt werden (Varghese und Easton 2010). Dies führte zur Annahme, dass ein polygener Erbgang Grund der familiären Häufung sein muss (Varghese und Easton 2010). Heute geht man zwar von einer großen Zahl von Polymorphismen aus, wovon, jeder für sich genommen nur eine geringe Risikoerhöhung mit sich bringt. Die Risikoerhöhung liegt typischerweise unter 1,5 und für die Meisten sogar nur zwischen 1,05 und 1,15 (Varghese und Easton 2010).

Genomweite Assoziationsstudien, welche die Frequenzen von genetischen Polymorphismen in Fällen und Kontrollen miteinander vergleichen, bieten eine Möglichkeit, solche Niedrigpenetranzvarianten zu finden. Während in frühen Assoziationsstudien Kandidatengene, welche verdächtig waren eine Rolle in der Karzinogenese zu spielen, untersucht wurden, ist es heute möglich, hunderttausende SNPs gleichzeitig zu typisieren. Solche Studien haben dazu geführt, dass einige Varianten in Verbindung mit Brustkrebs gebracht werden konnten, welche anfänglich unbekannt waren.

Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden mehrere Assoziationsstudien für kaukasische Populationen und eine für eine chinesische Population durchgeführt (Easton et al. 2007; Hunter et al. 2007; Stacey et al. 2007; Turnbull et al. 2010; Zheng et al. 2009). Diese Studien haben zur Identifikation von einigen, in der folgenden Tabelle dargestellten SNPs geführt (Turnbull et al. 2010; Varghese und Easton 2010).

Genort	SNP		
1p11.2	rs11249433		
2q35	rs13387042		
<i>NEK10/SLC4A7</i>	rs4973768		
<i>MAP3K1</i>	rs889312		
<i>MRPS30</i>	rs10941679		
<i>ESR1</i>	rs2046210		
8q24	rs13281615	rs1562430	
<i>FGFR2</i>	rs2981582		
<i>LSP1</i>	rs3817198	rs909116	
<i>RAD51L1</i>	rs999737	rs8009944	
<i>TOX3</i>	rs3803662		
<i>COX11</i>	rs6504950	rs1156287	rs7222197
5p12	rs9790879	rs10941679	rs7716600
6q25.1	rs3757318	s2046210	rs6900157
<i>CASP8</i>	rs10931936		

Tabelle 4.2: Bekannte Genorte und SNPs, welche mit einer Risikoerhöhung fürs Mammakarzinom assoziiert sind.

Die meisten bekannten Varianten sind in der Nähe von plausiblen Kandidatengenen, zum Beispiel *MAP3K1*, *LSP1* und *RAD51L1*. Einige Varianten liegen aber auch in genomischen Bereichen, in welchen sich keine Gene befinden, zum Beispiel 8q24 und 2q35. Auch wenn damit schon einige Genorte mit einer geringen Risikoerhöhung in Verbindung gebracht wurden, reichen diese noch nicht aus, um die familiäre Häufung zu erklären (Varghese und Easton 2010). Es gibt unterschiedliche Erklärungsansätze für diese Schwierigkeit. Eine Erklärungsmöglichkeit ist, dass das familiäre genetische Risiko überschätzt worden ist. Es wäre möglich, dass ein Teil des familiären Risikos durch gemeinsame Umweltfaktoren bedingt ist. Dagegen spricht, dass die Risiken für eineiige Zwillinge besser übereinstimmen, als die für zweieiige Zwillinge. Außerdem sind viele lebensstilbedingte Risikofaktoren bekannt und können in die Beobachtungen miteinbezogen werden. Trotzdem ist es möglich, dass noch nicht bekannte Umweltfaktoren vorhanden sind,

welche dazu führen, dass die genetische bedingte Risikoerhöhung überschätzt wird (Varghese und Easton 2010; Lichtenstein et al. 2000). Wenn man davon ausgeht, dass die bis jetzt nicht erklärte familiäre Häufung eine genetisch bedingte Ursache hat, bleiben immer noch mehrere Erklärungsmöglichkeiten (Varghese und Easton 2010):

1. Man kann davon ausgehen, dass viele Niedrigrisikovarianten in den bereits durchgeführten GWAS nicht erkannt worden sind, da die Anzahl der Probanden der Studien zu gering war. Diese Varianten könnten mit Hilfe von größeren GWAS und Replikationsstudien erkannt werden. Damit diese Polymorphismen mit sehr geringem Effekt erkannt werden können, ist es wichtig, dass in diesen Studien eine sehr große Probenanzahl (>20.000) untersucht wird. Trotzdem ist es wahrscheinlich, dass einige Varianten mit kleinstem Effekt auch in ausgedehnten Studien nicht erkannt werden.
2. Es ist wahrscheinlich, dass es noch mehrere komplexe Interaktionen zwischen verschiedenen Genorten oder zwischen genetischen und nicht genetischen Risikofaktoren gibt, welche noch nicht bekannt sind.
3. Es ist nicht völlig ausgeschlossen, dass andere genetische Mechanismen, wie strukturelle Rearrangements, Repeat-Polymorphismen und epigenetische Faktoren, wie Imprinting, wichtig sind, auch wenn es noch keine Evidenz dafür gibt.
4. Schließlich könnte das familiäre Risiko durch selteneren Varianten erklärt werden, die aber zu einer stärkeren Risikoerhöhung führen, welche in den GWAS nicht gefunden werden konnten. Mit Hilfe der neuen Methoden können solche aber jetzt gefunden werden.

Mit den derzeitigen Kenntnissen über die Niedrigrisikovarianten und ihre Interaktionen ist es gegenwärtig nicht möglich, eine klinisch bedeutsame Risikoeinschätzung für die einzelne Person vorzunehmen, wie das bei den Hochpenetranzgenen *BRCA1* und *BRCA2* der Fall ist. Die Erklärung, wie es von der Risikovariante zu dem Effekt kommt, ist nur in einer sehr geringen Anzahl der Fälle erfolgt. Es gibt viele Varianten, welche in einem nicht kodierenden Bereich liegen und wahrscheinlich über Bindung von Proteinen, wie zum Beispiel Transkriptionsfaktoren, die Expression von stromabwärtsgelegenen Genen

regulieren. Oft handelt es sich dabei um Gene, welche eine Rolle in Wachstumsfaktor-Signalkaskaden, DNS-Reparatur und der Zell-Zell-Adhäsion spielen. Nur für wenige dieser Gene, wie zum Beispiel *FGFR2*, ist inzwischen ein plausibler Mechanismus bekannt, über welchen es zur Risikoerhöhung kommt, für die meisten der bekannten Varianten ist dies aber nicht der Fall. Es handelt sich um eine Rezeptortyrosinkinase, welche in 5-10% der Brustkrebsfälle amplifiziert ist. Die genauere Untersuchung dieses Gens reduzierte die möglichen kausalen Varianten auf die Zahl von Sechs (Meyer et al. 2008; Udler et al. 2009). Die plausibelste dieser Varianten ist rs2981578. Dieser SNP liegt in einem Transkriptionsfaktor-bindenden Bereich, welcher hoch konserviert ist (Meyer et al. 2008; Udler et al. 2009). Das Erkennen von neuen Risikovarianten und das Erforschen ihres biologischen Effekts könnten aber im Idealfall dazu führen, dass durch die GWAS neue, vorher nicht verdächtige Wege der Karzinogenese entdeckt werden. Dies wiederum könnte zu neuen Präventions- und Therapiemöglichkeiten führen (Varghese und Easton 2010).

Für das Auffinden neuer Niedrigrisikovarianten ist es aufgrund des zu erwartenden geringen Effekts der einzelnen Polymorphismen nötig, eine sehr große Anzahl von Fällen und Kontrollen miteinander zu vergleichen. Diese Fallzahlen könnten in einer Studie der Collaborative Oncological Gene-environment Study (COGS) erreicht werden (Collaborative oncological Gene-environment study). Eine Liste der Teilnehmer ist in der folgenden Tabelle zusammengestellt (Collaborative oncological Gene-environment study).

Teilnehmer	Land
Karolinska Institutet	Schweden
The Chancellor, Masters and Scholars of the University of Cambridge	Großbritannien
Queensland Institute of Medical Research	Australien
Deutsches Krebsforschungszentrum	Deutschland
Fundación Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas Carlos III	Spanien
Lund University	Schweden
Hospital District of Helsinki and Uusimaa	Finnland
Vereniging Het Nederlands Kanker Instituut	Niederlande
Foundation for Genomics and Population Health	Großbritannien
Danish Cancer Society	Dänemark
Breast International Group a.i.s.b.l.	Belgien
The Institute of Cancer Research	Großbritannien
Centre Leon Berard	Frankreich
University College London	Großbritannien
The Cancer Council Victoria	Australien

Tabelle 4.3: Liste der an der COGS teilnehmenden Institute

Die COGS wurde von der Europäischen Kommission gegründet. Das Ziel dieses Projekts ist es, genetische Varianten, Lebensstilfaktoren und ihren Einfluss auf das Krebsrisiko zu erforschen, um das individuelle Risiko der einzelnen Personen in Zukunft besser einschätzen zu können. Neben Brust- und Eierstockkrebs wird in diesem Projekt auch das Prostatakarzinom untersucht. In dieses Projekt sollen 200 000 Personen eingeschlossen werden (Collaborative oncological Gene-environment study). Es wurden fünf Ziele definiert:

1. Es sollen wichtige genetische Varianten erkannt werden, welche für die Entstehung von Brust-, Eierstock- und Prostatakrebs verantwortlich sind. Es soll auch festgestellt werden wie diese Varianten das Risiko beeinflussen und wie sie in Kombination wirken (Collaborative oncological Gene-environment study).
2. Die Interaktion dieser Polymorphismen mit bekannten und neuen Umweltfaktoren soll ermittelt werden (Collaborative oncological Gene-environment study).
3. Es soll festgestellt werden, ob bestimmte genetischen Varianten und Umweltfaktoren mit bestimmten Subtypen und dem klinischen „Outcome“ zusammenhängen (Collaborative oncological Gene-environment study).

4. Es sollen neue Risikomodelle entwickelt werden, in welchen aus genetischen Varianten und Umweltfaktoren ein individuelles Risiko für eine Person berechnet werden kann (Collaborative oncological Gene-environment study).
5. Durch die Risikomodelle sollen mithilfe von Kosten-Nutzen-Analysen neue Präventionsstrategien entwickelt werden, wobei auch organisatorische, ethische, rechtliche und soziale Aspekte miteinbezogen werden (Collaborative oncological Gene-environment study).

Die Strategie ist es, bereits existierende Ergebnisse von GWAS zu benutzen, um SNPs auszusuchen, welche im Projekt typisiert werden sollen. Dazu gehören auch ca. 800 von im Rahmen dieser Arbeit ausgesuchten SNPs, die in kleineren Fallzahlen noch nicht auffällig waren. Die Risikovarianten sollen mit Hilfe einer Dreiphasenstudie erkannt werden (Collaborative oncological Gene-environment study).

1. Stage I: Sammeln der Daten aus bereits durchgeführten GWAS der verschiedenen Konsortien. Aus diesen Daten sollen 1536 SNPs ausgewählt werden, welche dann in Stage II weiter typisiert werden sollen. Dies soll im ersten Jahr durchgeführt werden (Collaborative oncological Gene-environment study).
2. Stage II: Die in Stage I gesammelten SNPs sollen in 10 000 Brustkrebsfällen und 10 000 Kontrollen, in 10 000 Prostatakrebsfällen und 10 000 Kontrollen sowie in 5 000 Eierstockkrebsfällen und 5 000 Kontrollen typisiert werden. Diese Phase soll auch ungefähr ein Jahr dauern. Die Genotypisierung soll, wegen des großen Arbeitsaufwands, zentral durchgeführt werden (Collaborative oncological Gene-environment study).
3. Stage III: In dieser Phase sollen die 50 vielversprechendsten Genorte in weiteren 70 000 Fällen und Kontrollen genotypisiert werden. Dies soll in den einzelnen Gruppen durchgeführt werden (Collaborative oncological Gene-environment study).

Die COGS-Organisatoren gehen davon aus, mit Hilfe dieser Studie mindestens 30 Suszeptibilitätsvarianten für jedes der untersuchten Karzinome zu finden (Collaborative

oncological Gene-environment study). Neben diesen Niedrigrisikovarianten erlangen auch sogenannte private Mutationen zunehmend an Bedeutung. Dabei handelt es sich nicht um weit verbreitete Varianten, sondern um selten vorkommende Mutationen, welche aber zu einer deutlich stärkeren Risikoerhöhung führen. Ein wichtiges Beispiel bei Brust- und Eierstockkrebs ist das Gen *RAD51C* (Meindl et al. 2010). Das Gen *RAD51D* gehört ebenfalls in diese Gruppe und wurde bei Familien mit Eierstockkrebs entdeckt, eine Validierung seiner Rolle beim Mammakarzinom läuft zurzeit (Loveday et al. 2011). Laut persönlicher Mitteilung von Prof. Dr. Alfons Meindl zeigt eine neue, noch nicht veröffentlichte Studie, dass auch private Mutationen im Gen *XRCC2* für das Auftreten des familiären Mammakarzinoms verantwortlich sein können.

5 Zusammenfassung

Mit der vorliegenden Arbeit wird an die bisherige Forschung des Deutschen Konsortiums für familiären Brust- und Eierstockkrebs (GC-HBOC) zum Thema genetische Niedrigrisikovarianten für das Mammakarzinom angeknüpft. Schwerpunktmäßig beschäftigt sich die Arbeit mit Risikovarianten im Gen *LSP1*.

Neben dem bereits als Risikovariante bekanntem SNP rs3817198 war in den Studie des GC-HBOC der Einzelbasenpolymorphismus rs2271439 in Intron 2 des Gens *LSP1* aufgefallen (Easton et al. 2007; Hemminki et al. 2009). Dieser wurde nun in 368 weiteren Proben validiert. Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang der Variante mit Cytosin und einem erhöhten Brustkrebsrisiko, wobei der Effekt in den Hochrisikogruppen stärker ausgeprägt war. Im Rahmen einer Metaanalyse wurden die Ergebnisse mit den Daten des Cancer Genetic Markers of Susceptibility Project (CGEMS) verglichen (Easton et al. 2007). Die erfolgte Sequenzierung der Exons und der flankierenden intronischen Bereiche des Gens *LSP1* zeigte, dass der als Risikovariante bekannten SNP rs3817198 und der von uns charakterisierte SNP rs2271439 nicht im Kopplungsungleichgewicht liegen. Ein weiteres Ziel dieser Sequenzierung war auch, eine Kopplung des SNP rs2271439 mit einer kodierenden Variante zu finden, da eine solche Variante die eigentliche Ursache für die Risikoerhöhung sein könnte. Aufgrund der Verteilung der Allele kann ein gewisses Kopplungsungleichgewicht mit rs621679 angenommen werden. Dieser SNP liegt im kodierenden Bereich und verursacht den Austausch eines Alanins durch ein Threonin an Position 100 des Proteins. Eine weitere Auffälligkeit war, dass alle sechs Proben unabhängig vom Genotyp in rs2271439 heterozygot für den SNP rs7938342 waren. Dieser SNP liegt ebenfalls im kodierenden Bereich und führt zum Austausch eines Glutamins durch ein Leucin an Position 34 von *LSP1*. Die geringe Probenanzahl lässt zwar noch keine statistisch signifikanten Aussagen zu, aber die Bedeutung dieser Beobachtung kann jetzt zügig geklärt werden. Neben dem Gen *LSP1* beschäftigt sich die vorliegende Arbeit auch mit der Fortsetzung der Validierung weiterer Einzelbasenpolymorphismen, welche teilweise schon aus Publikationen bekannt, teilweise in den vorangegangenen Studien des GC-HBOC aufgefallen und teilweise noch

unbekannt waren (Hemminki et al. 2009). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden analog zur ersten Validierung des GC-HBOC 1501 weitere Proben aus dem Kollektiv des GC-HBOC ausgewählt. Es konnten bereits bekannte Risikovarianten in den Genen *RAD51L* und *FGFR2* bestätigt werden. Aber auch neue SNPs zeigten eine signifikante Assoziation, z.B. die SNPs rs1175332, rs2378556 und rs400161 im Bereich des Gens *TLE1*, rs2394829 im Gen *CDH23* und rs1610374. Schließlich wurden ca. 800 SNPs ausgewählt, die im Rahmen der COGS-Studie untersucht wurden und deren Ergebnisse demnächst zu erwarten sind.

Literaturverzeichnis

- Ahmed, Shahana; Thomas, Gilles; Ghoussaini, Maya; Healey, Catherine S.; Humphreys, Manjeet K.; Platte, Radka et al. (2009): Newly discovered breast cancer susceptibility loci on 3p24 and 17q23.2. In: *Nat. Genet.* 41 (5), S. 585–590.
- Antoniou, Antonis C.; Sinilnikova, Olga M.; McGuffog, Lesley; Healey, Sue; Nevanlinna, Heli; Heikkinen, Tuomas et al. (2009): Common variants in LSP1, 2q35 and 8q24 and breast cancer risk for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. In: *Hum. Mol. Genet.* 18 (22), S. 4442–4456.
- Antoniou, Antonis C.; Sinilnikova, Olga M.; Simard, Jacques; Léoné, Mélanie; Dumont, Martine; Neuhausen, Susan L. et al. (2007): RAD51 135G--C modifies breast cancer risk among BRCA2 mutation carriers: results from a combined analysis of 19 studies. In: *Am. J. Hum. Genet.* 81 (6), S. 1186–1200.
- Antoniou, Antonis C.; Spurdle, Amanda B.; Sinilnikova, Olga M.; Healey, Sue; Pooley, Karen A.; Schmutzler, Rita K. et al. (2008): Common breast cancer-predisposition alleles are associated with breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. In: *Am. J. Hum. Genet.* 82 (4), S. 937–948.
- Apter, D.; Reinilä, M.; Vihko, R. (1989): Some endocrine characteristics of early menarche, a risk factor for breast cancer, are preserved into adulthood. In: *Int. J. Cancer* 44 (5), S. 783–787.
- Bagnoli, Fábio; Oliveira, Vilmar Marques de; Silva, Maria Antonieta Longo Galvão da; Taromaru, Giuliana Cássia Morrone; Rinaldi, José Francisco; Aoki, Tsutomu: The interaction between aromatase, metalloproteinase 2,9 and cd44 in breast cancer. In: *Rev Assoc Med Bras* 56 (4), S. 472–477.
- Barnholtz-Sloan, Jill S.; Shetty, Priya B.; Guan, Xiaowei; Nyante, Sarah J.; Luo, Jingchun; Brennan, Donal J.; Millikan, Robert C. (2010): FGFR2 and other loci identified in genome-wide association studies are associated with breast cancer in African-American and younger women. In: *Carcinogenesis* 31 (8), S. 1417–1423.
- Bauerfeind, I. (2011): Mammakarzinome: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge: Zuckschwerdt Verlag.

- Betancur, C.; Corbex, M.; Spielwoy, C.; Philippe, A.; Laplanche, J. L.; Launay, J. M. et al. (2002): Serotonin transporter gene polymorphisms and hyperserotonemia in autistic disorder. In: *Mol. Psychiatry* 7 (1), S. 67–71.
- Breast Cancer Association Consortium: BCAC. Online verfügbar unter <http://www.srl.cam.ac.uk/consortia/bcac/index.html>, zuletzt geprüft am 28.05.2010.
- Brockstedt, E.; Rickers, A.; Kostka, S.; Laubersheimer, A.; Dörken, B.; Wittmann-Liebold, B. et al. (1998): Identification of apoptosis-associated proteins in a human Burkitt lymphoma cell line. Cleavage of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 by caspase 3. In: *J. Biol. Chem.* 273 (43), S. 28057–28064.
- Byrnes, Graham B.; Southey, Melissa C.; Hopper, John L. (2008): Are the so-called low penetrance breast cancer genes, ATM, BRIP1, PALB2 and CHEK2, high risk for women with strong family histories? In: *Breast Cancer Res* 10 (3), S. 208.
- Byron, Sara A.; Gartside, Michael G.; Wellens, Candice L.; Goodfellow, Paul J.; Birrer, Michael J.; Campbell, Ian G.; Pollock, Pamela M. (2010): FGFR2 mutations are rare across histologic subtypes of ovarian cancer. In: *Gynecologic oncology*, 125-129.
- Chappuis, P. O.; Nethercot, V.; Foulkes, W. D. (2000): Clinico-pathological characteristics of BRCA1- and BRCA2-related breast cancer. In: *Semin Surg Oncol* 18 (4), S. 287–295.
- Chen, X.; Wang, X.; O'Neill, A. F.; Walsh, D.; Kendler, K. S. (2004): Variants in the catechol-o-methyltransferase (COMT) gene are associated with schizophrenia in Irish high-density families. In: *Mol. Psychiatry* 9 (10), S. 962–967.
- Collaborative oncological Gene-environment study: Welcome to Cogs. Online verfügbar unter <http://www.cogseu.org/>, zuletzt geprüft am 25.09.2010.
- Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2: CIMBA. Online verfügbar unter <http://www.srl.cam.ac.uk/consortia/cimba/index.html>, zuletzt geprüft am 28.05.2010.
- Cox, Angela; Dunning, Alison M.; Garcia-Closas, Montserrat; Balasubramanian, Sabapathy; Reed, Malcolm W. R.; Pooley, Karen A. et al. (2007): A common coding variant in CASP8 is associated with breast cancer risk. In: *Nat. Genet.* 39 (3), S. 352–358.
- Devlin, B.; Cook, E. H.; Coon, H.; Dawson, G.; Grigorenko, E. L.; McMahon, W. et al. (2005): Autism and the serotonin transporter: the long and short of it. In: *Mol. Psychiatry* 10 (12), S. 1110–1116.

- Domchek, Susan M.; Friebel, Tara M.; Singer, Christian F.; Evans, D. Gareth; Lynch, Henry T.; Isaacs, Claudine et al. (2010): Association of risk-reducing surgery in BRCA1 or BRCA2 mutation carriers with cancer risk and mortality. In: *JAMA* 304 (9), S. 967–975.
- Domchek, Susan M.; Stopfer, Jill E.; Rebbeck, Timothy R. (2006): Bilateral risk-reducing oophorectomy in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. In: *J Natl Compr Canc Netw* 4 (2), S. 177–182.
- Easton, D. (1999): Cancer risks in BRCA2 mutation carriers. The Breast Cancer Linkage Consortium. In: *J. Natl. Cancer Inst.* 91 (15), S. 1310–1316.
- Easton, D. (2004): CHEK2*1100delC and susceptibility to breast cancer: a collaborative analysis involving 10,860 breast cancer cases and 9,065 controls from 10 studies. In: *Am. J. Hum. Genet* 74 (6), S. 1175–1182.
- Easton, Douglas F.; Pooley, Karen A.; Dunning, Alison M.; Pharoah, Paul D. P.; Thompson, Deborah; Ballinger, Dennis G. et al. (2007): Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. In: *Nature* 447 (7148), S. 1087–1093.
- Eisinger, F.; Sobol, H.; Serin, D.; Whorton, J. C. (1998): Hereditary breast cancer, circa 1750. In: *Lancet* 351 (9112), S. 1366
- Engert, Stefanie; Wappenschmidt, Barbara; Betz, Beate; Kast, Karin; Kutsche, Michael; Hellebrand, Heide et al. (2008): MLPA screening in the BRCA1 gene from 1,506 German hereditary breast cancer cases: novel deletions, frequent involvement of exon 17, and occurrence in single early-onset cases. In: *Hum. Mutat.* 29 (7), S. 948–958.
- Fu, Yi-Ping; Edvardsen, Hege; Kaushiva, Alpana; Arhancet, Juan P.; Howe, Tiffany M.; Kohaar, Indu et al. (2010): NOTCH2 in breast cancer: association of SNP rs11249433 with gene expression in ER-positive breast tumors without TP53 mutations. In: *Mol. Cancer* 9, S. 113
- Ganten, Detlev; Bader, Michael (2003): Grundlagen der molekularen Medizin. Mit 28 Tabellen. 2., überarb. und erw. Aufl. Berlin: Springer (Molekulare Medizin).
- Gayther, S. A.; Mangion, J.; Russell, P.; Seal, S.; Barfoot, R.; Ponder, B. A. et al. (1997): Variation of risks of breast and ovarian cancer associated with different germline mutations of the BRCA2 gene. In: *Nat. Genet.* 15 (1), S. 103–105.

- Ghousaini, Maya; Fletcher, Olivia; Michailidou, Kyriaki; Turnbull, Clare; Schmidt, Marjanka K.; Dicks, Ed et al. (2012): Genome-wide association analysis identifies three new breast cancer susceptibility loci. In: *Nature genetics*, S. 312-318.
- Glatt, Stephen J.; Faraone, Stephen V.; Tsuang, Ming T. (2003): Association between a functional catechol O-methyltransferase gene polymorphism and schizophrenia: meta-analysis of case-control and family-based studies. In: *Am J Psychiatry* 160 (3), S. 469–476.
- Gold, Bert; Kirchhoff, Tomas; Stefanov, Stefan; Lautenberger, James; Viale, Agnes; Garber, Judy et al. (2008): Genome-wide association study provides evidence for a breast cancer risk locus at 6q22.33. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105 (11), S. 4340–4345.
- Goldberg, Terry E.; Weinberger, Daniel R. (2004): Genes and the parsing of cognitive processes. In: *Trends Cogn. Sci. (Regul. Ed.)* 8 (7), S. 325–335.
- Goldgar, D. E.; Fields, P.; Lewis, C. M.; Tran, T. D.; Cannon-Albright, L. A.; Ward, J. H. et al. (1994): A large kindred with 17q-linked breast and ovarian cancer: genetic, phenotypic, and genealogical analysis. In: *J. Natl. Cancer Inst.* 86 (3), S. 200–209.
- Grade, K.; Höffken, K.; Kath, R.; Nothnagel, A.; Bender, E.; Scherneck, S. (1997): BRCA1 mutations and phenotype. In: *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 123 (1), S. 69–70.
- Hannigan, M.; Zhan, L.; Ai, Y.; Huang, C. K. (2001): Leukocyte-specific gene 1 protein (LSP1) is involved in chemokine KC-activated cytoskeletal reorganization in murine neutrophils in vitro. In: *J. Leukoc. Biol.* 69 (3), S. 497–504.
- Hemminki, Kari; Müller-Myhsok, Bertram; Lichtner, Peter; Engel, Christoph; Chen, Bowang; Burwinkel, Barbara et al. (2009): Low risk variants FGFR2, TNRC9 and LSP1 in German familial breast cancer patients. In: *Int. J. Cancer*.
- Hinds, David A.; Stuve, Laura L.; Nilsen, Geoffrey B.; Halperin, Eran; Eskin, Eleazar; Ballinger, Dennis G. et al. (2005): Whole-genome patterns of common DNA variation in three human populations. In: *Science* 307 (5712), S. 1072–1079.
- Hirshfield, Kim M.; Rebbeck, Timothy R.; Levine, Arnold J. (2010): Germline mutations and polymorphisms in the origins of cancers in women. In: *J Oncol* 2010, S. 297671.

- Howard, T.; Li, Y.; Torres, M.; Guerrero, A.; Coates, T. (1994): The 47-kD protein increased in neutrophil actin dysfunction with 47- and 89-kD protein abnormalities is lymphocyte-specific protein. In: *Blood* 83 (1), S. 231–241.
- Huang, C. K.; Zhan, L.; Ai, Y.; Jongstra, J. (1997): LSP1 is the major substrate for mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 in human neutrophils. In: *J. Biol. Chem.* 272 (1), S. 17–19.
- Hunter, David J.; Kraft, Peter; Jacobs, Kevin B.; Cox, David G.; Yeager, Meredith; Hankinson, Susan E. et al. (2007): A genome-wide association study identifies alleles in FGFR2 associated with risk of sporadic postmenopausal breast cancer. In: *Nat. Genet.* 39 (7), S. 870–874.
- Illig, Thomas: Hochdurchsatz SNP Genotypisierung mit MALDI TOF MS. In: *BIOspektrum · Sonderausgabe* 2004 (05/2004), S. 670–674.
- Janni, Wolfgang (2007): Mammakarzinome. 11., überarb. Aufl. München: Zuckschwerdt (Manual / Tumorzentrum München).
- Jongstra-Bilen, J.; Misener, V. L.; Wang, C.; Ginzberg, H.; Auerbach, A.; Joyner, A. L. et al. (2000): LSP1 modulates leukocyte populations in resting and inflamed peritoneum. In: *Blood* 96 (5), S. 1827–1835.
- Jongstra-Bilen, J.; Wielowieyski, A.; Misener, V.; Jongstra, J. (1999): LSP1 regulates anti-IgM induced apoptosis in WEHI-231 cells and normal immature B-cells. In: *Mol. Immunol.* 36 (6), S. 349–359.
- Jongstra-Bilen, Jenny; Jongstra, Jan (2006): Leukocyte-specific protein 1 (LSP1): a regulator of leukocyte emigration in inflammation. In: *Immunol. Res.* 35 (1-2), S. 65–74.
- Lal, G.; Liu, G.; Schmocker, B.; Kaurah, P.; Ozcelik, H.; Narod, S. A. et al. (2000): Inherited predisposition to pancreatic adenocarcinoma: role of family history and germline p16, BRCA1, and BRCA2 mutations. In: *Cancer Res.* 60 (2), S. 409–416.
- Lavie, O.; Hornreich, G.; Ben Arie, A.; Renbaum, P.; Levy-Lahad, E.; Beller, U. (2000): BRCA1 germline mutations in women with uterine serous papillary carcinoma. In: *Obstet Gynecol* 96 (1), S. 28–32.
- Li, Y.; Guerrero, A.; Howard, T. H. (1995): The actin-binding protein, lymphocyte-specific protein 1, is expressed in human leukocytes and human myeloid and lymphoid cell lines. In: *J. Immunol.* 155 (7), S. 3563–3569.

- Li, Y.; Zhang, Q.; Aaron, R.; Hilliard, L.; Howard, T. H. (2000): LSP1 modulates the locomotion of monocyte-differentiated U937 cells. In: *Blood* 96 (3), S. 1100–1105.
- Lichtenstein, P.; Holm, N. V.; Verkasalo, P. K.; Iliadou, A.; Kaprio, J.; Koskenvuo, M. et al. (2000): Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. In: *N. Engl. J. Med.* 343 (2), S. 78–85.
- Lim, W.; Hearle, N.; Shah, B.; Murday, V.; Hodgson, S. V.; Lucassen, A. et al. (2003): Further observations on LKB1/STK11 status and cancer risk in Peutz-Jeghers syndrome. In: *Br. J. Cancer* 89 (2), S. 308–313.
- Lin, K. M.; Ternent, C. A.; Adams, D. R.; Thorson, A. G.; Blatchford, G. J.; Christensen, M. A. et al. (1999): Colorectal cancer in hereditary breast cancer kindreds. In: *Dis. Colon Rectum* 42 (8), S. 1041–1045.
- Lin, Ping-I; Vance, Jeffery M.; Pericak-Vance, Margaret A.; Martin, Eden R. (2007): No gene is an island: the flip-flop phenomenon. In: *Am. J. Hum. Genet.* 80 (3), S. 531–538.
- Liu, Lixin; Cara, Denise C.; Kaur, Jaswinder; Raharjo, Eko; Mullaly, Sarah C.; Jongstra-Bilen, Jenny et al. (2005): LSP1 is an endothelial gatekeeper of leukocyte transendothelial migration. In: *J. Exp. Med.* 201 (3), S. 409–418.
- Long, Jirong; Shu, Xiao-Ou; Cai, Qiuyin; Gao, Yu-Tang; Zheng, Ying; Li, Guoliang et al. (2010): Evaluation of breast cancer susceptibility loci in Chinese women. In: *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 19 (9), S. 2357–2365.
- Loveday, Chey; Turnbull, Clare; Ramsay, Emma; Hughes, Deborah; Ruark, Elise; Frankum, Jessica R. et al. (2011): Germline mutations in RAD51D confer susceptibility to ovarian cancer. In: *Nat Genet* 43 (9), S. 879–882.
- Lux, Michael P.; Fasching, Peter A.; Beckmann, Matthias W. (2006): Hereditary breast and ovarian cancer: review and future perspectives. In: *J. Mol. Med.* 84 (1), S. 16–28.
- Maestrini, E.; Lai, C.; Marlow, A.; Matthews, N.; Wallace, S.; Bailey, A. et al. (1999): Serotonin transporter (5-HTT) and gamma-aminobutyric acid receptor subunit beta3 (GABRB3) gene polymorphisms are not associated with autism in the IMGSA families. The International Molecular Genetic Study of Autism Consortium. In: *Am. J. Med. Genet.* 88 (5), S. 492–496.

- Matsumoto, N.; Kojima, S.; Osawa, T.; Toyoshima, S. (1995): Protein kinase C phosphorylates p50 LSP1 and induces translocation of p50 LSP1 in T lymphocytes. In: *J. Biochem.* 117 (1), S. 222–229.
- McCauley, J. L.; Olson, L. M.; Dowd, M.; Amin, T.; Steele, A.; Blakely, R. D. et al. (2004): Linkage and association analysis at the serotonin transporter (SLC6A4) locus in a rigid-compulsive subset of autism. In: *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 127B (1), S. 104–112.
- Meindl, Alfons: Mutationen, Erbgänge und Erkrankungsrisiken. In: *Mamma Mia* 2009 (1/2009), S. 15-19.
- Meindl, Alfons; Ditsch, Nina; Kast, Karin; Rhiem, Kerstin; Schmutzler, Rita K. (2011): Hereditary breast and ovarian cancer: new genes, new treatments, new concepts. In: *Dtsch Arztebl Int* 108 (19), S. 323–330.
- Meindl, Alfons; Hellebrand, Heide; Wiek, Constanze; Erven, Verena; Wappenschmidt, Barbara; Niederacher, Dieter et al. (2010): Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene. In: *Nature genetics*. S. 410-414
- Meyer, Kerstin B.; Maia, Ana-Teresa; O'Reilly, Martin; Teschendorff, Andrew E.; Chin, Suet-Feung; Caldas, Carlos; Ponder, Bruce A. J. (2008): Allele-specific up-regulation of FGFR2 increases susceptibility to breast cancer. In: *PLoS Biol.* 6 (5), S. e108.
- Miki, Y.; Swensen, J.; Shattuck-Eidens, D.; Futreal, P. A.; Harshman, K.; Tavtigian, S. et al. (1994): A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. In: *Science* 266 (5182), S. 66–71.
- Mülhardt, Cornel (2009): Der Experimentator. Molekularbiologie/ Genomics. Heidelberg (Springer-11777 /Dig. Serial
- Murken, Jan (2006): Taschenlehrbuch Humangenetik. 96 Tabellen. 7., vollst. überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme.
- National Center for Biotechnology Information (2010): dbSNP Home Page. Online verfügbar unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>, zuletzt aktualisiert am 09.04.2010, zuletzt geprüft am 29.04.2010.

- Nichols, K. E.; Malkin, D.; Garber, J. E.; Fraumeni, J. F.; Li, F. P. (2001): Germ-line p53 mutations predispose to a wide spectrum of early-onset cancers. In: *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 10 (2), S. 83–87.
- Niederacher, D.; Picard, F.; van Roeyen, C.; An, H. X.; Bender, H. G.; Beckmann, M. W. (1997): Patterns of allelic loss on chromosome 17 in sporadic breast carcinomas detected by fluorescent-labeled microsatellite analysis. In: *Genes Chromosomes Cancer* 18 (3), S. 181–192.
- Park, Tae-Won; Yoon, Kyung-Sik; Kim, Ju-Han; Park, Woong-Yang; Hirvonen, Ari; Kang, Daehee (2002): Functional catechol-O-methyltransferase gene polymorphism and susceptibility to schizophrenia. In: *Eur Neuropsychopharmacol* 12 (4), S. 299–303.
- Pulford, K.; Jones, M.; Banham, A. H.; Haralambieva, E.; Mason, D. Y. (1999): Lymphocyte-specific protein 1: a specific marker of human leucocytes. In: *Immunology* 96 (2), S. 262–271.
- Rahman, Nazneen; Seal, Sheila; Thompson, Deborah; Kelly, Patrick; Renwick, Anthony; Elliott, Anna et al. (2007): PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. In: *Nat. Genet.* 39 (2), S. 165–167.
- Rassow, Joachim (2006): Biochemie. 50 Tabellen. Stuttgart: Thieme (Das duale Lehrbuch).
- Rebbeck, Timothy R. (2002): Inherited predisposition and breast cancer: modifiers of BRCA1/2-associated breast cancer risk. In: *Environ. Mol. Mutagen.* 39 (2-3), S. 228–234.
- Renwick, Anthony; Thompson, Deborah; Seal, Sheila; Kelly, Patrick; Chagtai, Tasnim; Ahmed, Munaza et al. (2006): ATM mutations that cause ataxia-telangiectasia are breast cancer susceptibility alleles. In: *Nat. Genet.* 38 (8), S. 873–875.
- Ripperger, Tim; Gadzicki, Dorothea; Meindl, Alfons; Schlegelberger, Brigitte (2009): Breast cancer susceptibility: current knowledge and implications for genetic counselling. In: *Eur. J. Hum. Genet.* 17 (6), S. 722–731.
- Robert-Koch-Institut (2010): Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010 ; eine Veröffentlichung des Zentrums für Krebsregisterdaten am RKI. Berlin: Robert-Koch-Institut.

- Sanders, A. R.; Rusu, I.; Duan, J.; Vander Molen, J. E.; Hou, C.; Schwab, S. G. et al. (2005): Haplotypic association spanning the 22q11.21 genes COMT and ARVCF with schizophrenia. In: *Mol. Psychiatry* 10 (4), S. 353–365.
- Sasieni, P. D. (1997): From genotypes to genes: doubling the sample size. In: *Biometrics* 53 (4), S. 1253–1261.
- Schäffler, Andreas; Schölmerich, Jürgen; Buechler, Christa (2007): Mechanisms of disease: adipokines and breast cancer - endocrine and paracrine mechanisms that connect adiposity and breast cancer. In: *Nature clinical practice. Endocrinology & metabolism* 3 (4), S. 345–354.
- Smith, Paula; McGuffog, Lesley; Easton, Douglas F.; Mann, Graham J.; Pupo, Gulletta M.; Newman, Beth et al. (2006): A genome wide linkage search for breast cancer susceptibility genes. In: *Genes Chromosomes Cancer* 45 (7), S. 646–655.
- Stacey, Simon N.; Manolescu, Andrei; Sulem, Patrick; Rafnar, Thorunn; Gudmundsson, Julius; Gudjonsson, Sigurjon A. et al. (2007): Common variants on chromosomes 2q35 and 16q12 confer susceptibility to estrogen receptor-positive breast cancer. In: *Nat. Genet.* 39 (7), S. 865–869.
- Tapper, William; Hammond, Victoria; Gerty, Sue; Ennis, Sarah; Simmonds, Peter; Collins, Andrew; Eccles, Diana (2008): The influence of genetic variation in 30 selected genes on the clinical characteristics of early onset breast cancer. In: *Breast Cancer Res.* 10 (6), S. R108.
- Terry, Mary Beth; Knight, Julia A.; Zablotska, Lydia; Wang, Qiao; John, Esther M.; Andrulis, Irene L. et al. (2007): Alcohol metabolism, alcohol intake, and breast cancer risk: a sister-set analysis using the Breast Cancer Family Registry. In: *Breast Cancer Res. Treat.* 106 (2), S. 281–288.
- Thomas, Gilles; Jacobs, Kevin B.; Kraft, Peter; Yeager, Meredith; Wacholder, Sholom; Cox, David G. et al. (2009): A multistage genome-wide association study in breast cancer identifies two new risk alleles at 1p11.2 and 14q24.1 (RAD51L1). In: *Nat. Genet.* 41 (5), S. 579–584.
- Thompson, Deborah; Easton, Douglas F. (2002): Cancer Incidence in BRCA1 mutation carriers. In: *J. Natl. Cancer Inst.* 94 (18), S. 1358–1365.

- Thompson, Deborah; Szabo, Csilla I.; Mangion, Jon; Oldenburg, Rogier A.; Odefrey, Fabrice; Seal, Sheila et al. (2002): Evaluation of linkage of breast cancer to the putative BRCA3 locus on chromosome 13q21 in 128 multiple case families from the Breast Cancer Linkage Consortium. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (2), S. 827–831.
- Tordjman, S.; Gutknecht, L.; Carlier, M.; Spitz, E.; Antoine, C.; Slama, F. et al. (2001): Role of the serotonin transporter gene in the behavioral expression of autism. In: *Mol. Psychiatry* 6 (4), S. 434–439.
- Turnbull, Clare; Ahmed, Shahana; Morrison, Jonathan; Pernet, David; Renwick, Anthony; Maranian, Mel et al. (2010): Genome-wide association study identifies five new breast cancer susceptibility loci. In: *Nat. Genet.* 42 (6), S. 504–507.
- Udler, Miriam S.; Meyer, Kerstin B.; Pooley, Karen A.; Karlins, Eric; Struewing, Jeffery P.; Zhang, Jinghui et al. (2009): FGFR2 variants and breast cancer risk: fine-scale mapping using African American studies and analysis of chromatin conformation. In: *Hum. Mol. Genet.* 18 (9), S. 1692–1703.
- University of California Santa Cruz: UCSC Genome Browser Home. Online verfügbar unter <http://genome.ucsc.edu/>, zuletzt geprüft am 01.03.2010.
- US National Library of Medicine, National Institutes of Health (2010): Genetics Home Reference - Your guide to understanding genetic conditions. Online verfügbar unter <http://ghr.nlm.nih.gov/>, zuletzt aktualisiert am 07.03.2010, zuletzt geprüft am 15.03.2010.
- Varghese, Jajini Susan; Easton, Douglas F. (2010): Genome-wide association studies in common cancers--what have we learnt? In: *Curr. Opin. Genet. Dev.* 20 (3), S. 201–209.
- Wang, Chunjie; Hayashi, Hisayoshi; Harrison, Rene; Chiu, Basil; Chan, Jason R.; Ostergaard, Hanne L. et al. (2002): Modulation of Mac-1 (CD11b/CD18)-mediated adhesion by the leukocyte-specific protein 1 is key to its role in neutrophil polarization and chemotaxis. In: *J. Immunol.* 169 (1), S. 415–423.
- Warner, E.; Foulkes, W.; Goodwin, P.; Meschino, W.; Blondal, J.; Paterson, C. et al. (1999): Prevalence and penetrance of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in unselected Ashkenazi Jewish women with breast cancer. In: *J. Natl. Cancer Inst.* 91 (14), S. 1241–1247.

- Watanabe, Maria Angelica Ehara; Oda, Julie Massayo Maeda; Amarante, Marla Karine; Cesar Voltarelli, Julio (2010): Regulatory T cells and breast cancer: implications for immunopathogenesis. In: *Cancer metastasis reviews*. S. 569-79.
- Weischer, Maren; Bojesen, Stig Egil; Ellervik, Christina; Tybjaerg-Hansen, Anne; Nordestgaard, Børge Grønne (2008): CHEK2*1100delC genotyping for clinical assessment of breast cancer risk: meta-analyses of 26,000 patient cases and 27,000 controls. In: *J. Clin. Oncol.* 26 (4), S. 542–548.
- Wichmann, Hans E.: KORA-gen - Ressource für Bevölkerungsgenetik, Kontrollen und ein breites Spektrum von Krankheits-Phänotypen. In: *Gesundheitswesen* 2005 (67), S. S. 26-30.
- Wooster, R.; Neuhausen, S. L.; Mangion, J.; Quirk, Y.; Ford, D.; Collins, N. et al. (1994): Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. In: *Science* 265 (5181), S. 2088–2090.
- Yeager, Meredith; Orr, Nick; Hayes, Richard B.; Jacobs, Kevin B.; Kraft, Peter; Wacholder, Sholom et al. (2007): Genome-wide association study of prostate cancer identifies a second risk locus at 8q24. In: *Nat. Genet.* 39 (5), S. 645–649.
- Yirmiya, N.; Pilowsky, T.; Nemanov, L.; Arbelle, S.; Feinsilver, T.; Fried, I.; Ebstein, R. P. (2001): Evidence for an association with the serotonin transporter promoter region polymorphism and autism. In: *Am. J. Med. Genet.* 105 (4), S. 381–386.
- Young, S. R.; Pilarski, Robert T.; Donenberg, Talia; Shapiro, Charles; Hammond, Lyn S.; Miller, Judith et al. (2009): The prevalence of BRCA1 mutations among young women with triple-negative breast cancer. In: *BMC Cancer* 9, S. 86.
- Zheng, Wei; Long, Jirong; Gao, Yu-Tang; Li, Chun; Zheng, Ying; Xiang, Yong-Bin et al. (2009): Genome-wide association study identifies a new breast cancer susceptibility locus at 6q25.1. In: *Nat. Genet.* 41 (3), S. 324–328.
- Zu, Y. L.; Qi, J.; Gilchrist, A.; Fernandez, G. A.; Vazquez-Abad, D.; Kreutzer, D. L. et al. (1998): p38 mitogen-activated protein kinase activation is required for human neutrophil function triggered by TNF-alpha or FMLP stimulation. In: *J. Immunol.* 160 (4), S. 1982–1989.

Anhang:

DNS-Extraktion (Volumenangaben beziehen sich auf 2-3 ml Blut)

Blut in 15 ml Falcon®-Reaktionsgefäß geben

Bis zum Rand mit E-Lyse-Puffer füllen (E-Lyse: 20,7 g NH₄Cl, 2,5 g KHCO₃, 1,25 ml 2 M EDTA pro 500 ml H₂O)

20 min warten

10 min zentrifugieren (1000U/min, 7°C)

Überstand abkippen

7,5 ml E-Lyse hinzugeben

Mischen mit Hilfe des Vortex®-Geräts

10 min warten

10 min zentrifugieren (1000U/min, 7°C)

Überstand abkippen

Hinzufügen von:

2 ml SE

100 µl Natriumdodecylsulfat (SDS)

12 µl Pronase® (Proteolytische Enzyme)

8 h Mischen auf einem Rad

0,8 ml 5M NaCl hinzufügen

10 min zentrifugieren (3000 U/min, 25°C)

Überstand in neues Falcon®-Reaktionsgefäß geben

7,5 ml Ethanol (100Vol%) hinzugeben

Ausgefallene DNS an den Rand ziehen

Überstand abkippen

7,5 ml Ethanol (70Vol%) hinzugeben

Ausgefallene DNS mit Hilfe einer Pipette in ein Eppendorf®-Reaktionsgefäß geben

Ethanol verdampfen lassen

100-500 µl TE dazugeben

LSP1 Genotypisierung:

Lokalisation	Probennr.	Risikogruppe	Zentrum	Lokalisation	Probennr.	Risikogruppe	Zentrum
1A	10690	A	München	7A	16357	A	München
1B	10752	B	München	7B	18799	Unbekannt	München
1C	10885	A	München	7C	19821	B	München
1D	11791	B	München	7D	17104	A	München
1E	11847	A	München	7E	Leer		
1F	12340	A	München	7F	17117	A	München
1G	12648	A	München	7G	17149	A	München
1H	12994	B	München	7H	19241	B	München
2A	13290	A	München	8A	6008	B	München
2B	13909	B	München	8B	9610	B	München
2C	13911	Unbekannt	München	8C	9783	B	München
2D	14501	A	München	8D	19135	B	München
2E	14824	A	München	8E	19176	B	München
2F	15397	Unbekannt	München	8F	19182	A	München
2G	15737	A	München	8G	19251	A	München
2H	16222	B	München	8H	19255	A	München
3A	16223	B	München	9A	19272	A	München
3B	TE			9B	19364	B	München
3C	16608	B	München	9C	19390	B	München
3D	16611	A	München	9D	19391	A	München
3E	16889	Unbekannt	München	9E	19401	A	München
3F	17216	Unbekannt	München	9F	19453	B	München
3G	17373	A	München	9G	19456	A	München
3H	17446	A	München	9H	19458	A	München
4A	17637	A	München	10A	19460	B	München
4B	18036	B	München	10B	19474	A	München
4C	18134	B	München	10C	19514	A	München
4D	18444	A	München	10D	19549	A	München
4E	18614	B	München	10E	19556	A	München
4F	18622	A	München	10F	19603	A	München
4G	18706	A	München	10G	19618	B	München
4H	18730	B	München	10H	19634	A	München
5A	18751	B	München	11A	19664	B	München
5B	18781	B	München	11B	19676	A	München
5C	18793	A	München	11C	19690	A	München
5D	Leer			11D	19779	B	München
5E	18822	A	München	11E	19794	A	München
5F	18823	A	München	11F	19820	B	München
5G	18827	Unbekannt	München	11G	TE		
5H	18865	A	München	11H	19833	A	München
6A	18888	A	München	12A	19861	A	München
6B	19003	B	München	12B	19921	A	München
6C	19011	A	München	12C	19943	B	München
6D	19023	A	München	12D	19946	A	München
6E	19072	A	München	12E	19997	A	München
6F	19041	B	München	12F	20000	A	München
6G	19085	B	München	12G	20024	B	München
6H	19091	B	München	12H	20045	B	München

Tabelle: Proben für die Genotypisierung von LSP1 und ihre Lokalisation in den Platten

Lokalisation	Probennr.	Risikogruppe	Zentrum	Lokalisation	Probennr.	Risikogruppe	Zentrum
1A	10690	A	München	7A	16357	A	München
1B	10752	B	München	7B	18799	Unbekannt	München
1C	10885	A	München	7C	19821	B	München
1D	11791	B	München	7D	17104	A	München
1E	11847	A	München	7E	Leer		
1F	12340	A	München	7F	17117	A	München
1G	12648	A	München	7G	17149	A	München
1H	12994	B	München	7H	19241	B	München
2A	13290	A	München	8A	6008	B	München
2B	13909	B	München	8B	9610	B	München
2C	13911	Unbekannt	München	8C	9783	B	München
2D	14501	A	München	8D	19135	B	München
2E	14824	A	München	8E	19176	B	München
2F	15397	Unbekannt	München	8F	19182	A	München
2G	15737	A	München	8G	19251	A	München
2H	16222	B	München	8H	19255	A	München
3A	16223	B	München	9A	19272	A	München
3B	TE			9B	19364	B	München
3C	16608	B	München	9C	19390	B	München
3D	16611	A	München	9D	19391	A	München
3E	16889	Unbekannt	München	9E	19401	A	München
3F	17216	Unbekannt	München	9F	19453	B	München
3G	17373	A	München	9G	19456	A	München
3H	17446	A	München	9H	19458	A	München
4A	17637	A	München	10A	19460	B	München
4B	18036	B	München	10B	19474	A	München
4C	18134	B	München	10C	19514	A	München
4D	18444	A	München	10D	19549	A	München
4E	18614	B	München	10E	19556	A	München
4F	18622	A	München	10F	19603	A	München
4G	18706	A	München	10G	19618	B	München
4H	18730	B	München	10H	19634	A	München
5A	18751	B	München	11A	19664	B	München
5B	18781	B	München	11B	19676	A	München
5C	18793	A	München	11C	19690	A	München
5D	Leer			11D	19779	B	München
5E	18822	A	München	11E	19794	A	München
5F	18823	A	München	11F	19820	B	München
5G	18827	Unbekannt	München	11G	TE		
5H	18865	A	München	11H	19833	A	München
6A	18888	A	München	12A	19861	A	München
6B	19003	B	München	12B	19921	A	München
6C	19011	A	München	12C	19943	B	München
6D	19023	A	München	12D	19946	A	München
6E	19072	A	München	12E	19997	A	München
6F	19041	B	München	12F	20000	A	München
6G	19085	B	München	12G	20024	B	München
6H	19091	B	München	12H	20045	B	München

Tabelle: Proben für die Genotypisierung von *LSP1* und ihre Lokalisation in den Platten (Fortsetzung)

Lokalisation	Probennr.	Risikogruppe	Zentrum	Lokalisation	Probennr.	Risikogruppe	Zentrum
1A	10_0015_001	A	Düsseldorf	7A	10_0765_001	A	Düsseldorf
1B	10_0483_001	B	Düsseldorf	7B	10_0782_001	A	Düsseldorf
1C	10_0563_003	A	Düsseldorf	7C	10_0790_001	A	Düsseldorf
1D	10_0612_001	A	Düsseldorf	7D	R3_65	A	Kiel
1E	10_0619_008	A	Düsseldorf	7E	Leer		
1F	10_0623_001	A	Düsseldorf	7F	R4_16	B	Kiel
1G	10_0632_010	A	Düsseldorf	7G	R6_13	B	Kiel
1H	10_0639_001	A	Düsseldorf	7H	R6_31	A	Kiel
2A	10_0650_001	B	Düsseldorf	8A	R7_12	B	Kiel
2B	10_0665_001	A	Düsseldorf	8B	R7_55	B	Kiel
2C	10_0669_003	A	Düsseldorf	8C	R8_55	B	Kiel
2D	10_0679_003	A	Düsseldorf	8D	R9_06	B	Kiel
2E	10_0685_003	B	Düsseldorf	8E	R10_08	A	Kiel
2F	10_0695_001	A	Düsseldorf	8F	R10_21	A	Kiel
2G	10_0710_001	A	Düsseldorf	8G	R10_24	A	Kiel
2H	10_0123_001	A	Düsseldorf	8H	R10_51	A	Kiel
3A	10_0279_001	A	Düsseldorf	9A	R10_68	B	Kiel
3B	TE			9B	R11_10	B	Kiel
3C	10_0440_001	B	Düsseldorf	9C	R4_05	B	Kiel
3D	10_0608_005	B	Düsseldorf	9D	R6_22	B	Kiel
3E	10_0624_001	B	Düsseldorf	9E	R6_41	A	Kiel
3F	10_0625_001	B	Düsseldorf	9F	R7_27	B	Kiel
3G	10_0644_003	B	Düsseldorf	9G	R7_31	B	Kiel
3H	10_0670_003	B	Düsseldorf	9H	R7_37	B	Kiel
4A	10_0674_003	B	Düsseldorf	10A	R8_30	Unbekannt	Kiel
4B	10_0691_009	B	Düsseldorf	10B	R8_33	B	Kiel
4C	10_0700_001	B	Düsseldorf	10C	R9_53	B	Kiel
4D	10_0677_001	A	Düsseldorf	10D	R9_67	B	Kiel
4E	10_0681_003	B	Düsseldorf	10E	R10_15	A	Kiel
4F	10_0683_001	A	Düsseldorf	10F	R10_19	A	Kiel
4G	10_0711_001	B	Düsseldorf	10G	R11_14	A	Kiel
4H	10_0712_001	B	Düsseldorf	10H	R11_25	B	Kiel
5A	10_0720_001	A	Düsseldorf	11A	532_02	Unbekannt	Leipzig
5B	10_0724_012	B	Düsseldorf	11B	500_04	Unbekannt	Leipzig
5C	10_0726_001	B	Düsseldorf	11C	501_04	Unbekannt	Leipzig
5D	Leer			11D	502_04	Unbekannt	Leipzig
5E	21071	Unbekannt	München	11E	505_04	Unbekannt	Leipzig
5F	10_0727_001	B	Düsseldorf	11F	516_04	Unbekannt	Leipzig
5G	10_0735_008	B	Düsseldorf	11G	TE		
5H	10_0737_017	A	Düsseldorf	11H	517_04	Unbekannt	Leipzig
6A	10_0738_003	A	Düsseldorf	12A	541_05	Unbekannt	Leipzig
6B	10_0740_001	A	Düsseldorf	12B	545_05	Unbekannt	Leipzig
6C	10_0742_003	B	Düsseldorf	12C	548_05	Unbekannt	Leipzig
6D	10_0746_001	A	Düsseldorf	12D	558_05	Unbekannt	Leipzig
6E	10_0747_001	B	Düsseldorf	12E	542_05	Unbekannt	Leipzig
6F	10_0751_001	A	Düsseldorf	12F	561_06	Unbekannt	Leipzig
6G	10_0752_001	A	Düsseldorf	12G	563_06	Unbekannt	Leipzig
6H	10_0753_008	A	Düsseldorf	12H	1876.1	Unbekannt	Köln

Tabelle: Proben für die Genotypisierung von *LSP1* und ihre Lokalisation in den Platten (Fortsetzung)

Lokalisation	Probennr.	Risikogruppe	Zentrum	Lokalisation	Probennr.	Risikogruppe	Zentrum
1A	32.1	B	Köln	7A	1723.3	B	Köln
1B	65.2	A	Köln	7B	1728.1	A	Köln
1C	137.2	A	Köln	7C	1732.2	B	Köln
1D	177.2	B	Köln	7D	1740.1	A	Köln
1E	210.2	B	Köln	7E	Leer		
1F	219.2	B	Köln	7F	1741.2	A	Köln
1G	326.1	A	Köln	7G	1743.1	B	Köln
1H	537.4	B	Köln	7H	1767.1	B	Köln
2A	580.1	A	Köln	8A	1771.2	B	Köln
2B	648.2	B	Köln	8B	1779.2	B	Köln
2C	686.2	B	Köln	8C	1793.1	A	Köln
2D	781.2	B	Köln	8D	1801.1	A	Köln
2E	849.1	A	Köln	8E	1802.2	A	Köln
2F	931.1	A	Köln	8F	1803.1	A	Köln
2G	1023.1	A	Köln	8G	1804.1	A	Köln
2H	1065.1	A	Köln	8H	1804.2	A	Köln
3A	1081.1	A	Köln	9A	1811.1	A	Köln
3B	TE			9B	1023.1	A	Köln
3C	1084.2	B	Köln	9C	110.1	Unbekannt	Köln
3D	1164.1	A	Köln	9D	808.2	Unbekannt	Köln
3E	1257.2	B	Köln	9E	1607.2	Unbekannt	Köln
3F	1268.4	B	Köln	9F	1652.1	Unbekannt	Köln
3G	1347.2	A	Köln	9G	1835.1	Unbekannt	Köln
3H	1355.2	B	Köln	9H	1838.3	Unbekannt	Köln
4A	1364.1	B	Köln	10A	12.4	Unbekannt	Köln
4B	1375.2	B	Köln	10B	22.2	Unbekannt	Köln
4C	1396.2	B	Köln	10C	30.2	Unbekannt	Köln
4D	1428.1	B	Köln	10D	50.3	Unbekannt	Köln
4E	1484.1	A	Köln	10E	73.2	Unbekannt	Köln
4F	1494.1	A	Köln	10F	120.3	Unbekannt	Köln
4G	1500.1	B	Köln	10G	128.3	Unbekannt	Köln
4H	1504.2	A	Köln	10H	132.2	Unbekannt	Köln
5A	1506.2	A	Köln	11A	144.2	Unbekannt	Köln
5B	1513.3	B	Köln	11B	151.2	Unbekannt	Köln
5C	1525.1	B	Köln	11C	156.2	Unbekannt	Köln
5D	Leer			11D	163.2	Unbekannt	Köln
5E	1540.1	A	Köln	11E	172.1	Unbekannt	Köln
5F	1546.1	A	Köln	11F	176.3	Unbekannt	Köln
5G	1550.1	B	Köln	11G	TE		
5H	1553.2	B	Köln	11H	185.1	Unbekannt	Köln
6A	1555.2	B	Köln	12A	195.3	Unbekannt	Köln
6B	1558.2	A	Köln	12B	253.1	Unbekannt	Köln
6C	1589.1	A	Köln	12C	257.1	Unbekannt	Köln
6D	1600.1	A	Köln	12D	279.2	Unbekannt	Köln
6E	1601.2	B	Köln	12E	285.1	Unbekannt	Köln
6F	1609.2	B	Köln	12F	307.1	Unbekannt	Köln
6G	1623.1	A	Köln	12G	314.2	Unbekannt	Köln
6H	1701.2	B	Köln	12H	467.3	Unbekannt	Köln

Tabelle: Proben für die Genotypisierung von *LSP1* und ihre Lokalisation in den Platten (Fortsetzung)

Validierung:

	DNA#	ID	Risikogruppe	Zentrum		DNA#	ID	Risikogruppe	Zentrum
A1	1001.0	03-0002-001	B	Dres	A7	238.9	10-0238-009	A	Düs
B1	1019.0	03-0015-002	B	Dres	B7	278.1	10-0278-001	B	Düs
C1	1043.0	03-0074-101	A	Dres	C7	289.8	10-0289-008	A	Düs
D1	1035	03-0056-113	C	Dres	D7	291.1	10-0291-001	B	Düs
E1	1058	03-0118-001	C	Dres	E7	297.1	10-0297-001	B	Düs
F1	1136	03-0303-002	C	Dres	F7	366.1	10-0366-001	B	Düs
G1	1160	03-0312-101	C	Dres	G7	395.1	10-0395-001	B	Düs
H1	1186	03-0390-001	C	Dres	H7	403.1	10-0403-001	B	Düs
A2	1217	03-0404-001	C	Dres	A8	52C	10-0052-003	D	Düs
B2	1220	03-0406-001	C	Dres	B8	51A	10-0051-001	C	Düs
C2	1225	03-0407-002	C	Dres	C8	31B	10-0031-002	D	Düs
D2	1240	03-0419-001	C	Dres	D8	18A	10-0018-001	D	Düs
E2	1249	03-0412-101	C	Dres	E8	94.8	10-0094-008	B	Düs
F2	1037	03-0022-101	D	Dres	F8	55.10	10-0055-001	D	Düs
G2	1051	03-0073-101	D	Dres	G8	63,3	10-0063-003	D	Düs
H2	1052	03-0073-303	D	Dres	H8	66,13	10-0066-013	D	Düs
A3	1053	03-0103-101	D	Dres	A9	70,8	10-0070-008	D	Düs
B3	TE				B9	78,8	10-0078-008	D	Düs
C3	1072	03-0132-002	D	Dres	C9	85,3	10-0085-003	C	Düs
D3	1087	03-0277-001	D	Dres	D9	95,9	10-0095-009	C	Düs
E3	1102	03-0299-001	D	Dres	E9	100,1	10-0100-001	D	Düs
F3	1103	03-0306-001	D	Dres	F9	102,3	10-0102-003	C	Düs
G3	1109	03-0270-002	D	Dres	G9	105,3	10-0105-003	D	Düs
H3	1124	03-0333-001	D	Dres	H9	111,3	10-0111-003	D	Düs
A4	1128	03-0281-001	D	Dres	A10	118,1	10-0118-001	D	Düs
B4	1130	03-0339-101	D	Dres	B10	122,3	10-0122-003	D	Düs
C4	1131	03 0342 101	D	Dres	C10	165,1	10-0165-001	C	Düs
D4	1133	03-0343-001	D	Dres	D10	201,1	10-0201-001	B	Düs
E4	1138	03-0337-002	D	Dres	E10	237,1	10-0237-001	C	Düs
F4	1167	03-0361-101	D	Dres	F10	255,7	10-0255-007	D	Düs
G4	1179	03-0381-101	D	Dres	G10	260,1	10-0260-001	D	Düs
H4	1184	03-0386-101	D	Dres	H10	263,4	10-0263-004	D	Düs
A5	1185	03-0391-001	D	Dres	A11	298,1	10-0298-001	C	Düs
B5	1194	03-0395-001	D	Dres	B11	316,3	10-0316-003	D	Düs
C5	1251	03-0417-002	D	Dres	C11	333,3	10-0333-003	D	Düs
D5	1278	03-0443-001	D	Dres	D11	340,1	10-0340-001	D	Düs
E5	1024	03-0044-101	G	Dres	E11	354,1	10-0354-001	D	Düs
F5	1045	03-0081-001	G	Dres	F11	356,8	10-0356-008	C	Düs
G5	1078	03-0124-101	G	Dres	G11	TE			
H5	1204	03-0400-001	G	Dres	H11	360,1	10-0360-001	D	Düs
A6	1279	03-0442-001	G	Dres	A12	371,1	10-0371-001	D	Düs
B6	5.11	10-0005-011	A	Düs	B12	375,1	10-0375-001	C	Düs
C6	13.1	10-0013-001	A	Düs	C12	377,1	10-0377-001	D	Düs
D6	36.4	10-0036-004	A	Düs	D12	597.8	10-0597-008	A	Düs
E6	96.3	10-0096-003	B	Düs	E12	595.1	10-0595-001	C	Düs
F6	140.1	10-0140-001	A	Düs	F12	583.3	10-0583-003	D	Düs
G6	231.9	10-0231-009	A	Düs	G12	577.1	10-0577-001	D	Düs
H6	233.22	10-0233-022	B	Düs	H12	567.1	10-0567-001	D	Düs

Tabelle: Proben für die Validierung von Niedrigrisikovarianten und ihre Lokalisation in den Platten

	DNA#	ID	Risikogruppe	Zentrum
A1	561.3		D	Düs
B1	380.12		C	Düs
C1	386.3		C	Düs
D1	387.9		C	Düs
E1	388.1		D	Düs
F1	394.3		D	Düs
G1	401.1		C	Düs
H1	402.1		C	Düs
A2	410.1		C	Düs
B2	422.1		C	Düs
C2	423.3		D	Düs
D2	426.1		C	Düs
E2	427.8		D	Düs
F2	432.3		D	Düs
G2	434.3		C	Düs
H2	437.8		C	Düs
A3	453.8		B	Düs
B3	TE			
C3	467.3		D	Düs
D3	468.8		D	Düs
E3	480.1		D	Düs
F3	482.1		C	Düs
G3	490.8		D	Düs
H3	492.1		D	Düs
A4	524.1		D	Düs
B4	539.1		D	Düs
C4	541.2		D	Düs
D4	62.1		A	Düs
E4	226.21		A	Düs
F4	M2087/03		B	Han
G4	M2198/03		A	Han
H4	M2629/03		A	Han
A5	M2630/03		?	Han
B5	M3092/06		?	Han
C5	N3610/04		?	Han
D5	N3694/04		E	Han
E5	M1560/03		C	Han
F5	M1576/03		B	Han
G5	M3007/03		C	Han
H5	M2021/03		D	Han
A6	N3548/04		D	Han
B6	N3549/04		D	Han
C6	N3695/04		D	Han
D6	N3863/04		B	Han
E6	N4087/04		D	Han
F6	N4089/04		A	Han
G6	N4274/04		D	Han
H6	N4438/04		E	Han

	DNA#	ID	Risikogruppe	Zentrum
A7	N4488/04		D	Han
B7	N4655/04		L	Han
C7	N4741/04		C	Han
D7	N4771/04		L	Han
E7	N4772/04		C	Han
F7	N4773/04		D	Han
G7	N4776/04		D	Han
H7	N4777/04		D	Han
A8	N4827/04		L	Han
B8	N4845/04		L	Han
C8	N4917/04		B	Han
D8	N4926/04		A	Han
E8	N4927/04		A	Han
F8	N4952/04		C	Han
G8	N4960/04		?	Han
H8	N4981/04		?	Han
A9	M1575/03		B	Han
B9	M1764/03		D	Han
C9	N5051/04		B	Han
D9	N5068/04		?	Han
E9	N5190/04		K	Han
F9	N5191/04		G	Han
G9	N5209/04		A	Han
H9	N5363/04		D	Han
A10	N5416/04		G	Han
B10	N55/05		E	Han
C10	N56/05		B	Han
D10	N57/05		D	Han
E10	N337/05		C	Han
F10	N5210/04		A	Han
G10	N385/05		G	Han
H10	N415/05		?	Han
A11	N763/05		D	Han
B11	N815/05		C	Han
C11	N816/05		A	Han
D11	N1161/05		G	Han
E11	N4170/04		L	Han
F11	N434/05		G	Han
G11	TE			
H11	N474/05		L	Han
A12	N890/05		D	Han
B12	N943/05		B	Han
C12	N944/05		B	Han
D12	N1000/05		D	Han
E12	N1072/05		B	Han
F12	N1160/05		C	Han
G12	N1206/05		A	Han
H12	N1248/05		A	Han

Tabelle: Proben für die Validierung von Niedrigrisikovarianten und ihre Lokalisation in den Platten (Fortsetzung)

	DNA#	ID	Risikogruppe	Zentrum
A1	N1361/05		?	Han
B1	N1525/05		D	Han
C1	N1652/05		C	Han
D1	N1673/05		B	Han
E1	N1822/05		D	Han
F1	N16/06		B	Han
G1	N192/06		B	Han
H1	N193/06		C	Han
A2	N203/06		A	Han
B2	N362/06		C	Han
C2	N374/06		C	Han
D2	N395/06		F	Han
E2	N408/06		B	Han
F2	N456/06		A	Han
G2	N457/06		F	Han
H2	N485/06		C	Han
A3	N523/06		D	Han
B3	TE			
C3	N532/06		C	Han
D3	N559/06		?	Han
E3	N608/06		D	Han
F3	N616/06		D	Han
G3	N361/06		C	Han
H3	N646/06		D	Han
A4	N649/06		D	Han
B4	N748/06		?	Han
C4	N840/06		D	Han
D4	N922/06		B	Han
E4	N957/06		D	Han
F4	N731/06		C	Han
G4	321/03		D	Leipzig
H4	447/06		A	Leipzig
A5	143/03		A	Leipzig
B5	475/05		A	Leipzig
C5	404/02		B	Leipzig
D5	220/01		A	Leipzig
E5	327/99		A	Leipzig
F5	354/05		A	Leipzig
G5	882/01		B	Leipzig
H5	356/03		B	Leipzig
A6	85/05		A	Leipzig
B6	310/99		A	Leipzig
C6	351/00		A	Leipzig
D6	347/99		A	Leipzig
E6	438/02		B	Leipzig
F6	308/03		A	Leipzig
G6	277/04		B	Leipzig
H6	346/99		B	Leipzig

	DNA#	ID	Risikogruppe	Zentrum
A7	219/02		B	Leipzig
B7	343/02		A	Leipzig
C7	6/03		A	Leipzig
D7	290/99		B	Leipzig
E7	18/04		B	Leipzig
F7	318/01		G	Leipzig
G7	181/04		D	Leipzig
H7	417/05		A	Leipzig
A8	55/01		C	Leipzig
B8	109/03		C	Leipzig
C8	443/04		C	Leipzig
D8	55/06		A	Leipzig
E8	162/00		D	Leipzig
F8	423/02		B	Leipzig
G8	579/02		F	Leipzig
H8	676/98		C	Leipzig
A9	79/04		D	Leipzig
B9	105/02		D	Leipzig
C9	71/02		E	Leipzig
D9	600/01		D	Leipzig
E9	625/01		A	Leipzig
F9	591/00		E	Leipzig
G9	241/01		D	Leipzig
H9	443/02		D	Leipzig
A10	301/99		E	Leipzig
B10	15/03		C	Leipzig
C10	116/00		D	Leipzig
D10	283/98		G	Leipzig
E10	756/01		C	Leipzig
F10	363/06		C	Leipzig
G10	486/00		E	Leipzig
H10	843/01		F	Leipzig
A11	375/05		D	Leipzig
B11	322/99		D	Leipzig
C11	182/99		E	Leipzig
D11	130/99		E	Leipzig
E11	131/99		D	Leipzig
F11	215/02		E	Leipzig
G11	TE			
H11	118/04		B	Leipzig
A12	459/04		E	Leipzig
B12	206/99		C	Leipzig
C12	757/00		E	Leipzig
D12	828/00		E	Leipzig
E12	849/00		E	Leipzig
F12	115/99		D	Leipzig
G12	205/03		E	Leipzig
H12	42/02		D	Leipzig

Tabelle: Proben für die Validierung von Niedrigrisikovarianten und ihre Lokalisation in den Platten (Fortsetzung)

	DNA#	ID	Risikogruppe	Zentrum
A1	449/04		C	Leipzig
B1	417/99		E	Leipzig
C1	112/99		D	Leipzig
D1	319/03		G	Leipzig
E1	234/02		E	Leipzig
F1	439/05		C	Leipzig
G1	117/02		D	Leipzig
H1	101/00		G	Leipzig
A2	229/03		E	Leipzig
B2	393/01		F	Leipzig
C2	380/00		E	Leipzig
D2	731/01		E	Leipzig
E2	65/02		E	Leipzig
F2	635/01		D	Leipzig
G2	563/01		F	Leipzig
H2	455/01		D	Leipzig
A3	114/00		E	Leipzig
B3	TE			
C3	587/02		C	Leipzig
D3	638/99		E	Leipzig
E3	32/03		C	Leipzig
F3	513/04		G	Leipzig
G3	825/00		D	Leipzig
H3	689/98		E	Leipzig
A4	614/02		E	Leipzig
B4	828/01		D	Leipzig
C4	24/99		C	Leipzig
D4	10/03		D	Leipzig
E4	560/02		C	Leipzig
F4	563/99		D	Leipzig
G4	3		D	Münster
H4	5		D	Münster
A5	9		D	Münster
B5	25		D	Münster
C5	26		E	Münster
D5	34		D	Münster
E5	39		E	Münster
F5	41		G	Münster
G5	49		E	Münster
H5	50		D	Münster
A6	58		E	Münster
B6	59		D	Münster
C6	61		C	Münster
D6	65		D	Münster
E6	69		C	Münster
F6	90		E	Münster
G6	96		D	Münster
H6	102		D	Münster

	DNA#	ID	Risikogruppe	Zentrum
A7	104		D	Münster
B7	105		D	Münster
C7	107		D	Münster
D7	132		D	Münster
E7	136		D	Münster
F7	142		D	Münster
G7	144		D	Münster
H7	149		A	Münster
A8	160		D	Münster
B8	161		C	Münster
C8	167		D	Münster
D8	174		D	Münster
E8	176		C	Münster
F8	177		C	Münster
G8	195		D	Münster
H8	196		D	Münster
A9	206		D	Münster
B9	207		G	Münster
C9	211		D	Münster
D9	212		E	Münster
E9	214		D	Münster
F9	218		G	Münster
G9	219		D	Münster
H9	228		D	Münster
A10	232		D	Münster
B10	241		C	Münster
C10	244		E	Münster
D10	246		D	Münster
E10	247		B	Münster
F10	252		B	Münster
G10	255		E	Münster
H10	261		E	Münster
A11	264		C	Münster
B11	282		E	Münster
C11	283		E	Münster
D11	310		C	Münster
E11	311		G	Münster
F11	316		B	Münster
G11	TE			
H11	319		C	Münster
A12	320		D	Münster
B12	322		B	Münster
C12	329		G	Münster
D12	346		E	Münster
E12	357		D	Münster
F12	472		E	Münster
G12	473		C	Münster
H12	477		E	Münster

Tabelle: Proben für die Validierung von Niedrigrisikovarianten und ihre Lokalisation in den Platten (Fortsetzung)

	DNA#	ID	Risikogruppe	Zentrum
A1	383		D	Münster
B1	384		D	Münster
C1	385		B	Münster
D1	387		D	Münster
E1	389		F	Münster
F1	391		C	Münster
G1	394		C	Münster
H1	365		D	Münster
A2	366		D	Münster
B2	370		D	Münster
C2	395		B	Münster
D2	398		D	Münster
E2	403		C	Münster
F2	405		E	Münster
G2	414		D	Münster
H2	420		G	Münster
A3	423		G	Münster
B3	TE			
C3	436		G	Münster
D3	466		G	Münster
E3	467		E	Münster
F3	468		A	Münster
G3	471		D	Münster
H3	452 111		A	Ulm
A4	454 111		B	Ulm
B4	28001		C	Ulm
C4	95000		D	Ulm
D4	123000		D	Ulm
E4	134000		D	Ulm
F4	147000		D	Ulm
G4	150000		D	Ulm
H4	151001		D	Ulm
A5	167002		C	Ulm
B5	183000		D	Ulm
C5	185000		G	Ulm
D5	187000		D	Ulm
E5	189001		D	Ulm
F5	219000		D	Ulm
G5	223000		D	Ulm
H5	230000		D	Ulm
A6	240001		D	Ulm
B6	243001		D	Ulm
C6	251001		C	Ulm
D6	262001		D	Ulm
E6	265001		D	Ulm
F6	267001		D	Ulm
G6	277000		D	Ulm
H6	284001		D	Ulm

	DNA#	ID	Risikogruppe	Zentrum
A7	286000		C	Ulm
B7	289001		D	Ulm
C7	302001		D	Ulm
D7	305001		D	Ulm
E7	312000		D	Ulm
F7	327000		D	Ulm
G7	341000		D	Ulm
H7	346001		D	Ulm
A8	351000		D	Ulm
B8	352000		C	Ulm
C8	370001		D	Ulm
D8	375000		D	Ulm
E8	379000		D	Ulm
F8	394001		D	Ulm
G8	437111		D	Ulm
H8	471111		D	Ulm
A9	486003		D	Ulm
B9	508001		D	Ulm
C9	522001		C	Ulm
D9	529001		C	Ulm
E9	532001		D	Ulm
F9	533001		C	Ulm
G9	545001		D	Ulm
H9	548111		D	Ulm
A10	556001		D	Ulm
B10	TRI/47		D	Kiel
C10	TRII/42		D	Kiel
D10	TRI/63		D	Kiel
E10	TRIII/57		D	Kiel
F10	TRIV/44		C	Kiel
G10	TRXVII/29		D	Kiel
H10	TRXIV/27		G	Kiel
A11	TRXI/13		C	Kiel
B11	05-084-204		A	Würzburg
C11	05-086-101		G	Würzburg
D11	05-088-112		C	Würzburg
E11	05-100-101		A	Würzburg
F11	05-150-109		C	Würzburg
G11	TE			
H11	05-455-001		B	Würzburg
A12	05-944-106		C	Würzburg
B12	326.2		A	Köln
C12	439.1		A	Köln
D12	648.3		B	Köln
E12	913.1		A	Köln
F12	951.1		A	Köln
G12	465.3		A	Köln
H12	135.1		A	Köln

Tabelle: Proben für die Validierung von Niedrigrisikovarianten und ihre Lokalisation in den Platten (Fortsetzung)

	DNA#	ID	Risikogruppe	Zentrum
A1	TrXIII/36		A	Kiel
B1	TrXIV/03		B	Kiel
C1	TrXIV/20		B	Kiel
D1	TrII/17		A	Kiel
E1	TRXII/59		A	Kiel
F1	139.3		A	Köln
G1	71.2		A	Köln
H1	164.1		A	Köln
A2	106.4		A	Köln
B2	945.2		A	Köln
C2	863.6		A	Köln
D2	303.1		A	Köln
E2	417.2		A	Köln
F2	627.1		A	Köln
G2	133.2		A	Köln
H2	465.2		A	Köln
A3	20.1.		A	Köln
B3	TE			Köln
C3	863.1		A	Köln
D3	1034.2		A	Köln
E3	1007.1		A	Köln
F3	125.2		A	Köln
G3	753.2		A	Köln
H3	346.1		A	Köln
A4	159.1		A	Köln
B4	538.1		A	Köln
C4	583.1		A	Köln
D4	860.2		A	Köln
E4	344.2		A	Köln
F4	568.4		A	Köln
G4	727.3		A	Köln
H4	851.1		A	Köln
A5	969.3		A	Köln
B5	1162.1		A	Köln
C5	1348.1		A	Köln
D5	1478.2		A	Köln
E5	1298.7		A	Köln
F5	1398.2		A	Köln
G5	1643.2		A	Köln
H5	1334.1		A	Köln
A6	1613.1		A	Köln
B6	1175.1		A	Köln
C6	1149.1		A	Köln
D6	1471.3		A	Köln
E6	1226.1		A	Köln
F6	1386.1		A	Köln
G6	1439.1		A	Köln
H6	1156.1		A	Köln

	DNA#	ID	Risikogruppe	Zentrum
A7	1294.2		A	Köln
B7	1142.1		A	Köln
C7	1267.2		A	Köln
D7	1149.7		A	Köln
E7	1147.1		A	Köln
F7	1298.2		A	Köln
G7	1643.1		A	Köln
H7	1210.2		A	Köln
A8	1549.2		A	Köln
B8	1106.2		A	Köln
C8	1438.2		A	Köln
D8	1543.1		A	Köln
E8	1874.1		A	Köln
F8	1760.2		A	Köln
G8	1709.2		A	Köln
H8	1765.1		A	Köln
A9	1719.1		A	Köln
B9	1674.2		A	Köln
C9	1720.1		A	Köln
D9	1715.2		A	Köln
E9	1792.3		A	Köln
F9	1733.1		A	Köln
G9	1786.1		A	Köln
H9	1699.2		A	Köln
A10	1899.1		A	Köln
B10	1816.1		A	Köln
C10	1748.2		A	Köln
D10	1798.2		A	Köln
E10	1668.1		A	Köln
F10	1689.2		A	Köln
G10	1745.1		A	Köln
H10	1745.2		A	Köln
A11	1752.1		A	Köln
B11	25.2.		B	Köln
C11	47.2		B	Köln
D11	161.2		B	Köln
E11	165.4		B	Köln
F11	462.1		B	Köln
G11	TE			Köln
H11	646.1		B	Köln
A12	728.1		B	Köln
B12	839.1		B	Köln
C12	932.1		B	Köln
D12	985.1		B	Köln
E12	995.4		B	Köln
F12	1032.1		B	Köln
G12	1066.2		B	Köln
H12	1079.2		B	Köln

Tabelle: Proben für die Validierung von Niedrigrisikovarianten und ihre Lokalisation in den Platten (Fortsetzung)

	DNA#	ID	Risikogruppe	Zentrum
A1	1089.2		B	Köln
B1	1091.1		B	Köln
C1	1095.1		B	Köln
D1	1130.2		B	Köln
E1	1136.3		B	Köln
F1	1183.1		B	Köln
G1	1187.5		B	Köln
H1	1190.2		B	Köln
A2	1207.2		B	Köln
B2	1209.1		B	Köln
C2	1221.1		B	Köln
D2	1222.1		B	Köln
E2	1432.4		B	Köln
F2	1451.2		B	Köln
G2	1461.1		B	Köln
H2	1464.1		B	Köln
A3	1469.1		B	Köln
B3	TE			
C3	1665.2		B	Köln
D3	1797.1		B	Köln
E3	1731.2		B	Köln
F3	1867.2		B	Köln
G3	1897.2		B	Köln
H3	1982.1		B	Köln
A4	2053.1		B	Köln
B4	2119.1		B	Köln
C4	7.1.		C	Köln
D4	103.2		C	Köln
E4	123.2		C	Köln
F4	126.2		C	Köln
G4	130.1		C	Köln
H4	142.1		C	Köln
A5	145.2		C	Köln
B5	223.1		C	Köln
C5	263.1		C	Köln
D5	271.2		C	Köln
E5	299.3		C	Köln
F5	422.3		C	Köln
G5	430.1		C	Köln
H5	455.1		C	Köln
A6	585.1		C	Köln
B6	610.1		C	Köln
C6	638.1		C	Köln
D6	678.1		C	Köln
E6	680.1		C	Köln
F6	785.1		C	Köln
G6	864.1		C	Köln
H6	865.1		C	Köln

	DNA#	ID	Risikogruppe	Zentrum
A7	891.3		C	Köln
B7	905.3		C	Köln
C7	928.1		C	Köln
D7	965.2		C	Köln
E7	974.1		C	Köln
F7	976.2		C	Köln
G7	989.2		C	Köln
H7	997.1		C	Köln
A8	1059.1		C	Köln
B8	1125.1		C	Köln
C8	1144.2		C	Köln
D8	1154.1		C	Köln
E8	1249.1		C	Köln
F8	1276.3		C	Köln
G8	1292.2		C	Köln
H8	1302.2		C	Köln
A9	1305.1		C	Köln
B9	1316.1		C	Köln
C9	1345.2		C	Köln
D9	1365.7		C	Köln
E9	1369.2		C	Köln
F9	1371.1		C	Köln
G9	1420.2		C	Köln
H9	1436.1		C	Köln
A10	1442.1		C	Köln
B10	1462.2		C	Köln
C10	1477.2		C	Köln
D10	1503.1		C	Köln
E10	1647.3		C	Köln
F10	1661.1		C	Köln
G10	1686.1		C	Köln
H10	1696.1		C	Köln
A11	1711.2		C	Köln
B11	1713.2		C	Köln
C11	1725.1		C	Köln
D11	1736.2		C	Köln
E11	1747.1		C	Köln
F11	1749.1		C	Köln
G11	TE			
H11	1753.1		C	Köln
A12	1780.1		C	Köln
B12	1785.1		C	Köln
C12	1795.1		C	Köln
D12	1810.1		C	Köln
E12	1796.1		C	Köln
F12	1847.1		C	Köln
G12	1871.3		C	Köln
H12	1877.1		C	Köln

Tabelle: Proben für die Validierung von Niedrigrisikovarianten und ihre Lokalisation in den Platten (Fortsetzung)

	DNA#	ID	Risikogruppe	Zentrum
A1	10185		B	MUC
B1	10273		E	MUC
C1	11484		D	MUC
D1	12260		D	MUC
E1	14303		E	MUC
F1	14764		G	MUC
G1	16153		G	MUC
H1	17068		G	MUC
A2	17736		D	MUC
B2	17917		D	MUC
C2	18026		G	MUC
D2	18076		D	MUC
E2	18128		C	MUC
F2	18129		D	MUC
G2	18130		D	MUC
H2	18131		C	MUC
A3	18132		B	MUC
B3	TE			
C3	18133		G	MUC
D3	18136		G	MUC
E3	18139		E	MUC
F3	18230		G	MUC
G3	18231		B	MUC
H3	18232		G	MUC
A4	18299		D	MUC
B4	18567		C	MUC
C4	18588		C	MUC
D4	18795		G	MUC
E4	18881		D	MUC
F4	19004		B	MUC
G4	19016		D	MUC
H4	19046		B	MUC
A5	19053		E	MUC
B5	19210		B	MUC
C5	19221		E	MUC
D5	19447		A	MUC
E5	19674		E	MUC
F5	19679		A	MUC
G5	19780		D	MUC
H5	19795		A	MUC
A6	19840		C	MUC
B6	19846		E	MUC
C6	19847		A	MUC
D6	19851		B	MUC
E6	19856		A	MUC
F6	19867		E	MUC
G6	19899		A	MUC
H6	19901		A	MUC

	DNA#	ID	Risikogruppe	Zentrum
A7	20084		C	MUC
B7	20204		E	MUC
C7	20239		A	MUC
D7	20240		E	MUC
E7	20264		B	MUC
F7	20287		E	MUC
G7	20314		E	MUC
H7	20326		A	MUC
A8	20348		G	MUC
B8	20357		D	MUC
C8	20438		E	MUC
D8	20455		E	MUC
E8	20616		C	MUC
F8	20635		A	MUC
G8	20645		A	MUC
H8	20652		E	MUC
A9	20672		D	MUC
B9	20674		D	MUC
C9	20679		E	MUC
D9	20681		C	MUC
E9	20683		C	MUC
F9	20684		E	MUC
G9	20688		C	MUC
H9	20704		G	MUC
A10	20707		D	MUC
B10	20708		C	MUC
C10	20710		D	MUC
D10	20714		E	MUC
E10	20742		E	MUC
F10	20744		E	MUC
G10	20745		E	MUC
H10	20754		C	MUC
A11	20771		E	MUC
B11	20773		G	MUC
C11	20775		G	MUC
D11	20780		C	MUC
E11	20785		E	MUC
F11	20786		D	MUC
G11	TE			
H11	20788		E	MUC
A12	20792		E	MUC
B12	20794		G	MUC
C12	20797		E	MUC
D12	20798		E	MUC
E12	20804		C	MUC
F12	20828		E	MUC
G12	20829		G	MUC
H12	20850		D	MUC

Tabelle: Proben für die Validierung von Niedrigrisikovarianten und ihre Lokalisation in den Platten (Fortsetzung)

	DNA#	ID	Risikogruppe	Zentrum
A1	20853		G	MUC
B1	20858		D	MUC
C1	20862		E	MUC
D1	20866		D	MUC
E1	20882		D	MUC
F1	20892		E	MUC
G1	20910		D	MUC
H1	20911		D	MUC
A2	20933		E	MUC
B2	20955		E	MUC
C2	20972		E	MUC
D2	20975		G	MUC
E2	20985		C	MUC
F2	21003		G	MUC
G2	21007		E	MUC
H2	21011		B	MUC
A3	21012		E	MUC
B3	TE			
C3	21016		C	MUC
D3	21017		C	MUC
E3	21023		D	MUC
F3	21035		D	MUC
G3	21040		G	MUC
H3	21049		D	MUC
A4	21058		E	MUC
B4	21062		D	MUC
C4	21068		C	MUC
D4	21073		C	MUC
E4	21077		C	MUC
F4	21085		G	MUC
G4	21095		C	MUC
H4	21102		D	MUC
A5	21113		C	MUC
B5	21114		A	MUC
C5	21116		E	MUC
D5	21117		C	MUC
E5	21125		D	MUC
F5	21127		G	MUC
G5	21130		D	MUC
H5	21140		A	MUC
A6	21144		G	MUC
B6	21146		B	MUC
C6	21147		E	MUC
D6	21150		A	MUC
E6	21151		A	MUC
F6	21163		A	MUC
G6	21175		C	MUC
H6	21177		C	MUC

	DNA#	ID	Risikogruppe	Zentrum
A7	21180		B	MUC
B7	21182		E	MUC
C7	21183		C	MUC
D7	21189		D	MUC
E7	21193		D	MUC
F7	21197		A	MUC
G7	21198		E	MUC
H7	21205		D	MUC
A8	21206		B	MUC
B8	21213		A	MUC
C8	21214		A	MUC
D8	21222		C	MUC
E8	21246		A	MUC
F8	21272		E	MUC
G8	21278		D	MUC
H8	21279		B	MUC
A9	21282		C	MUC
B9	21283		C	MUC
C9	21291		B	MUC
D9	21295		C	MUC
E9	21296		C	MUC
F9	21307		E	MUC
G9	21314		E	MUC
H9	21323		B	MUC
A10	21329		D	MUC
B10	21331		C	MUC
C10	21332		B	MUC
D10	21336		C	MUC
E10	21345		E	MUC
F10	21353		D	MUC
G10	21356		E	MUC
H10	21362		D	MUC
A11	21363		E	MUC
B11	21366		A	MUC
C11	21369		D	MUC
D11	21379		D	MUC
E11	21383		C	MUC
F11	21386		A	MUC
G11	TE			
H11	21405		B	MUC
A12	21408		E	MUC
B12	21412		D	MUC
C12	21435		B	MUC
D12	21436		E	MUC
E12	21440		A	MUC
F12	21441		C	MUC
G12	21446		A	MUC
H12	21450		B	MUC

Tabelle: Proben für die Validierung von Niedrigrisikovarianten und ihre Lokalisation in den Platten (Fortsetzung)

	DNA#	ID	Risikogruppe	Zentrum
A1	21454		G	MUC
B1	21475		B	MUC
C1	21478		E	MUC
D1	21479		E	MUC
E1	21485		B	MUC
F1	21495		D	MUC
G1	21560		C	MUC
H1	21561		C	MUC
A2	21567		B	MUC
B2	21568		E	MUC
C2	21576		C	MUC
D2	21577		B	MUC
E2	21580		A	MUC
F2	21581		A	MUC
G2	21585		A	MUC
H2	21586		B	MUC
A3	21608		C	MUC
B3	TE			
C3	21615		B	MUC
D3	21626		G	MUC
E3	21649		A	MUC
F3	21660		A	MUC
G3	21663		A	MUC
H3	21688		D	MUC
A4	21700		C	MUC
B4	6676		C	MUC
C4	6821		G	MUC
D4	6866		C	MUC
E4	7044		C	MUC
F4	7285		C	MUC
G4	8580		A	MUC
H4	8818		D	MUC
A5	8846		A	MUC
B5	8849		E	MUC
C5	9243		G	MUC
D5	9244		B	MUC
E5	9804		E	MUC
F5	9889		G	MUC
G5	10095		B	MUC
H5	10125		D	MUC
A6	10483		G	MUC
B6	10631		G	MUC
C6	10632		C	MUC
D6	10949		C	MUC
E6	11295		B	MUC
F6	11344		D	MUC
G6	11963		D	MUC
H6	12054		G	MUC

	DNA#	ID	Risikogruppe	Zentrum
A7	12921		D	MUC
B7	13049		G	MUC
C7	13484		E	MUC
D7	13657		A	MUC
E7	13786		A	MUC
F7	13793		E	MUC
G7	13805		E	MUC
H7	13970		D	MUC
A8	14076		G	MUC
B8	14077		E	MUC
C8	14189		D	MUC
D8	14308		C	MUC
E8	14315		C	MUC
F8	14442		D	MUC
G8	14608		D	MUC
H8	14733		D	MUC
A9	15787		G	MUC
B9	15924		D	MUC
C9	16147		D	MUC
D9	16255		A	MUC
E9	16365		E	MUC
F9	16600		C	MUC
G9	16663		E	MUC
H9	16936		C	MUC
A10	17494		D	MUC
B10	18308		G	MUC
C10	18488		A	MUC
D10	18526		C	MUC
E10	18623		D	MUC
F10	18651		G	MUC
G10	18726		A	MUC
H10	18747		G	MUC
A11	18801		D	MUC
B11	18807		E	MUC
C11	18825		A	MUC
D11	18835		A	MUC
E11	18840		D	MUC
F11	18883		D	MUC
G11	TE			
H11	18898		D	MUC
A12	18905		E	MUC
B12	18985		E	MUC
C12	18993		E	MUC
D12	18995		C	MUC
E12	19007		A	MUC
F12	19067		C	MUC
G12	19069		A	MUC
H12	19181		G	MUC

Tabelle: Proben für die Validierung von Niedrigrisikovarianten und ihre Lokalisation in den Platten (Fortsetzung)

	DNA#	ID	Risikogruppe	Zentrum
A1	19190		E	MUC
B1	19195		C	MUC
C1	19202		D	MUC
D1	19267		D	MUC
E1	19376		E	MUC
F1	19388		C	MUC
G1	19389		E	MUC
H1	19394		G	MUC
A2	19398		E	MUC
B2	19402		E	MUC
C2	19404		E	MUC
D2	19405		E	MUC
E2	19407		D	MUC
F2	19417		G	MUC
G2	19426		D	MUC
H2	19433		D	MUC
A3	19438		E	MUC
B3	TE			
C3	19481		G	MUC
D3	19504		E	MUC
E3	19513		G	MUC
F3	19630		E	MUC
G3	19644		D	MUC
H3	19685		C	MUC
A4	19700		E	MUC
B4	19710		D	MUC
C4	19713		E	MUC
D4	19714		E	MUC
E4	19773		A	MUC
F4	19774		E	MUC
G4	19775		A	MUC
H4	19783		C	MUC
A5	19790		C	MUC
B5	19793		E	MUC
C5	19803		D	MUC
D5	19813		C	MUC
E5	19828		E	MUC
F5	19834		C	MUC
G5	19838		D	MUC
H5	19855		E	MUC
A6	19858		G	MUC
B6	19864		D	MUC
C6	19868		E	MUC
D6	19869		E	MUC
E6	19874		D	MUC
F6	19888		D	MUC
G6	19923		E	MUC
H6	19932		C	MUC

	DNA#	ID	Risikogruppe	Zentrum
A7	19941		G	MUC
B7	19996		G	MUC
C7	20025		G	MUC
D7	20026		D	MUC
E7	20030		C	MUC
F7	20050		G	MUC
G7	20072		D	MUC
H7	20085		G	MUC
A8	20093		E	MUC
B8	20094		D	MUC
C8	20097		E	MUC
D8	20101		D	MUC
E8	20103		D	MUC
F8	20104		C	MUC
G8	20106		E	MUC
H8	20107		E	MUC
A9	20110		C	MUC
B9	20111		C	MUC
C9	20115		C	MUC
D9	20140		E	MUC
E9	20142		C	MUC
F9	20157		E	MUC
G9	20202		C	MUC
H9	20241		E	MUC
A10	20262		G	MUC
B10	20265		E	MUC
C10	20271		D	MUC
D10	20278		E	MUC
E10	20284		D	MUC
F10	20309		G	MUC
G10	20312		C	MUC
H10	20313		E	MUC
A11	20321		C	MUC
B11	20325		B	MUC
C11	20331		D	MUC
D11	20342		G	MUC
E11	20349		E	MUC
F11	20350		C	MUC
G11	TE			
H11	20355		D	MUC
A12	20358		A	MUC
B12	20368		G	MUC
C12	20370		D	MUC
D12	20371		C	MUC
E12	20376		G	MUC
F12	20377		A	MUC
G12	20381		A	MUC
H12	20386		C	MUC

Tabelle: Proben für die Validierung von Niedrigrisikovarianten und ihre Lokalisation in den Platten (Fortsetzung)

	DNA#	ID	Risikogruppe	Zentrum
A1	660.2	09-0660-002	G	Köln
B1	850.1	09-0850-001	G	Köln
C1	944.1	09-0944-001	G	Köln
D1	992.1	09-0992-001	G	Köln
E1	1009.2	09-1009-002	G	Köln
F1	1049.2	09-1049-002	G	Köln
G1	1053.1	09-1053-001	G	Köln
H1	1160.1	09-1160-001	G	Köln
A2	1185.1	09-1185-001	G	Köln
B2	1247.1	09-1247-001	G	Köln
C2	1285.1	09-1285-001	G	Köln
D2	1315.1	09-1315-001	G	Köln
E2	1385.1	09-1385-001	G	Köln
F2	1399.1	09-1399-001	G	Köln
G2	1551.2	09-1551-002	G	Köln
H2	1570.1	09-1570-001	G	Köln
A3	1573.1	09-1573-001	G	Köln
B3	TE			
C3	1594.1	09-1594-001	G	Köln
D3	1595.1	09-1595-001	G	Köln
E3	1599.1	09-1599-001	G	Köln
F3	1608.1	09-1608-001	G	Köln
G3	1361.1	09-1631-001	G	Köln
H3	1640.1	09-1640-001	G	Köln
A4	1650.1	09-1650-001	G	Köln
B4	1659.1	09-1659-001	G	Köln
C4	1692.1	09-1692-001	G	Köln
D4	1735.1	09-1735-001	G	Köln
E4	1860.1	09-1860-001	G	Köln
F4	1946.1	09-1946-001	G	Köln
G4	2033.1	09-2033-001	G	Köln
H4	N1132/07	15-0312-405		Han
A5	N1920/07	15-0438-202		Han
B5	N1184/07	15-0376-401		Han
C5	N1518/06	15-0117-402		Han
D5	N1705/07	15-0406-302		Han
E5	N1210/07	15-0303-303		Han
F5	N1222/06	15-0100-202		Han
G5	N1515/07	15-0424-301		Han
H5	N1186/07	15-0517-301		Han
A6	N1822/06	15-0196-301		Han
B6	N915/07	15-0328-202		Han
C6	N1161/06	15-0135-801		Han
D6	N1801/06	15-0115-301		Han
E6	N1295/06	15-0145-301		Han
F6	N1333/06	15-0160-301		Han
G6	N1001/07	15-0557-301		Han
H6	N1690/07	15-0412-301		Han

	DNA#	ID	Risikogruppe	Zentrum
A7	N1160/06	15-0113-203		Han
B7	N1331/06	15-0132-302		Han
C7	N1024/07	15-0114-303		Han
D7	N1743/06	15-0158-301		Han
E7	N748/07	15-0283-303		Han
F7	N1069/07	15-0324-302		Han
G7	N991/06	15-0120-302		Han
H7	N1044/06	15-0140-301		Han
A8	N841/06	15-0094-001		Han
B8	N1094/07	15-0326-401		Han
C8	N805/07	15-0200-405		Han
D8	N1023/07	15-0282-401		Han
E8	N2104/06	15-0223-202		Han
F8	N1282/07	15-0384-302		Han
G8	N1073/06	15-0109-301		Han
H8	N1261/07	15-0308-402		Han
A9	N1032/07	15-0375-301		Han
B9	N1473/07	15-0410-202		Han
C9	N611/07	15-0309-301		Han
D9	N1650/06	15-0114-302		Han
E9	N434/07	15-0281-201		Han
F9	N999/06	15-0103-022		Han
G9	N830/07	15-0041-001		Han
H9	N1263/06	15-0152-301		Han
A10	N1786/07	15-0432-502		Han
B10	N1068/07	15-0268-301		Han
C10	N1240/07	15-0355-301		Han
D10	N2030/06	15-0129-301		Han
E10	N1181/07	15-0199-401		Han
F10	N418/07	15-0279-301		Han
G10	N435/07	15-0295-302		Han
H10	N1330/06	15-0147-201		Han
A11	N1015/07	15-0305-306		Han
B11	N2000/06	15-0558-301		Han
C11	N1211/07	15-0303-305		Han
D11	N1771/06	15-0167-301		Han
E11	1889.1	09-1889-001	C	Köln
F11	1903.2	09-1903-002	C	Köln
G11	TE			
H11	2118.1	09-2118-001	C	Köln
A12	20567		A	MUC
B12	20586		C	MUC
C12	20301		D	MUC
D12	20602		D	MUC
E12	20605		D	MUC
F12	20607		E	MUC
G12	20612		C	MUC
H12	20836		G	MUC

Tabelle: Proben für die Validierung von Niedrigrisikovarianten und ihre Lokalisation in den Platten (Fortsetzung)

	DNA#	ID	Risikogruppe	Zentrum
A1	1075	03-0052-001	E	Dres
B1	1144		E	Dres
C1	1265	03-0439-002	E	Dres
D1	1227	03-0016-001	E	Dres
E1	1038	03-0061-001	E	Dres
F1	1073	03-0120-202	E	Dres
G1	1084	03-0266-201	E	Dres
H1	1096	03-0291-001	E	Dres
A2	1117	03-0304-001	E	Dres
B2	1120	03-0325-001	E	Dres
C2	1121	03-0331-001	E	Dres
D2	1152	03-0106-106	E	Dres
E2	1155	03-0368-001	E	Dres
F2	1114	03-0377-001	E	Dres
G2	1187	03-0393-001	E	Dres
H2	1197	03-0023-001	E	Dres
A3	1266	03-0438-001	E	Dres
B3	TE			
C3	1268	03-0441-001	E	Dres
D3	1335	03-0489-001	E	Dres
E3	1337	03-0493-001	E	Dres
F3	1345	03-0477-001	E	Dres
G3	1346	03-0500-105	E	Dres
H3	1353	03-0501-101	E	Dres
A4	1383	03-0533-001	E	Dres
B4	1388	03-0531-101	E	Dres
C4	1403	03-0527-001	E	Dres
D4	1448	03-0567-001	E	Dres
E4	1449	03-0568-101	E	Dres
F4	1453	03-0573-001	E	Dres
G4	1514	03-0585-001	A	Dres
H4	1519	03-0608-001	A	Dres
A5	1530	03-0610-001	A	Dres
B5	1517	03-0603-001	B	Dres
C5	1521	03-0602-001	B	Dres
D5	1747	03-0583-001	C	Dres
E5	1484	03-0599-001	C	Dres
F5	1016	03-0009-001	D	Dres
G5	1257	03-0426-001	D	Dres
H5	1260	03-0437-002	D	Dres
A6	1261	03-0434-001	D	Dres
B6	1294	03-0410-001	D	Dres
C6	1325	03-0446-202	D	Dres
D6	1329	03-0479-001	D	Dres
E6	1343	03-0478-001	D	Dres
F6	1349	03-0504-001	D	Dres
G6	1360	03-0512-001	D	Dres
H6	1374	03-0513-001	D	Dres

	DNA#	ID	Risikogruppe	Zentrum
A7	1379	03-0528-301	D	Dres
B7	1386	03-0529-003	D	Dres
C7	1390	03-0537-001	D	Dres
D7	1395	03-0543-001	D	Dres
E7	1400	03-0547-001	D	Dres
F7	1401	03-0549-001	D	Dres
G7	1406	03-0551-001	D	Dres
H7	1439	03-0566-001	D	Dres
A8	1443	03-0535-001	D	Dres
B8	1456	03-0574-001	D	Dres
C8	1466	03-0581-001	D	Dres
D8	1496	03-0593-001	D	Dres
E8	1504	03-0589-001	D	Dres
F8	1507	03-0600-101	D	Dres
G8	1515	03-0590-001	D	Dres
H8	1326	03-0448-201	G	Dres
A9	1348	03-0485-001	G	Dres
B9	1459	03-0579-001	G	Dres
C9	1487	03-0591-101	G	Dres
D9	1494	03-0593-001	G	Dres
E9	1567	03-0627-001	A	Dres
F9	1572	03-0621-001	B	Dres
G9	1565	03-0611-001	C	Dres
H9	1571	03-0506-001	C	Dres
A10	1574	03-0629-001	C	Dres
B10	1559	03-0619-001	E	Dres
C10	1566	03-0626-001	E	Dres
D10	658001	06-0658-001	A	Ulm
E10	667001	06-0667-001	A	Ulm
F10	673008	06-0673-008	A	Ulm
G10	682001	06-0682-001	A	Ulm
H10	701001	06-0701-001	A	Ulm
A11	706001	06-0706-001	A	Ulm
B11	715001	06-0715-001	A	Ulm
C11	725002	06-0725-002	A	Ulm
D11	733001	06-0733-001	A	Ulm
E11	742001	06-0742-001	A	Ulm
F11	744001	06-0744-001	A	Ulm
G11	TE			
H11	724001	06-0724-001	B	Ulm
A12	745001	06-0745-001	B	Ulm
B12	768001	06-0768-001	B	Ulm
C12	592001	06-0592-001	C	Ulm
D12	603001	06-0603-001	C	Ulm
E12	604001	06-0604-001	C	Ulm
F12	661001	06-0661-001	C	Ulm
G12	681001	06-0681-001	C	Ulm
H12	699001	06-0699-001	C	Ulm

Tabelle: Proben für die Validierung von Niedrigrisikovarianten und ihre Lokalisation in den Platten (Fortsetzung)

	DNA#	ID	Risikogruppe	Zentrum
A1	750001	06-0750-001	C	Ulm
B1	565001	06-0565-001	D	Ulm
C1	567001	06-0567-001	D	Ulm
D1	593001	06-0593-001	D	Ulm
E1	616001	06-0616-001	D	Ulm
F1	625001	06-0625-001	D	Ulm
G1	637001	06-0637-001	D	Ulm
H1	653001	06-0653-001	D	Ulm
A2	669001	06-0669-001	D	Ulm
B2	687001	06-0687-001	D	Ulm
C2	694001	06-0694-001	D	Ulm
D2	702001	06-0702-001	D	Ulm
E2	719001	06-0719-001	D	Ulm
F2	734001	06-0734-001	D	Ulm
G2	736001	06-0736-001	D	Ulm
H2	737001	06-0737-001	D	Ulm
A3	746001	06-0746-001	D	Ulm
B3	TE			
C3	747004	06-0747-004	D	Ulm
D3	749039	06-0749-039	D	Ulm
E3	752001	06-0752-001	D	Ulm
F3	672001	06-0672-001	E	Ulm
G3	688002	06-0688-002	E	Ulm
H3	711001	06-0711-001	E	Ulm
A4	740001	06-0740-001	E	Ulm
B4	634001	06-0634-001	G	Ulm
C4	124000	06-0124-000	E	Ulm
D4	130000	06-0130-000	E	Ulm
E4	158000	06-0158-000	E	Ulm
F4	163001	06-0163-001	E	Ulm
G4	164001	06-0164-001	E	Ulm
H4	168001	06-0168-001	E	Ulm
A5	235000	06-0235-000	E	Ulm
B5	239001	06-0239-001	E	Ulm
C5	260000	06-0260-000	E	Ulm
D5	275000	06-0275-000	E	Ulm
E5	275001	06-0275-001	E	Ulm
F5	279001	06-0279-001	E	Ulm
G5	283001	06-0283-001	E	Ulm
H5	303001	06-0303-001	E	Ulm
A6	303002	06-0303-002	E	Ulm
B6	313001	06-0313-001	E	Ulm
C6	323000	06-0232-000	E	Ulm
D6	340000	06-0340-000	E	Ulm
E6	349001	06-0349-001	E	Ulm
F6	445111	06-0445-111	E	Ulm
G6	488001	06-0488-001	E	Ulm
H6	495001	06-0495-001	E	Ulm

	DNA#	ID	Risikogruppe	Zentrum
A7	503001	06-0503-001	E	Ulm
B7	504001	06-0504-001	E	Ulm
C7	523001	06-0532-001	E	Ulm
D7	538001	06-0538-001	E	Ulm
E7	563001	06-0563-001	E	Ulm
F7	571001	06-0571-001	E	Ulm
G7	572111	06-0572-111	E	Ulm
H7	577001	06-0577-001	E	Ulm
A8	580001	06-0580-001	E	Ulm
B8	584001	06-0584-001	E	Ulm
C8	600001	06-0600-001	E	Ulm
D8	606001	06-0606-001	E	Ulm
E8	610001	06-0610-001	E	Ulm
F8	644001	06-0644-001	E	Ulm
G8	668001	06-0668-001	A	Ulm
H8	1	15-0005-001	B	Han
A9	2	15-0006-002	E	Han
B9	3	15-0007-002	B	Han
C9	8	15-0019-002	C	Han
D9	9	15-0020-002	D	Han
E9	10	15-0022-001	B	Han
F9	13	15-0027-001	A	Han
G9	15	15-0029-002	C	Han
H9	22	15-0059-001	C	Han
A10	39	15-0091-001	G	Han
B10	43	15-0098-001	A	Han
C10	44	15-0111-301	A	Han
D10	45	15-0119-301	D	Han
E10	47	15-0123-303	D	Han
F10	59	15-0301-202	E	Han
G10	60	15-0302-402	E	Han
H10	61	15-0331-402	D	Han
A11	62	15-0403-301	D	Han
B11	63	15-0430-301	B	Han
C11	64	15-0450-304	E	Han
D11	65	15-0530-301	E	Han
E11	14541		B	Berlin
F11	14546		A	Berlin
G11	TE			
H11	14566		A	Berlin
A12	14576		A	Berlin
B12	14602		B	Berlin
C12	14629		A	Berlin
D12	14631		B	Berlin
E12	14632		A	Berlin
F12	595	11-0954-407	A	Münster
G12	596	11-0958-313	B	Münster
H12	598	11-0961-406	B	Münster

Tabelle: Proben für die Validierung von Niedrigrisikovarianten und ihre Lokalisation in den Platten (Fortsetzung)

	DNA#	ID	Risikogruppe	Zentrum
A1	599	11-0962-405	A	Münster
B1	601	11-0965-308	A	Münster
C1	604	11-0438-311	A	Münster
D1	605	11-0967-207	B	Münster
E1	608	11-0973-401	A	Münster
F1	609	11-0974-000	B	Münster
G1	627	11-0978-304	B	Münster
H1	639	11-0979-208	B	Münster
A2	646	11-1009-000	A	Münster
B2	44.3	10-0044-003	E	Düdo
C2	45.2	10-0045-002	E	Düdo
D2	88.9	10-0088-009	E	Düdo
E2	89.1	10-0089-001	E	Düdo
F2	91.3	10-0091-003	E	Düdo
G2	128.1	10-0128-001	E	Düdo
H2	135.3	10-0135-003	E	Düdo
A3	141.3	10-0141-003	E	Düdo
B3	TE			
C3	149.1	10-0149-001	E	Düdo
D3	159.1	10-0159-001	E	Düdo
E3	175.8	10-0175-008	E	Düdo
F3	194.3	10-0194-003	E	Düdo
G3	249.1	10-0249-001	E	Düdo
H3	267.1	10-0267-001	E	Düdo
A4	295.3	10-0295-003	E	Düdo
B4	306.1	10-0306-001	E	Düdo
C4	307.9	10-0307-009	E	Düdo
D4	313.3	10-0313-003	E	Düdo
E4	319.1	10-0319-001	E	Düdo
F4	322.3	10-0322-003	E	Düdo
G4	323.3	10-0323-003	E	Düdo
H4	346.3	10-0346-003	E	Düdo
A5	364.1	10-0364-001	E	Düdo
B5	367.1	10-0367-001	E	Düdo
C5	381.1	10-0381-001	E	Düdo
D5	384.1	10-0384-001	E	Düdo
E5	411.1	10-0411-001	E	Düdo
F5	428.1	10-0428-001	E	Düdo
G5	435.1	10-0435-001	E	Düdo
H5	458.3	10-0458-003	E	Düdo
A6	460.15	10-0460-015	E	Düdo
B6	469.1	10-0469-001	E	Düdo
C6	470.3	10-0470-003	E	Düdo
D6	486.1	10-0486-001	E	Düdo
E6	495.15	10-0495-015	E	Düdo
F6	520.8	10-0520-008	E	Düdo
G6	545.7	10-0545-007	E	Düdo
H6	571.1	10-0571-001	E	Düdo

	DNA#	ID	Risikogruppe	Zentrum
A7	599.1	10-0599-001	E	Düdo
B7	638.1	10-0638-001	E	Düdo
C7	641.1	10-0641-001	E	Düdo
D7	645.45	10-0645-045	E	Düdo
E7	651.8	10-0651-008	E	Düdo
F7	651.17	10-0651-017	E	Düdo
G7	654.1	10-0654-001	E	Düdo
H7	668.3	10-0668-003	E	Düdo
A8	671.1	10-0671-001	E	Düdo
B8	686.1	10-0686-001	E	Düdo
C8	688.1	10-0688-001	E	Düdo
D8	690.1	10-0690-001	E	Düdo
E8	694.1	10-0694-001	E	Düdo
F8	722.2	10-0722-002	E	Düdo
G8	734.1	10-0734-001	E	Düdo
H8	760.22	10-0760-022	E	Düdo
A9	767.12	10-0767-012	E	Düdo
B9	771.3	10-0771-003	E	Düdo
C9	778.1	10-0778-001	E	Düdo
D9	785.1	10-0785-001	E	Düdo
E9	810.1	10-0810-001	E	Düdo
F9	825.1	10-0825-001	E	Düdo
G9	27.1	10-0027-001	C	Düdo
H9	38.1	10-0038-001	C	Düdo
A10	127.8	10-0127-008	C	Düdo
B10	150.1	10-0150-001	C	Düdo
C10	633.8	10-0633-008	C	Düdo
D10	706.1	10-0706-001	C	Düdo
E10	725.1	10-0725-001	C	Düdo
F10	743.1	10-0743-001	C	Düdo
G10	773.1	10-0773-001	C	Düdo
H10	797.1	10-0797-001	C	Düdo
A11	837.3	10-0837-003	C	Düdo
B11	840.3	10-0840-003	C	Düdo
C11	877.3	10-0877-003	C	Düdo
D11	800.1	10-0800-001	A	Düdo
E11	805.1	10-0805-001	A	Düdo
F11	819.1	10-0819-001	A	Düdo
G11	TE			
H11	820.1	10-0820-001	A	Düdo
A12	826.1	10-0826-001	A	Düdo
B12	832.3	10-0832003	A	Düdo
C12	876.3	10-0876-003	A	Düdo
D12	884.3	10-0884-003	A	Düdo
E12	886.1	10-0886-001	A	Düdo
F12	779.3	10-0779-003	B	Düdo
G12	783.3	10-0783-003	B	Düdo
H12	798.1	10-0798-001	B	Düdo

Tabelle: Proben für die Validierung von Niedrigrisikovarianten und ihre Lokalisation in den Platten (Fortsetzung)

	DNA#	ID	Risikogruppe	Zentrum
A1	808.12	10-0808-012	B	Düdo
B1	784.7	10-0784-007	B	Düdo
C1	822.8	10-0822-008	B	Düdo
D1	833.3	10-0833-003	B	Düdo
E1	776.1	10-0776-001	B	Düdo
F1	860.3	10-0860-003	B	Düdo
G1	865.1	10-0865-001	B	Düdo
H1	872.12	10-0872-012	B	Düdo
A2	881.1	10-0881-001	B	Düdo
B2	842.1	10-0842-001	B	Düdo
C2	885.1	10-0885-001	B	Düdo
D2	05-0111-113	05-0111-113	B	Würz
E2	05-0163-003	05-0163-003	G	Würz
F2	05-0172-210	05-0172-210	E	Würz
G2	05-0175-102	05-0175-102	B	Würz
H2	05-0184-111	05-0184-111	E	Würz
A3	05-0187-210	05-0187-210	E	Würz
B3	TE			
C3	05-0189-202	05-0189-202	C	Würz
D3	05-0192-102	05-0192-102	G	Würz
E3	05-0193-009	05-0193-009	A	Würz
F3	05-0194-102	05-0194-102	B	Würz
G3	05-0196-103	05-0196-103	D	Würz
H3	05-0197-103	05-0197-103	D	Würz
A4	05-0198-123	05-0198-123	D	Würz
B4	05-0221-102	05-0221-102	G	Würz
C4	05-0240-104	05-0240-104	B	Würz
D4	05-0241-204	05-0241-204	B	Würz
E4	05-0256-310	05-0256-310	F	Würz
F4	05-0258-104	05-0258-104	D	Würz
G4	05-0262-102	05-0262-102	D	Würz
H4	05-0263-304	05-0263-304	D	Würz
A5	05-0265-102	05-0265-102	D	Würz
B5	05-0266-007	05-0266-007	E	Würz
C5	05-0267-205	05-0267-205	E	Würz
D5	05-0268-202	05-0268-202	C	Würz
E5	05-0269-210	05-0269-210	B	Würz
F5	05-0270-204	05-0270-204	B	Würz
G5	05-0280-204	05-0280-204	D	Würz
H5	05-0286-208	05-0286-208	D	Würz
A6	05-0289-106	05-0289-106	B	Würz
B6	05-0291-204	05-0291-204	E	Würz
C6	05-0297-203	05-0297-203	B	Würz
D6	05-0298-206	05-0298-206	B	Würz
E6	05-0307-120	05-0307-120	A	Würz
F6	05-0311-305	05-0311-305	C	Würz
G6	05-0369-118	05-0369-118	A	Würz
H6	05-0373-102	05-0373-102	D	Würz

	DNA#	ID	Risikogruppe	Zentrum
A7	05-0375-209	05-0375-209	B	Würz
B7	05-0333-106	05-0333-106	A	Würz
C7	05-0376-320	05-0376-320	D	Würz
D7	05-0382-102	05-0382-102	D	Würz
E7	05-0385-202	05-0385-202	D	Würz
F7	05-0388-104	05-0388-104	B	Würz
G7	05-0390-107	05-0390-107	B	Würz
H7	05-0392-203	05-0392-203	D	Würz
A8	05-0394-206	05-0394-206	A	Würz
B8	B8349A	07-3069-001	E	HD
C8	B7163A	07-2894-001	E	HD
D8	B8371D	07-3071-003	E	HD
E8	B11618A	07-3338-001	E	HD
F8	B8371A	07-3071-000	E	HD
G8	B12041A	07-000A-000	E	HD
H8	B14352A	07-3307-003	E	HD
A9	B10206A	07-3203-001	E	HD
B9	B9180B	07-000B-000	E	HD
C9	B7265A	07-3016-101	E	HD
D9	B7273A	07-2997-003	E	HD
E9	B9530A	07-3166-001	E	HD
F9	B13642A	07-3560-001	E	HD
G9	B13690A	07-3570-001	E	HD
H9	B13577A	07-3546-001	E	HD
A10	B12678A	07-3446-001	E	HD
B10	B13787A	07-000C-000	E	HD
C10	B8709A	07-000D-000	E	HD
D10	B8675A	07-000E-000	E	HD
E10	B13640A	07-3544-101	E	HD
F10	B13647B	07-3518-101	E	HD
G10	B13051A	07-3448-001	E	HD
H10	B10375C	07-3231-001	E	HD
A11	B13536A	07-3551-001	E	HD
B11	4.2	09-0004-002	D	Köln
C11	11.1	09-0011-001	D	Köln
D11	28.1	09-0028-001	D	Köln
E11	41.1	09-0041-001	D	Köln
F11	46.2	09-0046-002	D	Köln
G11	TE			
H11	63.2	09-0063-002	D	Köln
A12	67.1	09-0067-001	D	Köln
B12	104.3	09-0104-003	D	Köln
C12	111.2	09-0111-002	D	Köln
D12	118.2	09-0118-002	D	Köln
E12	154.2	09-0154-002	D	Köln
F12	186.1	09-0186-001	D	Köln
G12	197.2	09-0197-002	D	Köln
H12	202.1	08-0202-001	D	Köln

Tabelle: Proben für die Validierung von Niedrigrisikovarianten und ihre Lokalisation in den Platten (Fortsetzung)

Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1.1: Anteil erblich bedingter Mammakarzinome an der Gesamtzahl aller Brustkrebsfälle (Meindl 2010)	9
Abbildung 1.2: Kumulatives Brust- und Eierstockkrebsrisiko bei Trägerinnen von <i>BRCA1</i> - und <i>BRCA2</i> - Mutationen im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung (Janni 2007; Bauerfeind 2011)	11
Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Prinzips der Polymerase Kettenreaktion	22
Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Sequenzierung durch die Methode des Kettenabbruchs nach Sanger	25
Abbildung 2.3: Prinzip der Sequenzermittlung durch die Kapillarelektrophorese von fluoreszenzmarkierten DNS-Bruchstücken	27
Abbildung 2.4: Prinzip der Herstellung von allelspezifisch unterschiedlich langen Fragmenten.....	28
Abbildung 3.1: Darstellung des Gens <i>LSP1</i> , sowie den beiden SNPs rs2271439 und rs3817198	34
Abbildung 3.2: LD-Blocks im Bereich des untersuchten Gens <i>LSP1</i>	35
Abbildung 3.3: LD-Blocks im Bereich des untersuchten Gens <i>LSP1</i>	36
Abbildung 3.4: Relative Genotypenhäufigkeit im SNP rs2271439	36
Abbildung 3.5: Allelfrequenzen im SNP rs2271439	37
Abbildung 3.6: Relative Genotypenhäufigkeiten für die untersuchte Risikovariante in der Metaanalyse.....	38
Abbildung 3.7: Allelfrequenzen für die untersuchte Risikovariante in der Metaanalyse	39
Abbildung 4.1: Die SNPs welche eine Assoziation mit dem Brustkrebsrisiko zeigen und ihre Lage im Genom.....	58
Abbildung 4.2: Expression des Gens <i>LSP1</i> in unterschiedlichen Geweben.....	59

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1.1: Erhöhung des relativen Brustkrebsrisikos bei heterozygoten Defekten in nicht familiärem Kontext	14
Tabelle 1.2: Bisher identifizierte Niedrigrisikovarianten mit dem Gen, bzw. Genort in welchem sie liegen	15
Tabelle 2.1: Kriterien für die Einteilung der Fälle in die Risikogruppen A bis I	20
Tabelle 2.2: Verwendete Chemikalien	20
Tabelle 2.3: Liste der für die PCR und Sequenzierung der Exons des Gens <i>LSP1</i> verwendeten Primer, ihre Sequenz, sowie ihre Schmelztemperatur	23
Tabelle 2.4: Reaktionsansatz zur Durchführung einer PCR	24
Tabelle 2.5: Ablauf des Thermocyclings	24
Tabelle 2.6: Reaktionsansatz für die Sequenzierung mit Hilfe der Kettenabbruchmethode nach Sanger	26
Tabelle 2.7: Ablauf des Thermocyclings bei der Sequenzierung nach Sanger	26
Tabelle 2.8: Anzahl, Risikogruppe und Herkunft der Proben für die <i>LSP1</i> -Einzelgenotypisierung	29
Tabelle 2.9: Übersicht über die Proben für die <i>LSP1</i> -Metaanalyse	30
Tabelle 2.10: Herkunft und Risikokategorie der Proben für die zweite Validierung	31
Tabelle 2.11: Probennummer der Proben für die Sequenzierung der Exons des Gens <i>LSP1</i> und ihr Genotyp im SNP rs2271439	31
Tabelle 3.1: Absolute Genotypenhäufigkeit im SNP rs2271439	36
Tabelle 3.2: Häufigkeiten der einzelnen Genotypen in rs2271439 in den verschiedenen Studien	37
Tabelle 3.3: Statische Tests zur Berechnung der Abweichung vom Hardy-Weinberg-Equilibrium für die Gesamtheit der Fälle des GC-HBOC	39
Tabelle 3.4: Statistische Berechnung der Assoziation des Risikoallels C im SNP rs2271439 mit dem Brustkrebsrisiko für alle Fälle des GC-HBOC	40
Tabelle 3.5: Statistische Tests zur Berechnung der Abweichung vom Hardy-Weinberg-Equilibrium für die Fälle der Hochrisikogruppen A und B	42
Tabelle 3.6: Statistische Berechnung der Assoziation des Risikoallels C im SNP rs2271439 mit dem Brustkrebsrisiko für die Fälle der Hochrisikogruppen A und B	42

Tabelle 3.7: Ergebnisse der zweiten Validierung: SNPs, Gene und Odds Ratio von unterschiedlichen Risikovarianten	46
Tabelle 3.8: Ergebnisse der Sequenzierung der Exons des Gens <i>LSP1</i>	50
Tabelle 4.1: Statistische Berechnung der Assoziation des Risikoallels A im SNP rs2271439 mit dem Brustkrebsrisiko für alle Fälle des CGEMS.....	55
Tabelle 4.2: Bekannte Genorte und SNPs, welche mit einer Risikoerhöhung fürs Mammakarzinom assoziiert sind	64
Tabelle 4.3: Liste der an der COGS teilnehmenden Institute.....	67

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Alfons Meindl für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Untersuchungsmaterials. Ohne seine unendliche Geduld, seine Ideen, Hilfestellungen und seine Betreuung wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen. Ich danke allen MitarbeiterInnen der Gynäkologischen Tumorgenetik für ihre Hilfsbereitschaft, Freundlichkeit und Geduld, besonders Heide Hellebrand, Stefanie Engert, Marco Bertone, Tanja Hammerbacher, Juliane Volkmann und Claus Lenski. Herrn Prof. Dr. Bertram Müller-Myhsok von der Arbeitsgruppe Statistische Genetik vom Max-Planck-Institut für Psychiatrie danke ich für die statistische Auswertung und die Beratung zu allen statistischen Fragen. Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Dr. Peter Lichtner vom Institut für Humangenetik im Helmholtzzentrum. Des Weiteren danke ich allen MitarbeiterInnen an den verschiedenen Projekten, an welche ich im Rahmen dieser Arbeit beteiligt war. Mein herzlicher Dank gilt natürlich auch meiner Familie, meinem Freund und all meinen Freunden welche die ganze Zeit für mich da waren und mich in jeder Hinsicht tatkräftig unterstützt haben.