



Technische Universität München  
Fakultät für Medizin

**Validierung neuer Kandidatengene bei familiärem Brustkrebs  
in *BRCA1/2*-negativen Familien liefert Hinweis auf  
digene Vererbung**

Janina Viktoria Fritzemeyer

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

Vorsitz: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer\*innen der Dissertation:

1. Prof. Dr. Alfons Meindl
2. Prof. Dr. Marion B. Kiechle

Die Dissertation wurde am 28.01.2021 bei der Technischen Universität  
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 14.07.2021  
angenommen.

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ACLP	Aortic carboxypeptidase-like protein
AEBP1	Adipocyte enhancer binding protein 1
BMI	Body Mass Index
BRCA 1	Breast Cancer 1
BRCA 2	Breast Cancer 2
C	Cytosin
cDNA	Complementary DNA = komplementäre DNS
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ddNTP	Didesoxyribonukleotid
dNTP	Desoxyribonukleotid
DHPLC	Denaturierende Hochdruckflüssigkeitschromatographie
ED	Erstdiagnose
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ESP	Exome sequencing project
G	Guanin
H <sub>2</sub> O	Wasser
LOF	Loss of function
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
mRNA	Messenger RNA
NF-κB	Nuclear factor kappa B
NHBLI	National Heart, Blood and Lung Institute
nsSNP	Non synonymous single nucleotide polymorphism
PCR	Polymerase chain reaction = Polymerasekettenreaktion
PRS	Polygenic Risk Score
PTEN	Phosphatase and tensin homolog deleted in chromosome ten
RNA	Ribonucleic acid
RNS	Ribonukleinsäure
SNP	Single nucleotide polymorphism
T	Thymin
VUS	Variants of unknown significance

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Das Mammakarzinom	6
1.2	Das familiäre Mammakarzinom	7
1.3	Ermittlung von Kandidatengen des erblichen Mammakarzinoms mittels Exomsequenzierung	8
1.4	Fragestellungen	9
1.5	Das Kandidatengen <i>AEBP1</i>	11
1.5.1	Expression in unterschiedlichen Geweben	11
1.5.2	Funktion des Proteins <i>AEBP1</i>	12
1.5.2.1	Die Funktion von <i>AEBP1</i> bei der Brustdrüsenentwicklung	12
1.5.2.2	Die Rolle von <i>AEBP1</i> bei der Kommunikation zwischen Brustdrüsenepithel und Interstitium	13
1.5.2.3	<i>AEBP1</i> als Regulator der Brustdrüseninvolution	13
1.5.2.4	Wechselwirkung mit anderen Proteinen	14
1.5.2.5	<i>AEBP1</i> und <i>PTEN</i>	15
1.5.2.6	<i>AEBP1</i> als kritischer Faktor bei der Entstehung des Mammakarzinoms	15
2	Material und Methoden	17
2.1	Auswahl der Hochrisikofamilien und familienbasierte Exom- sequenzierung	17
2.2	Stammbäume der Familien	17
2.3	In Silico Analysen	17
2.3.1	Datenbankanalysen	17
2.3.2	Vorhersageprogramme	18
2.4	Chemikalien	19
2.5	Analysemethoden	19
2.5.1	Extraktion / Konzentrationsbestimmung genomischer DNS	19
2.5.2	Polymerasekettenreaktion (PCR)	19
2.5.2.1	Primerdesign	19
2.5.2.2	Verwendete Materialien	20
2.5.3	Thermocycling	20

2.5.3.1	Verwendete Materialien	20
2.5.3.2	Reaktionsansatz	21
2.5.3.3	Programm	21
2.5.4	Real-time quantitative PCR und High Resolution Melting	21
2.5.4.1	Primerdesign	22
2.5.4.2	Verwendete Materialien	22
2.5.4.3	Reaktionsansatz	22
2.5.4.4	Programm	23
2.5.4.5	Auswertung	23
2.5.5	Denaturierende Hochdruckflüssigkeitschromatographie (DHPLC)	24
2.5.5.1	Primerdesign	24
2.5.5.2	Verwendete Materialien	24
2.5.5.3	Reaktionsansatz	25
2.5.5.4	Thermocycling	25
2.5.5.5	DHPLC	25
2.5.5.6	Auswertung	26
2.6	RNA-Isolierung	26
2.6.1	Verwendete Materialien	26
3	Ergebnisse	28
3.1	Validierung von Kandidatengenen in 2 Hochrisiko-Familien	28
3.1.1	Ergebnisse der Validierung aus Familie 2	28
3.1.1.1	Ergebnisse der Vorhersageprogramme in Familie 2	28
3.1.1.2	Ergebnisse der Datenbankanalysen in Familie 2	29
3.1.1.3	Ergebnisse der Segregationsanalysen in Familie 2	31
3.1.2	Ergebnisse der Validierung aus Familie 19	33
3.1.2.1	Ergebnisse der Vorhersageprogramme in Familie 19	33
3.1.2.2	Ergebnisse der Datenbankanalysen in Familie 19	34
3.1.2.3	Ergebnisse der Segregationsanalysen in Familie 19	36
3.1.3	Ergebnisse der RNA-Isolierung	37
3.2	Kontrolle des Kandidatengens <i>AEBP1</i> in einem <i>BRCA1</i> / <i>BRCA2</i> -negativen Patientenkollektiv	38
3.2.1	Primerauswahl und Testung	38
3.2.2	Evaluierung der Methode am Beispiel <i>AEBP1</i>	38

3.2.3 Ergebnisse: Varianten und Mutationen	39
3.3 Weitere Mutationen im <i>ACTL7A</i> -Gen	42
4 Diskussion	43
4.1 Diskussion der Methoden	43
4.2 Eigene Daten	44
4.2.1 Auswahl der Kandidatengene	44
4.2.2 Nur fast vollständige Segregation von <i>AEBP1</i>	45
4.3 Weitere <i>AEBP1</i> -Mutationen in der Exom-Analyse	45
4.3.1 Ergebnisse der Exomsequenzierung: trunkierende und Missense – Mutationen im Gen <i>AEBP1</i>	45
4.3.2 Missense-Mutationen in den Vorhersageprogrammen	46
4.3.3 Einschätzung der trunkierenden Mutationen im Gen <i>AEBP1</i>	46
4.4 Das ko-segregierende Gen <i>ACTL7A</i>	47
4.4.1 Das Gen <i>ACTL7A</i>	47
4.4.2 Funktion des <i>ACTL7A</i> -Proteins	48
5 Zusammenfassung und Ausblick	50
Danksagung	51
Anhang	52
Abbildungsverzeichnis	61
Tabellenverzeichnis	62
Literaturverzeichnis	63

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist mit rund 70.000 Neuerkrankungen jährlich und einem prozentualen Anteil an allen Krebsneuerkrankungen von über 30% die mit Abstand häufigste Krebserkrankung der Frau in Deutschland. Aktuell erkrankt etwa eine von acht Frauen im Laufe Ihres Lebens an Brustkrebs, dabei sind fast drei von zehn betroffenen Frauen bei Diagnosestellung jünger als 55 Jahre (Robert-Koch-Institut, 2015). Für das Mammakarzinom sind zahlreiche Risikofaktoren bekannt: So sind eine frühe erste und eine späte letzte Regelblutung, Kinderlosigkeit oder ein höheres Alter bei der ersten Geburt mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko assoziiert, umgekehrt verringern frühe Geburten und Stillzeiten das Risiko, an einem Mammakarzinom zu erkranken (McPherson et al., 2000; Robert-Koch-Institut, 2015). Eine Hormonersatztherapie in und nach den Wechseljahren wird kontrovers diskutiert, es gilt jedoch vor allem die langjährige Einnahme von Hormonpräparaten und die Kombination von Östrogen und Gestagen als Risikofaktor für das Mammakarzinom (Foidart et al., 2007; Robert-Koch-Institut, 2015). Dagegen sind Übergewicht, ein erhöhter BMI und Bewegungsmangel als Risikofaktoren für Brustkrebs bei postmenopausalen Frauen eindeutig belegt (Robert-Koch-Institut, 2015; Swanson et al., 1989; van den Brandt et al., 2000). Auch regelmäßiger Alkoholkonsum stellt einen Risikofaktor dar (Robert-Koch-Institut, 2015; Smith-Warner et al., 1998). Beispielsweise erhöht der Konsum von 10 g Alkohol pro Tag das Brustkrebsrisiko um 4,2 % (Romieu et al., 2015). Ergebnisse einer neuen prospektiven Kohortenstudie weisen darauf hin, dass auch die vermehrte Einnahme von rotem, verarbeitetem Fleisch zu einem erhöhten Risiko für Brustkrebs bei postmenopausalen Frauen führt (Inoue-Choi et al., 2016). Daneben haben Frauen mit sehr dichtem Brustdrüsengewebe oder bestimmten gutartigen Brustveränderungen ein erhöhtes Risiko an einem Mammakarzinom zu erkranken. Eine familiäre Häufung von Brust- oder Eierstockkrebserkrankungen ist ebenfalls ein Risikofaktor (Robert-Koch-Institut, 2015), dabei steigt das individuelle Risiko, an einem Mammakarzinom zu erkranken proportional mit der Anzahl der betroffenen

Familienmitglieder und einem frühen Erkrankungsalter (Economopoulou et al., 2015).

## 1.2 Das familiäre Mammakarzinom

Das Mammakarzinom weist in etwa 20% der Fälle eine genetische Prädisposition auf, die sowohl mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko, als auch mit einem durchschnittlich früheren Ersterkrankungsbeginn einhergeht (Meindl et al., 2013). Dabei unterscheidet man hoch-penetrante von moderat- und niedrig-penetranten Genmutationen. Die am häufigsten veränderten hoch-penetranten Gene *BRCA1* und *BRCA2* sind bei ca. 20% der familiären und 5% aller Mammakarzinome mutiert und stellen Schlüsselgene in der DNS-Doppelstrangreparatur dar. Als mutierte Allele werden sie über einen monogenen Erbgang an 50% der Nachkommen vererbt (Meindl et al., 2011). Dabei ist die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer Mutation in einem dieser beiden Gene von bestimmten familiären Konstellationen abhängig, wie z.B. der Erkrankungshäufigkeit, dem Alter bei Ersterkrankung oder den betroffenen Organen wie Brust und Eierstock (Meindl et al., 2011). Eine Mutation in einem der beiden Gene ist mit einem hohen Lebenszeitrisiko von bis zu 60-85% für das Mammakarzinom und einem erhöhten Risiko für das Ovarialkarzinom assoziiert (Ripperger et al., 2009). Ein weiteres, aber eher moderat penetrantes Gen ist *RAD51C*, das aber bei weniger als 1% der familiären Mammakarzinome verändert ist. Es spielt wie auch *BRCA1* und *BRCA2* als Tumorsuppressorgen eine Rolle bei der DNA-Doppelstrang-Reparatur (Meindl et al., 2010). Als weitere moderate Risikogene wurden unter anderem *ATM*, *CHEK2* und *BARD1* und *PALB2* mit jeweils niedriger Heterozygotenfrequenz identifiziert. Eine Mutation in diesen Genen erhöht das Brustkrebsrisiko um das 1,5- bis 5-fache (Meindl et al., 2011). Unter den Niedrigrisikogenen finden sich z.B. die Gene *MAP3K1*, *FGFR2* oder *LSP1* mit einer 0,7- bis 1,5-fachen Risikomodifikation (Meindl et al., 2011).

In Hochrisikofamilien mit vielen jung an Brustkrebs erkrankten Frauen können jedoch in fast zwei Dritteln der belasteten Familien keine pathogenen Mutationen in den bekannten hoch- oder moderat penetranten Risikogenen nachge-

wiesen werden (Meindl et al., 2015). Dieser Anteil noch unbekannter Ursachen wird auch als „missing heritability“, also als „Erkenntnislücke erblicher Ursachen“ bezeichnet. Als Grund für diese Lücke wird eine sehr viel größere Anzahl an Varianten mit einem kleineren Effekt vermutet, die bisher noch nicht gefunden worden sind, sowie seltenere Varianten, die häufig von Gen-typisierenden Arrays nicht entdeckt werden, da diese sich auf Varianten konzentrieren, die in mindestens 5% der Bevölkerung vorkommen (Manolio et al., 2009). Weitere Ursachen liegen darin begründet, dass Gen-Gen-Interaktionen nur schwer zu beurteilen sind und dass dem Einfluss gemeinsamer Umweltfaktoren auf Verwandte nur unzureichend Rechnung getragen wird (Manolio et al., 2009). Es wird vermutet, dass das übrige familiäre Risiko durch ein Zusammenspiel verschiedener Genvarianten im Sinne eines polygenen oder multifaktoriellen Erbgangs bedingt ist (Meindl et al., 2015). Die Kombination einzelner Genvarianten, zusammengefasst in einem sogenannten Polygenic Risk Score (PRS), können das Brustkrebsrisiko erheblich erhöhen (Burton et al., 2013), (Hall et al., 2013). Für das Mammakarzinom sind mittlerweile einige PRS in Studien geprüft worden, wobei bei bestimmten Kombinationen das deutlich erhöhte Risiko, an Brustkrebs zu erkranken bestätigt wurde (Mavaddat et al., 2019), (Khera et al., 2018).

Zusammenfassend ist, wie bei den meisten komplexen Erkrankungen, zu erwarten, dass das individuelle Risiko, an einem Mammakarzinom zu erkranken, nicht von einer einzigen, sondern von einer Interaktion einiger oder sogar vieler genetischer Varianten, wie z.B. einem bestimmten Muster an Polymorphismen und Umweltfaktoren, wie Hormonen oder körperlichem Training abhängt (Ripperger et al., 2009).

### 1.3 Ermittlung von Kandidatengenen des erblichen Mammakarzinoms mittels Exomsequenzierung

Die Exomsequenzierung stellt eine Möglichkeit dar, der „missing heritability“ häufiger vorkommender, genetischer Erkrankungen auf die Spur zu kommen (Snape et al., 2012). Hierbei wird fast die gesamte proteinkodierende Region des menschlichen Genoms (Exom), bestehend aus ca. 20.000 Genen, auf Vari-



anten untersucht. Dabei sind zumindest ein paar tausend Gene innerhalb des Exoms aufgrund ihrer Rolle bei der Tumorentwicklung, der Zellteilung, der Apoptose, der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität oder ihrer Ähnlichkeit zu bekannten, krebsassoziierten Genen für weitere Untersuchungen in Betracht zu ziehen (Sokolenko et al., 2015). Bei der Exomsequenzierung werden die Exome der Patienten mit einem Referenzexom verglichen und Varianten herausgefiltert, die anschließend zum Beispiel in Segregationsanalysen validiert werden können. Bei der familienbasierten Exomsequenzierung werden die Exome von erkrankten Patienten aus einer Hochrisikofamilie verglichen und nach gemeinsamen Varianten gesucht (Ref. Helmholtz Zentrum, München, z.B. ALS). Bisherige Studien zu erblichen Formen des Mammakarzinoms basierten vor allem auf Stammbaumanalysen, die unter anderem zur Identifikation der bekannten hoch-penetranten Gene *BRCA1* und *BRCA2* führten. Eine andere Möglichkeit zur Identifikation neuer Brustkrebsgene stellt die Kandidatengenanalyse dar. Sie beinhaltet die Auswahl von Genen, bei denen eine Assoziation zur Krebsentstehung vermutet wird (z. B. rezessiv mutierte Gene bei Fanconi-Anämie). Angesichts der Tatsache, dass Kandidatengen-Studien bereits einige moderat-penetrante Gene, die eine Prädisposition für das Mammakarzinom darstellen, hervorgebracht haben, ist es sehr wahrscheinlich, dass weitere Gene dieser Art existieren. Diese sind jedoch weder durch Stammbaumanalysen identifizierbar, da das Risiko nicht hoch genug ist, noch durch genomweite Assoziationsstudien, da die Mutationen nicht häufig genug vorkommen. Durch eine geeignete Exomsequenzierung könnten solche Gene jedoch entdeckt werden (Snape et al., 2012).

#### 1.4 Fragestellungen

Ziel dieser Arbeit war es zunächst, in zwei Hochrisiko-Familien mit Brustkrebs-erkrankungen in mehreren Generationen ohne Mutationen in den bekannten Hochrisikogenen wie *BRCA1* oder *BRCA2* sogenannte Kandidatengene herauszufiltern und zu validieren, die möglicherweise für den Brustkrebs in der Familie verantwortlich oder daran beteiligt sein könnten. Dabei schließt diese Arbeit an die Experimente von Mike Dufault, einem ehemaligen Biologie-

Doktoranden aus unserer Gruppe, an. Nach erfolgter Exomsequenzierung (Ambry Genetics, USA) wurden von ihm gemeinsame Mutationen bei mehreren erkrankten Familienmitgliedern ermittelt („family based approach“). Dabei wurden Missense-Mutationen von trunkierenden, wie Splice-, Nonsense- oder Frameshift-Mutationen unterschieden. Eine Genliste mit gemeinsamen Mutationen innerhalb einer Familie war die Basis der weiteren Untersuchungen für diese Arbeit. In einem ersten Schritt sollte mithilfe von Vorhersageprogrammen untersucht werden, ob es sich speziell bei den „Missense“-Mutationen (VUS = „variants of unknown significance“) um Sequenzvariationen handelt, die ein in seiner Funktion eingeschränktes Genprodukt zur Folge haben oder um solche, die die Proteinfunktion nicht beeinflussen. In Datenbankanalysen sollte in einem nächsten Schritt die „Mutation-Load“, also die Anzahl der bereits bekannten trunkierenden Mutationen, betrachtet werden, um die Anzahl der Kandidatengene weiter zu reduzieren. Hierbei wurden diejenigen Gene von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen, die eine Anzahl von mehr als fünf trunkierenden Mutationen in der Datenbank aufwiesen. Die übrigen Gene wurden im Anschluss mittels Segregationsanalysen in den Familienmitgliedern validiert, die nicht an der Exomsequenzierung beteiligt waren. Hierbei sollten in der Regel erkrankte Familienmitglieder die Mutation in diesem Gen aufweisen, Gesunde jedoch nicht. In der kleinen Gruppe der nun übrig gebliebenen Gene wurde deren biologische Bedeutung in die Entscheidung mit einbezogen, welches Gen in weiterführenden Kontrollen in einem größeren Patientenkollektiv auf trunkierende Mutationen hin untersucht werden sollte. Es wurden in einem nächsten Schritt 149 *BRCA1/2*-negative DNAs aus dem Patientinnen-Pool der gynäkologischen Tumorgenetik des Klinikums Rechts der Isar auf trunkierende Mutationen im ausgewählten Gen *AEBP1* untersucht, das in der Familie 2 eine klare Mutation zeigte und (fast) komplett segregierte. Parallel wurden im Rahmen des PERSPECTIVE-Projektes des Helmholtz Zentrums an weiteren 874 Patientinnen Exomsequenzierungen vorgenommen und nach Veränderungen in diesem Gen gesucht. Im Laufe der vorliegenden Arbeit wurde dabei ein weiteres Gen identifiziert, das ebenfalls in der Familie 2 mutiert ist. Dieses sollte nachträglich in der Familie durch Segregationsanalysen validiert werden (*ACTL7A*).

## 1.5 Das Kandidatengen *AEBP1*

Aufgrund seiner biologischen Bedeutung, seines ubiquitären Vorkommens und seiner Rolle bei unterschiedlichen Prozessen im menschlichen Körper, wurde das Gen *AEBP1*, das in Familie 2 mutiert war, für weitere Untersuchungen ausgewählt. Im Folgenden soll genauer auf seine Expression und Funktion eingegangen werden.

### 1.5.1 Expression in unterschiedlichen Geweben

Das Gen *AEBP1* besteht aus 21 Exons, die über 10.000 Nukleotide umfassen (Ro et al., 2001). *AEBP1* ist ein multifunktionales Protein und wird ubiquitär exprimiert, dabei scheint seine Expression im Fettgewebe, in der Leber, der Lunge, der Milz und im Gehirn am höchsten zu sein (Ro et al., 2001). Im Fettgewebe fungiert *AEBP1* als Transkriptionsrepressor, der eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung von Adipozyten spielt: dabei wird *AEBP1* hauptsächlich in den Präadipozyten stark exprimiert und bleibt es während der ersten Schritte der Adipogenese (He et al., 1995; Kim et al., 2001). Während der Differenzierung zu reifen Adipozyten wird die Expression von *AEBP1* herunterreguliert und ist bei vollständig differenzierten, nicht-proliferativen Adipozyten komplett aufgehoben (He et al., 1995; Kim et al., 2001; Ro et al., 2001). Es zeigte sich außerdem, dass *AEBP1* reichlich in Makrophagen (Majdalawieh et al., 2009; Majdalawieh et al., 2006; Majdalawieh et al., 2007) und im Stroma der Brustdrüse weiblicher Mäuse exprimiert wird (Zhang et al., 2011). Während der Schwangerschaft und in der Laktationszeit verändern sich die Expressionsrate und das Proteinlevel von *AEBP1* – sie steigen während der Schwangerschaft und am Beginn der Laktation an und nehmen im Laufe der Laktation signifikant ab (Zhang et al., 2011).

Die Abbildung 1 zeigt die Expression von *AEBP1* in verschiedenen Gewebetypen. Dabei ist ersichtlich, dass *AEBP1* vor allem in Adipozyten stark exprimiert wird. Die Expression in Makrophagen ist hier nicht dargestellt (University of California Santa Cruz).

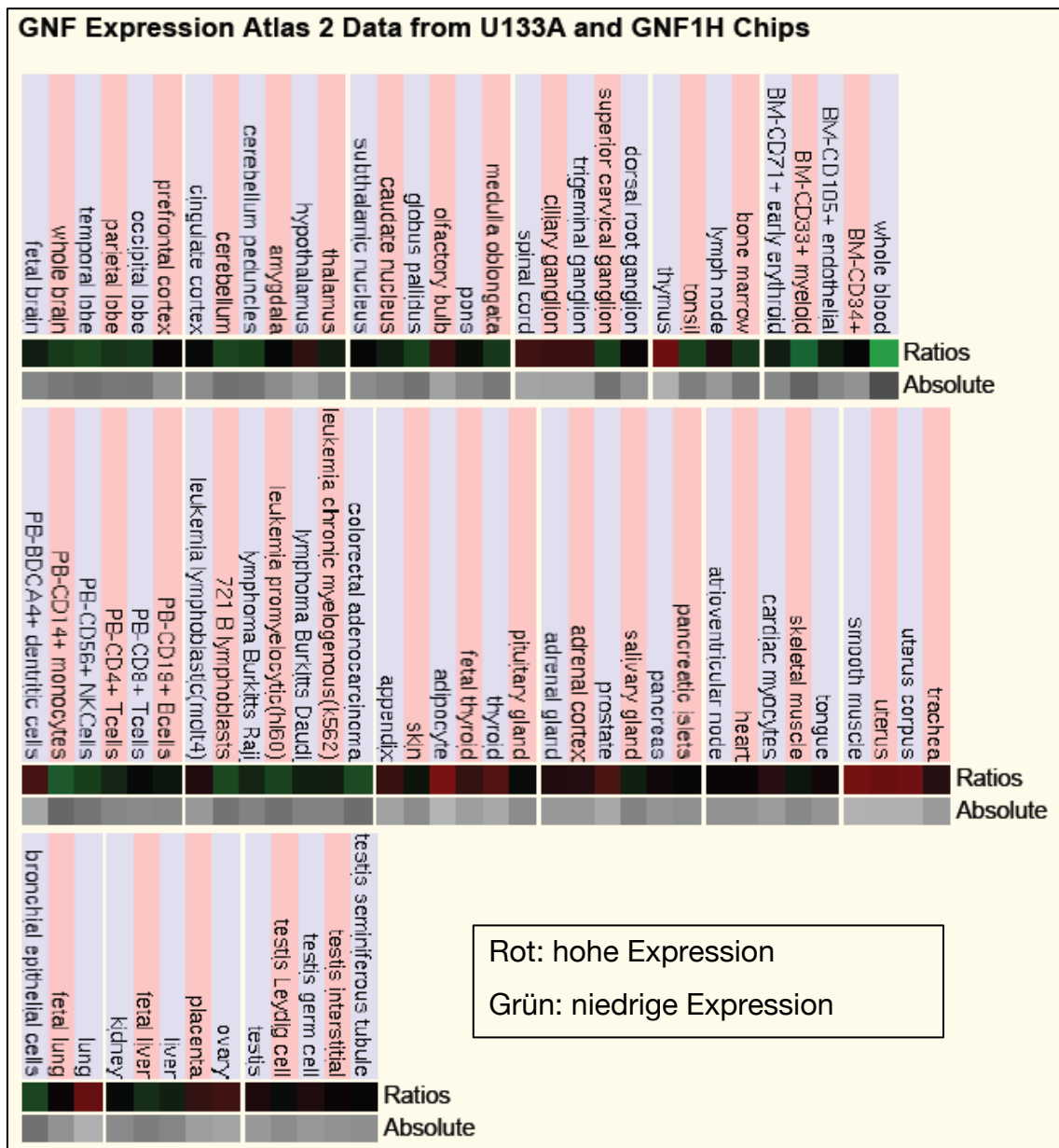


Abbildung 1: Expression von *AEBP1* in unterschiedlichen Geweben

## 1.5.2 Funktion des Proteins *AEBP1*

### 1.5.2.1 Die Funktion von *AEBP1* bei der Brustdrüsenentwicklung

*AEBP1* wird im Interstitium des Brustdrüsenengewebes exprimiert und spielt eine entscheidende Rolle bei der Brustdrüsenentwicklung (Zhang et al., 2011). In Mausstudien konnte gezeigt werden, dass die Expression von *AEBP1* unentbehrlich ist für die Aufrechterhaltung der normalen Brustdrüsenarchitektur und -funktion: Weibliche homozygote *AEBP1*<sup>-/-</sup> - Mäuse wiesen eine Akkumulation von Milchproteinen in der Brustdrüse und eine Erweiterung des Alveolarlumens

mit großen zytoplasmatischen Fetttropfchen in den Epithelzellen auf, was für eine fehlerhafte Aktivierung der Milchsekretion nach der Geburt ihrer Jungen spricht (Zhang et al., 2011).

#### 1.5.2.2 Die Rolle von *AEBP1* bei der Kommunikation zwischen Brustdrüsenepithel und Interstitium

Die Brustdrüse besteht neben den Epithelzellen aus den Zellen des Interstitiums, die durch die extrazelluläre Matrix miteinander kommunizieren (Wiseman et al., 2002). Dabei scheint *AEBP1*, das im Interstitium, nicht jedoch in den Epithelzellen exprimiert wird, ein unverzichtbarer Mediator der Kommunikation zwischen Brustdrüsenstroma und Epithelzellen bei der Entwicklung der Brustdrüse zu sein, indem es zum Beispiel die funktionelle Differenzierung und die Involution des Brustdrüsenepithels steuert (Zhang et al., 2011). Eine Unterbrechung der Kommunikation zwischen Stroma und Epithel im Allgemeinen kann eine unkontrollierte Proliferation der Brustdrüsenepithelzellen bewirken und so die Tumorgenese von Mammatumoren fördern (Karim et al., 2009; Wiseman et al., 2002). Darüber hinaus spielen die exakte Zusammensetzung der extrazellulären Matrix und die Beschaffenheit der Mikroumgebung eine kritische Rolle bei der Morphogenese, der Homöostase und einer möglichen malignen Entartung der Brustdrüse (Haslam et al., 2003; Howlett et al., 1993; Kass et al., 2007; Shekhar et al., 2003).

#### 1.5.2.3 *AEBP1* als Regulator der Brustdrüseninvolution

Die meisten Organe der Wirbeltiere werden während der Embryogenese gebildet und behalten ihre Grundstruktur zeitlebens, im Unterschied zum Brustgewebe, das über die gesamte Lebenszeit einer fortpflanzungsaktiven Frau kontinuierlich strukturellen Veränderungen ausgesetzt ist (Wiseman et al., 2002). Die Entwicklung der Brustdrüse ist erst vollständig, wenn es zu einer Schwangerschaft und Laktation kommt (Wiseman et al., 2002). Dabei induzieren reproduktive Hormone die Expansion und endgültige Differenzierung des Brustdrüsenepithels zu sekretorischen, milchproduzierenden lobulären Alveoli und die großen Fettzellen entdifferenzieren sich zu kleinen Präadipozyten

(Hennighausen et al., 2001). Wenn die Jungtiere von Mäusen nicht länger an der Brustdrüse nuckeln, stirbt das sekretorische Epithel der Brustdrüse durch Apoptose ab, die Fettzellen differenzieren sich erneut und die Brustdrüse bildet sich zurück, bis sie der einer Nullipara-Maus gleicht. Dieser Prozess wird Involution genannt (Alexander et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass *AEBP1* eine entscheidende Rolle bei der Regulation des apoptotischen Signals bei der Rückbildung der weiblichen Brust nach der Schwangerschaft spielt: Dabei sprechen erhöhte Konzentrationen von *p-STAT3*, *C/EBP $\delta$*  und *c-Caspase 3*, allesamt Marker für die Rückbildung der Brustdrüse (Chapman et al., 1999; Green et al., 2004; Hutt et al., 2000), in den Epithelzellen sowie der Abbau von Epithelzellen durch Apoptose während der Schwangerschaft für eine vorzeitige Involution der Brustdrüse bei *AEBP1*<sup>-/-</sup> - Mäusen (Zhang et al., 2011).

#### 1.5.2.4 Wechselwirkung mit anderen Proteinen

Um die Rolle von *AEBP1* bei der Tumorgenese durch Zellproliferation, Zellwachstum und -überleben zu klären, identifizierten Ladha et al. mittels Transkriptom-Profilings die genomischen Ziele von *AEBP1*, nachdem in einer vorangegangenen Studie eine Überexpression von *AEBP1* in Zellen des primären Glioblastoms gefunden wurde (Reddy et al., 2008). In Zellen, in denen *AEBP1* gezielt herunterreguliert war, zeigte sich eine veränderte Expression von 734 Genen, von denen 408 Gene herunter- und 326 Gene heraufreguliert waren, darunter solche, die an Zellproliferation, Zellzyklus, Zelldifferenzierung und Apoptose beteiligt waren (Ladha et al., 2012). Zu den am stärksten veränderten, vermehrt exprimierten Genen gehören *EGFR* und *PDGFB*, beides Gene, die durch die Fehlregulation von Wachstumsfaktor-Signalwegen an der Proliferation von Krebszellen beteiligt sind (Ladha et al., 2012). Eine verstärkte Aktivierung von *EGFR*, einer Wachstumsfaktor-Tyrosinkinase, vermittelt vor allem durch eine veränderte Genamplifikation und durch autokrine Stimulation, stellt einen entscheidenden Faktor bei der Tumorentstehung und der Aggressivität im Wachstumsverhalten von Tumorzellen dar (Salomon et al., 1995). In Studien konnte außerdem eine Assoziation zwischen verstärkter *EGFR*-Expression und verminderter Differenzierung von Brustkrebszellen gezeigt werden (Nicholson et al., 2001). *PDGFB* wiederum ist das mitogene Polypeptid des dimeren

Wachstumsfaktors *PDGF* (Nister et al., 1988). Ein erhöhtes Proteinlevel von *PDGF* konnte im Plasma von Brustkrebspatientinnen mit fortgeschrittenem Mammakarzinom und ausgedehnter Metastasierung nachgewiesen werden (Ariad et al., 1991). Außerdem hochreguliert waren die Gene *CDK6*, das eine Schlüsselrolle bei der Zellteilung einnimmt, indem es Zellen in die Synthesephase des Zellzyklus überführt (Sherr et al., 2016), sowie das Gen *MDM2*, das als onkogenes Protein einen bedeutenden Regulator der *p53*-assoziierten Tumorsuppression darstellt, indem es die Funktion von *p53* zu blockieren scheint (Shen et al., 2011). Weitere hochregulierte Gene waren *ITGB1* und *FZD8*, die am Differenzierungsprozess und der Krebsentstehung beteiligt sind (Ladha et al., 2012).

#### 1.5.2.5 *AEBP1* und *PTEN*

*AEBP1* interagiert mit dem Tumorsuppressor *PTEN* (Gorbenko et al., 2004). Es zeigte sich, dass ein erhöhtes Proteinlevel von *AEBP1* negativ mit der Aktivität von *PTEN* korreliert (Zhang et al., 2005). *PTEN* wiederum antagonisiert die Aktivität von *PI3K*, der growth-factor-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase, die viele nachgeschaltete Prozesse in der Zelle kontrolliert, wie Zellwachstum, Apoptose und Zellbeweglichkeit (Yamada et al., 2001). *PTEN* spielt eine wichtige Rolle bei der Kontrolle von Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Epithelzellen der Mamma: Zellen, in denen die Expression von *PTEN* ausgeschaltet war, erwiesen sich als dysreguliert und hyperproliferativ (Li et al., 2002). Dagegen wiesen Epithelzellen, die *PTEN* überexprimierten eine verringerte Proliferation und eine erhöhte Apoptoserate auf (Dupont et al., 2002).

#### 1.5.2.6 *AEBP1* als kritischer Faktor bei der Entstehung des Mammakarzinoms

Holloway et al. bestätigten, dass eine gezielte Überexpression von *AEBP1* in Makrophagen und Adipozyten im Stroma des Brustgewebes durch eine folgende erhöhte Expression von *TNF $\alpha$*  unter anderem zu einer verstärkten *NF- $\kappa$ B* Aktivität in der Brustdrüse führt, die wiederum eine Hyperplasie des Drüsenepithels zur Folge hat (Holloway et al., 2012). Auch Barham et al. zeigten, dass schon eine kurzzeitige *NF- $\kappa$ B* Aktivierung zu tiefgreifenden Umbaupro-

zessen, wie hyperproliferativen, vergrößerten Milchgängen im Brustgewebe führt (Barham et al., 2015). Des Weiteren konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass das Onkoprotein *Mucin1*, das beim DCIS von Mensch und Maus verstärkt exprimiert wird (Mommers et al., 1999) im aktivierten Milchgangsepithel überexprimiert war (Barham et al., 2015). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine Aktivierung von *NF- $\kappa$ B* im Brustepithel zu molekularen und morphologischen Veränderungen führen kann, die mit den frühesten Stadien des Mammakarzinoms vereinbar sind (Barham et al., 2015). Da also eine Überexpression von *AEBP1* zu einer verstärkten Expression von *TNF $\alpha$*  und einer erhöhten Aktivität von *NF- $\kappa$ B* führt und diese wiederum bei der Tumorentwicklung und Metastasierung eine Rolle spielen, (Baud et al., 2001, 2009; Karin, 2006; Soria et al., 2011) ist es wahrscheinlich, dass auch *AEBP1* einen kritischen Faktor bei der Entstehung des Mammakarzinoms darstellt (Holloway et al., 2012). Interessanterweise ist *AEBP1*, das normalerweise nicht im Brustdrüsenepithel, sondern nur im Interstitium exprimiert wird (Zhang et al., 2011), im hyperplastischen Epithel von Mäusen, in deren Makrophagen und Adipozyten *AEBP1* im Stroma der Brust gezielt überexprimiert war, stark nachweisbar (Holloway et al., 2012).



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Auswahl der Hochrisikofamilien und familienbasierte Exomsequenzierung

Aus 25 Hochrisikofamilien, die im Zentrum für familiären Brust – und Eierstockkrebs am Zentrum München betreut und untersucht, und bei denen eine Exomsequenzierung bei Ambry Genetics, CA, USA, durchgeführt wurde, sind zwei Familien zur Validierung bestimmter Kandidatengene ausgewählt worden. In diesen Familien bestand aufgrund von Brustkrebskrebserkrankungen in mehreren Generationen der Verdacht auf ein erbliches Mammakarzinom, jedoch konnte in der molekulargenetischen Diagnostik keine Mutation in den Hochrisikogenen *BRCA1* und *BRCA2* oder den moderat-penetranten Genen nachgewiesen werden, so dass sie sich für weitere genetische Untersuchungen eigneten. Basis der vorliegenden Arbeit waren die mithilfe der Exomsequenzierung ermittelten gemeinsamen genetischen Varianten in einer Familie.

### 2.2 Stammbäume der Familien

Die Stammbäume der ausgewählten Hochrisikofamilien, die von Mitarbeiterinnen der Abteilung für gynäkologische Tumorgenetik im Klinikum rechts der Isar mit dem Programm Cyrillic erstellt wurden, finden sich im Anhang.

### 2.3 In Silico Analysen

Es handelt sich hierbei um Analysen, die am Computer durchgeführt wurden, wie z. B. die Anwendung von Vorhersageprogrammen und Datenbankabfragen.

#### 2.3.1 Datenbankanalysen

Bereits bekannte Varianten werden im Exome Variant Server des NHBLI Grand Opportunity Exome Sequencing Projects erfasst und können über den Data Browser auf der Webseite des Instituts abgefragt werden (National Heart Blood and Lung Institute). Dazu wurde der Name des zu analysierenden Gens in die Suchmaske des Data Browsers eingegeben, und es konnte festgelegt werden,

ob alle bekannten Sequenzvarianten des Gens oder diese populationspezifisch (European American oder African American) angezeigt werden sollen. Es wurde unterschieden zwischen trunkierenden Mutationen, wie Splice-, Non-sense- oder Frameshift-Mutationen, deren Folge gar kein oder ein funktionsloses Genprodukt ist, Missense-Mutationen, die den Austausch einer Aminosäure zur Folge haben und stillen Mutationen, die aufgrund der Redundanz des genetischen Codes, also der Codierung einer Aminosäure durch mehrere Codons, das Genprodukt nicht verändern. Hier wurden ausschließlich die trunkierenden Mutationen in der europäisch-amerikanischen Bevölkerungsgruppe in Betracht gezogen, wie sie zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit in der Datenbank beschrieben waren.

### 2.3.2 Vorhersageprogramme

Mittels webbasierter Vorhersageprogramme wie SIFT (J. Craig Venter Institute), PolyPhen-2 (Brigham and Women's Hospital) oder MutationTaster2 (Charité Universitätsmedizin Berlin), die online frei abrufbar sind, lässt sich die Auswirkung eines Aminosäureaustausches in einer Proteinsequenz auf die Proteinfunktion beurteilen. Eine Mutation, die einen einzigen Aminosäureaustausch in der Proteinsequenz bedingt, wird nsSNP (non-synonymus single nucleotide polymorphism) oder auch Missense-Mutation genannt und kann die Proteinfunktion beeinflussen und somit den Phänotyp verändern (Kumar et al., 2009). Mit den Programmen kann durch den Vergleich des Wildtyp-Allels mit dem mutierten Allel eine schädigende Auswirkung der Missense-Mutation vorhergesagt werden (Adzhubei et al., 2010). Mit dem MutationTaster können dabei nicht nur der Austausch einer Aminosäure, sondern auch synonyme Veränderungen der DNS-Sequenz und kurze Insertionen und Deletionen beurteilt werden (Schwarz et al., 2014).

## 2.4 Chemikalien

In der folgenden Tabelle findet sich eine Übersicht über die Zusammensetzung einiger wichtiger Chemikalien. Die Anwendung dieser und weiterer verwendeter Materialien werden im Rahmen der einzelnen Analysemethoden beschrieben.

1xTE	10 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan-HCl, 1 mM EDTA
1xTBE	89 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan-HCl, Borsäure, 2 mM EDTA
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, 2 µl Ethidiumbromid

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien.

## 2.5 Analysemethoden

### 2.5.1 Extraktion / Konzentrationsbestimmung genomischer DNS

Die Extraktion genomischer DNS sowie Konzentrationsbestimmungen der DNS wurden entsprechend der Standardmethode durchgeführt.

### 2.5.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde entsprechend der Standardmethode durchgeführt.

#### 2.5.2.1 Primerdesign

Mithilfe des USCS Genome Browser (University of California Santa Cruz) wurde die zu amplifizierende DNS-Sequenz ausgewählt und die entsprechenden Primer bestimmt. Diese wurden bei Metabion® International AG bestellt.

Eine Liste der Primer, die für die PCR und die Sequenzierung der Gene aus Familie 2 und Familie 19 verwendet wurden, findet sich im Anhang.

### 2.5.2.2 Verwendete Materialien

Es wurden entsprechend der PCR-Standardmethode folgende Materialien verwendet:

H <sub>2</sub> O	38 µl
Puffer	5 µl
dNTP	4 µl
F-Primer	1 µl
R-Primer	1 µl
Polymerase	0,2 µl
DNS	2 µl

Tabelle 2: Reaktionsansatz zur Durchführung einer PCR.

### 2.5.3 Thermocycling

Das Thermocycling wurde nach der Standardmethode analog Tabelle 3 durchgeführt.

<b>Arbeitsschritt</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>	<b>Zyklen</b>
Anfangsdenaturierung	95 °C	10 min	1
Cycle-Denaturierung	95 °C	30 s	14
Annealing	68 °C (-1 °C pro Zyklus)	30 s	
Polymerisation	72 °C	45 s	
Cycle-Denaturierung	95 °C	30 s	35
Annealing	52 °C	30 s	
Polymerisation	72 °C	45 s	
Abschließende Polymerisation	72 °C	10 min	1
Abkühlen	12 °C	15 min	1

Tabelle 3: Ablauf des Thermocyclings im TOUCHDOWN-Programm.

### 2.5.3.1 Verwendete Materialien

Es wurde das Sequenzierkit BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit verwendet.

### 2.5.3.2 Reaktionsansatz

Der Ansatz wurde so wie vom Hersteller des Kits empfohlen hergestellt. Die angegebenen Volumina des Reaktionsansatzes beziehen sich auf eine Probe mit einem Endvolumen von ca. 10 µl.

H <sub>2</sub> O	4 µl
PCR-Produkt	4 µl
BigDye®	1,7 µl
Primer	0,5 µl

Tabelle 4: Reaktionsansatz für die Sequenzierung nach Sanger.

### 2.5.3.3 Programm

Die Reaktionsgefäße wurden zur Durchführung der Sequenzierung in den Thermocycler gestellt. Hier wurde folgendes Programm eingegeben:

Arbeitsschritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Denaturierung	94 °C	30 s	28
Annealing	52 °C	15 s	
Polymerisation	60 °C	4 min	
Abkühlen	12 °C	15 min	1

Tabelle 5: Ablauf des Thermocyclings bei der Sequenzierung nach Sanger.

### 2.5.4 Real-time quantitative PCR und High Resolution Melting

Die Real-time-PCR basiert auf dem Prinzip der konventionellen PCR. Hier kann jedoch die Produktmenge nach jedem Syntheszyklus quantifiziert und so in Echtzeit erfasst werden (Munk, 2010). Um die PCR-Produkte während der Reaktion zu markieren, wurde hier der DNS-bindende Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I Master verwendet. Es handelt sich dabei um Farbstoffmoleküle, die sich mit hoher Spezifität in die kleine Furche doppelsträngiger DNS einlagern. Die Fluoreszenz wurde in jedem einzelnen Reaktionszyklus gemessen, dabei war die Fluoreszenzintensität in jedem Zyklus direkt proportional zur Menge an gebildetem PCR-Produkt, was den Rückschluss auf die Menge an eingesetzter Zielnukleinsäure erlaubte (Jansohn et al., 2012).

Um in einem weiteren Schritt Sequenzvarianten in der amplifizierten DNS zu ermitteln, wurde anschließend eine High Resolution Melting Analyse durchgeführt, bei der durch Erhöhung der Schmelztemperatur die doppelsträngige DNS denaturiert und dabei Fluoreszenzänderungen gemessen werden. Durch die unterschiedlich ausfallenden Schmelzkurven bei Wildtypen und heterozygoten Proben können diese einfach unterschieden werden (Er et al., 2012).

#### 2.5.4.1 Primerdesign

Wie bei der konventionellen PCR, wurde auch hier die zu amplifizierende DNS-Sequenz mithilfe des UCSC Genome Browsers (University of California Santa Cruz) ausgewählt, die entsprechenden Primer bestimmt und bei Metabion® International AG bestellt.

#### 2.5.4.2 Verwendete Materialien

Das Reaktionskit LightCycler® 480 High Resolution Melting Master der Firma Roche (Version 06), zum einen bestehend aus dem Master Mix mit FastStart Taq DNS Polymerase, Reaktionspuffer, dNTP Mix und High Resolution Melting Dye, zum anderen aus  $MgCl_2$  und  $H_2O$  (PCR-Grad), wurde verwendet. Die Real-Time PCR und das High Resolution Melting wurde in einem LightCycler® 480 System, bestehend aus dem LightCycler® 480 Gerät und der LightCycler® 480 Software 1.5 der Firma Roche, durchgeführt und auf dem Computer ausgewertet.

#### 2.5.4.3 Reaktionsansatz

Die Reagenzien wurden in eine LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 der Firma Roche pipettiert. Die hier angegebenen Volumina entsprechen einer Probe mit einem Endvolumen von etwa 20  $\mu$ l. Zusätzlich wurde bei jeder PCR eine Negativkontrolle durchgeführt.

H <sub>2</sub> O	5 µl
Master Mix	10 µl
MgCl <sub>2</sub>	3,2 µl
F-Primer	0,5 µl
R-Primer	0,5 µl
DNS	1 µl

Tabelle 6: Reaktionsansatz für eine Real-time quantitative PCR.

#### 2.5.4.4 Programm

Die Multiwell-Platten mit den Proben wurden in einen LightCycler® 480 gestellt, anschließend wurde auf dem mit ihm verbundenen Computer das untenstehende Programm ausgewählt. Es wurde ein neues Experiment erstellt und die Proben mithilfe des Sample Editors und Subset Editors genau bezeichnet. Anschließend wurde der Lauf gestartet.

Program name	Tm	Time	Cycles
Pre-incubation	95 °C	10m	1
Amplification	95 °C 60 °C 72 °C	10s 15s 20s	45
High resolution melting	95 °C 40 °C 65 °C 95 °C	1m 1m 1s 25 acquisitions per °C	1
Cooling	40 °C	30s	1

Tabelle 7: Ablauf der Real-time PCR und des High Resolution Melting im LightCycler®.

#### 2.5.4.5 Auswertung

Nach Beendigung des Laufs wurde das Experiment in der LightCycler® 480 Software 1.5 am Computer geöffnet und mit der Funktion Analysis und Gene Scanning ausgewertet.

### 2.5.5 Denaturierende Hochdruckflüssigkeitschromatographie (DHPLC)

Die DHPLC ist ein Verfahren, das auf das Vorliegen einer Sequenzvariation in einem DNS-Fragment hinweist. Dafür ist die Ausbildung einer Heteroduplex notwendig. Dies ist der Fall, wenn ein DNS-Fragment, das Polymorphismen oder Mutationen enthält, mit Wildtyp-DNS hybridisiert wird.

Bei der DHPLC werden die zuvor in einer konventionellen PCR amplifizierten DNS-Fragmente unter Druck unter denaturierenden Bedingungen in eine Säule injiziert, die aus einer neutralen Polymermatrix besteht. Die DNS bindet über ein Brückenmolekül an das Säulenmaterial. Anschließend erfolgt die Elution, bei der die Säule mit einem Acetonitril-Gradienten, einem Lösungsmittel, bei einer bestimmten Temperatur gespült wird (Murken, 2006). Aufgrund ihrer falschen Basenpaarung denaturieren Heteroduplexe schneller als Homoduplexe und binden weniger stark an die Säule. Deswegen eluieren Heteroduplexe in einem Acetonitril-Gradienten früher als Homoduplexe und weisen eine kürzere Retentionszeit an der Säule auf. Im Chromatogramm deutet also ein zusätzlicher Peak mit kürzerer Retentionszeit auf eine falsche Basenpaarung, wie sie bei einer Mutation vorliegt, hin (Transgenomic®, 2009).

#### 2.5.5.1 Primerdesign

Mithilfe des UCSC Genome Browsers (University of California Santa Cruz) wurde die zu amplifizierende Sequenz ausgewählt und die passenden Primer bestimmt. Diese wurden bei Metabion® International AG bestellt.

#### 2.5.5.2 Verwendete Materialien

Die PCR wurde in Thermocyclern der Marke Bio-Rad® MJ Research DNA Engine PTC-200 durchgeführt, die Reagenzien wurden in Platten der Firma Costar® Thermowell™ 96 Well Platte Model (P), Polycarbonate pipettiert und mit einer Thermo Scientific Nunc® Folie (Cat. No. 236366) verschlossen.

Das Polymeraseset AmpliTaq Gold®, bestehend aus Polymerase und 10 X PCR Buffer, sowie die Desoxyribonukleotide von Applied Biosystems™ wurden verwendet.



Die DHPLC wurde in einem WAVE® Nucleic Acid Fragment Analysis System 4500 der Firma Transgenomic mit der Software Transgenomic navigator software 3.1 durchgeführt. Es wurden die Puffer Transgenomic® WAVE optimized® Buffer A und B, Wave optimized® Solution D verwendet.

#### 2.5.5.3 Reaktionsansatz

Die Reaktionsansätze für die PCR wurden in eine 96 Well Platte pipettiert. Die Mischverhältnisse sind Tabelle 8 zu entnehmen. Dabei beziehen sich die angegebenen Volumina auf eine Probe mit einem Endvolumen von etwa 33 µl, zusätzlich wurde bei jedem Thermocycling eine Negativkontrolle durchgeführt.

H <sub>2</sub> O	25 µl
Puffer	3,3 µl
dNTP	2,6 µl
F-Primer	0,6 µl
R-Primer	0,6 µl
Polymerase	0,1 µl
DNS	1,5 µl

Tabelle 8: Reaktionsansatz für eine PCR in einer 96 Well Platte.

#### 2.5.5.4 Thermocycling

Für eine konventionelle PCR wurde im Thermocycler das Programm GOLD ausgewählt und die entsprechende Hybridisierungstemperatur, welche je nach Primer unterschiedlich hoch ausfiel, eingegeben.

#### 2.5.5.5 DHPLC

Das DHPLC-Gerät besteht im Wesentlichen aus einem Autosampler im 2x96-well-Plattenformat, einem Ofen, einer Chromatographie-Säule und einem UV-Detektor. Die Platte mit den PCR-Produkten wurde in den Autosampler des WAVE-Systems gestellt. Anschließend wurde mit der Navigator™ Software die fragmentspezifische Methode erstellt, nach deren Vorgaben die DHPLC ablaufen sollte. Dazu musste die passende Temperatur anhand der zu analysieren-

den Sequenz bestimmt werden. Durch den unterschiedlichen Basengehalt jeder Sequenz fiel die optimale Temperatur unterschiedlich hoch aus und lag zwischen 63 und 66 °C. Anschließend wurde die DHPLC als eine im Labor etablierte Methode standardmäßig durchgeführt.

#### 2.5.5.6 Auswertung

Die Ergebnisse der DHPLC wurden mit der Navigator™ Software ausgewertet. Wurde mehr als eine Temperatur für ein DNS-Fragment verwendet, wurden die Ergebnisse nacheinander ausgewertet.

## 2.6 RNA-Isolierung

Um festzustellen, ob ein Gen in einem bestimmten Gewebe exprimiert wird, kann RNA aus den Zellen dieses Gewebes isoliert und anschließend in cDNA umgewandelt werden. Mit spezifischen Primern des zu untersuchenden Gens und der gewonnenen DNS kann in einer PCR festgestellt werden, ob sich DNS-Fragmente anreichern, das Gen also in dem Gewebe exprimiert wird oder nicht. Die Erfolgskontrolle der PCR erfolgt hierbei mit einer Gelelektrophorese, wie sie oben beschrieben wurde.

### 2.6.1 Verwendete Materialien

Bei dem zu untersuchenden Gewebe handelte es sich um tiefgefrorenes, benignes Brustdrüsengewebe aus dem Bestand der Forschungsgruppe der gynäkologischen Tumorgenetik am Klinikum Rechts der Isar. Die Extraktion der RNA aus diesem Gewebe erfolgte mithilfe des RNeasy Lipid Tissue Mini Kit 2003 der Firma QIAGEN nach Anleitung des Herstellers. Das gewonnene RNA-Template wurde mit dem First Strand cDNA Synthesis Kit der Firma Amersham Biosciences in cDNA umgewandelt. Anschließend wurde die gewonnene cDNA mittels Touchdown-PCR in einem Thermocycler der Marke Bio-Rad® MJ Research DNA Engine PTC-200 amplifiziert. Für diese wurde neben der gewonnenen cDNA und den Primern des zu untersuchenden Genabschnitts die Fast-Start™ Taq DNA Polymerase, der Reaktionspuffer PCR buffer with MgCl<sub>2</sub> (10 x conc.) und der PCR Grade Nucleotide Mix mit dATP, dGTP, dTTP und dCTP

der Firma Roche benutzt. Zur Erfolgskontrolle wurde anschließend eine Gelelektrophorese durchgeführt und daraufhin das Gel unter einer UV-Lampe UV-Solo Biometra® bei einer Wellenlänge von 280 nm betrachtet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Validierung von Kandidatengenen in 2 Hochrisiko-Familien

#### 3.1.1 Ergebnisse der Validierung aus Familie 2

Um in der ersten untersuchten Familie (Familie 2) die sogenannten Kandidatengene herauszufiltern, wurden die durch die Exomsequenzierung (Ambry Genetics, USA) ermittelten, gemeinsamen Mutationen bei mehreren erkrankten Familienmitgliedern weiter validiert.

##### 3.1.1.1 Ergebnisse der Vorhersageprogramme in Familie 2

Zunächst wurde mithilfe von Vorhersageprogrammen untersucht, ob es sich bei den in der Familie gefundenen „Missense“-Mutationen um Sequenzvariationen handelt, die ein in seiner Funktion eingeschränktes Genprodukt zur Folge haben oder um solche, die die Proteinfunktion nicht beeinflussen.

In der folgenden Tabellen finden sich die Ergebnisse der Vorhersageprogramme PolyPhen-2, SIFT und MutationTaster für die „Missense“-Mutationen die in Familie 2 bei den erstgradig verwandten Erkrankten gefunden wurden:

Gen	Mutation	Protein ID	PolyPhen-2	SIFT	MutationTaster
ACSM3	P431L	Q53FZ2-2	benigne 0,000	affect protein function 0,0	Polymorphismus 0,999
ADAM21	I161V	Q9UKJ8	benigne 0,002	tolerated 0,47	Polymorphismus 0,999
ADAMTS3	S204A	O15072	benigne 0,002	tolerated 0,22	disease causing 0,999
AHR	F550S	P35869	possibly damaging 0,742	tolerated 0,32	disease causing 0,984
ANO1	C706Y	Q5XXA6	benigne 0,000	tolerated 0,25	Polymorphismus 0,999
ANO9	M478I	A1A5B4	probably damaging 1,0	affect protein function 0,03	disease causing 0,999
APLNR	L160V	P35414	probably damaging 1,0	tolerated 0,63	disease causing 0,999
APLNR	T150M	P35414	probably damaging 0,989	tolerated 0,47	disease causing 0,878
CARD9	R315L	Q9H257-2	possibly damaging 0,493	tolerated 0,49	disease causing 0,784
CD300C	R118Q	Q08708	benigne 0,032	tolerated 0,36	Polymorphismus 0,999
DEFB136	G21C	Q30KP8	benigne 0,023	tolerated 0,15	Polymorphismus 0,999
DNAJC3	K456R	Q13217	benigne 0,023	tolerated 0,66	Polymorphismus 0,955
FAM122C	C147R	Q6P4D5	benigne 0,006	tolerated 0,11	Polymorphismus 0,999
GBF1	P796L	Q92538	probably damaging 1,0	affect protein function 0,0	disease causing 0,999
KCNJ5	M210I	P48544	benigne 0,000	tolerated 0,37	disease causing 0,829
LATS1	I131V	O95835-2	benigne 0,112	tolerated 0,66	Polymorphismus 0,660
MKLN1	I189T	Q9UL63	benigne 0,034	affect protein function 0,0	disease causing 0,983
OFD1	T990R	O75665	probably damaging 0,996	tolerated 0,48	Polymorphismus 0,999
PASK	G881E	Q96RG2-2	probably damaging 0,873	tolerated 1,0	Polymorphismus 0,999
PDCD11	R1610L	Q14690	probably damaging 1,0	affect protein function 0,0	disease causing 0,999

PLIN3	A119V	O60664	benigne 0,214	tolerated 0,23	disease causing 0,871
PLK5	A234V	Q496M5	benigne 0,001	tolerated 0,31	Polymorphismus 0,996
PPL	S915I	O60437	possibly damaging 0,483	tolerated 0,12	Polymorphismus 0,999
PPP1R26	E903K	Q5T8A7	benigne 0,296	tolerated 0,53	Polymorphismus 0,999
RBMXL3	G664R	Q8N7X1	probably damaging 0,994	tolerated 0,26	Polymorphismus 0,999
RPTOR	D993N	Q8N122	probably damaging 0,996	tolerated 0,06	disease causing 0,999
SLC35G1	G246R	Q2M3R5	probably damaging 0,999	affect protein function 0,0	disease causing 0,999
SLC9A7	L280V	Q96T83	probably damaging 0,999	affect protein function 0,0	disease causing 0,999
SRSF12	C119delR	Q8WXF0	-	-	disease causing 0,999
SYTL4	R29W	Q96C24	probably damaging 0,999	affect protein function 0,0	disease causing 0,839
UBN1	S1121P	Q9NPG3	probably damaging 0,995	affect protein function 0,03	disease causing 0,863
USP43	S863L	Q70EL4	benigne 0,002	tolerated 0,22	Polymorphismus 0,999
WASF1	N57S	Q92558	probably damaging 0,987	tolerated 0,52	disease causing 0,999

Tabelle 9: Ergebnisse der Vorhersageprogramme in Familie 2.

### Einschätzung:

Bei insgesamt 8 untersuchten Genen stimmten alle drei Vorhersageprogramme überein, dass diese Varianten die Proteinfunktion wahrscheinlich oder sicher beeinflussen: *ANO9*, *GBF1*, *PDCD11*, *SLC35G1*, *SLC9A7*, *SRSF12*, *SYTL4* und *UBN1*. Diese 8 Gene mit „Missense“-Mutationen (VUS) sowie die 4 Gene der Familie, bei denen eine trunkierende Mutation gefunden wurde, wurden in einem nächsten Schritt mittels Datenbankanalysen weiter validiert.

In Tabelle 10 sind die **trunkierenden** Mutationen aus Familie 2, die per se die Proteinfunktion beeinträchtigen, aufgelistet.

Gen	Mutation	Protein ID
ABCC2	R1066X	Q92887
<b>ACTL7A</b>	<b>C361_G362fs</b>	<b>Q9Y615</b>
<b>AEBP1</b>	<b>M1011fs</b>	<b>Q8IUW7</b>
C19orf21	R308X	Q8IVT2

Tabelle 10: Trunkierende Mutationen Familie 2; X=Stop-Mutation; fs=Frameshift-Mutation.

### 3.1.1.2 Ergebnisse der Datenbankanalysen in Familie 2

Um die Anzahl möglicher Kandidatengene weiter einzugrenzen, wurden anschließend Datenbankanalysen durchgeführt. Mittels dieser wurde kontrolliert, welche VUS und trunkierenden Mutationen in den auffälligen Genen bereits beschrieben sind und wie häufig diese Mutationen in einer repräsentativen Anzahl von Allelen (ca. 8000) vorkommen. Die Summe dieser Mutationen inner-

halb eines Gens wird „Mutation-Load“ genannt. Mit der Höhe der Mutation-Load (Fletcher et al.) nimmt die Wahrscheinlichkeit ab, dass dieses Gen als Kandidatengen in der Familie bei der Entwicklung des erblichen Brustkrebses eine Rolle spielt.

In Tabelle 11 sind die Anzahl und die Mutation Load der auffälligen Varianten, die in der Datenbank des Exome Variant Server des NHBLI Grand Opportunity Exome Sequencing Projects (National Heart Blood and Lung Institute) in den ausgewählten Genen zum Zeitpunkt des Schreibens dieser Arbeit bekannt waren, aufgelistet. Hierbei wurden nur die Allele der europäisch-amerikanischen Bevölkerung (EA) berücksichtigt.

Gen	Position	Rs-Nummer	Funktion	Allele	Häufigkeit in EA	Ø SD	ML	Komm.
ABCC2	10:101553654	unbekannt	Frameshift	CA>C	C=180/CA=8068	101	200	
	10:101557089	rs371696765	Splice	G>A	A=1/G=8599	39		
	10:101569929	unbekannt	Frameshift	AG>A	A=2/AG=8252	99		
	10:101571360	rs146405172	Splice	G>A	A=2/G=8598	134		
	10:101591826	rs72558199	Stop	C>T	T=12/C=8588	139		Familie 2
	10:101594183	rs373130678	Stop	G>A	A=1/G=8599	251		
	10:101595853	unbekannt	Frameshift	TTA>T	T=2/TTA=8252	115		
ANO9	11:418805	unbekannt	Frameshift	TC>T	T=10/TC=8242	101	82	
	11:428396	rs202247563	Splice	T>G	G=1/T=8579	32		
	11:429803	unbekannt	Frameshift	CAA>C	C=1/CAA=8217	25		
	11:430180	rs376026201	Splice	C>G	G=1/C=8405	22		
	11:431908	rs200792630	Splice	T>C	C=1/T=8597	59		
	11:431998	rs199962954	Splice	C>A	A=1/C=8597	76		
	11:433356	unbekannt	Frameshift	TG>T	T=65/TG=8187	80		
	11:433814	unbekannt	Frameshift	CCT>C	C=2/CCT=8090	17		
C19orf21 = MISP	19:757605	unbekannt	Frameshift	CT>C	C=26/CT=8208	21	39	
	19:757868	rs201898919	Stop	C>T	T=5/C=8591	36		Familie 2
	19:757988	unbekannt	Frameshift	TCC>T	T=7/TCC=8203	19		
	19:760041	rs144706404	Splice	T>A	A=1/T=8599	85		
GBF1	10:104117852	unbekannt	Frameshift	AT>A	A=1/AT=8253	170	4	
	10:104120821	rs375518420	Stop	C>T	T=1/C=8599	142		
	10:104126887	unbekannt	Frameshift	CT>C	AC=1/CT=8253	174		
	10:104139389	rs144633658	Stop	G>A	A=1/G=8599	167		
PDCD11	10:105200608	rs375869261	Splice	G>A	A=1/G=8599	81	2	
	10:105202153	rs369308440	Stop	C>T	T=1/C=8599	79		
SLC35G1	10:95653885	unbekannt	Frameshift	C>CG	CG=35/C=4611	3	39	
	10:95661006	unbekannt	Frameshift	TATTT CTC>T	T=4/TATTTCTC =8250	101		
SLC9A7	-	-	-	-	-	-	0	
SRSF12	6:89808301	unbekannt	Frameshift	CAACT >C	C=1/CAACT=7875	128	2	
	6:89808326	rs377465681	Stop	G>A	A=1/G=8243	138		

SYTL4	X:99933386	rs145503760	Splice	A>G	G=2/A=6726	51	3	
	X:99941100	unbekannt	Frameshift	CTG>C	C=1/CTG=6483	57		
UBN1	-	-	-	-	-	-	0	
<b>ACTL7A</b>	<b>9:111625685</b>	<b>unbekannt</b>	<b>Frameshift</b>	<b>C&gt;CG</b>	<b>CG=1/C=8253</b>	<b>108</b>	<b>1</b>	<b>Familie 2</b>
<b>AEBP1</b>	<b>7:44150657</b>	<b>rs369016031</b>	<b>Splice</b>	<b>G&gt;A</b>	<b>A=1/G=8599</b>	<b>65</b>	<b>1</b>	

Tabelle 11: Mutation Load in Familie 2.

### Einschätzung:

Wie bereits oben beschrieben, nimmt mit der Höhe der Mutation-Load die Wahrscheinlichkeit ab, dass ein Gen bei der Entwicklung des erblichen Brustkrebses eine Rolle spielt. Die im Anschluss durchgeführten Segregationsanalysen wurden mit solchen Genen durchgeführt, die laut Datenbank eine Mutation Load von <5 trunkierenden Mutationen mit einer verlässlichen Sequenziertiefe (ST) von mindestens 10 aufwiesen.

Somit war nach Abschluss der In Silico Analysen die Anzahl der weiter zu untersuchenden Gene auf die folgenden reduziert: *UBN1*, *GBF1*, *PDCD11*, *SYTL4*, *SLC35G1*, *SRSF12*, *AEBP1* und *ACTL7A*.

#### 3.1.1.3 Ergebnisse der Segregationsanalysen in Familie 2

Basierend auf den Ergebnissen der In Silico Analysen wurde entschieden, welche Gene innerhalb der Familie sequenziert werden, um festzustellen, ob ausschließlich an Brustkrebs erkrankte Familienmitglieder die Mutation aufweisen oder auch gesunde und das Gen somit nicht mehr als Kandidatengen für den Brustkrebs in dieser Familie in Frage kommt. Wie oben beschrieben, wurden die Segregationsanalysen mit solchen Genen durchgeführt, die laut Datenbank eine Mutation Load von <5 trunkierenden Mutationen mit einer verlässlichen Sequenziertiefe von mindestens 10 aufwiesen. Die nicht in der Exomsequenzierung integrierten Familienmitglieder wurden mittels Gensequenzierung auf das Vorhandensein der entsprechenden Mutation in den so ermittelten Genen untersucht. Dabei wird mutierte DNS (m) von Wildtyp-DNS (wt) unterschieden.

In nachfolgender Tabelle ist ersichtlich, welche Familienmitglieder an Brustkrebs erkrankt sind und ob sie die in der Exomsequenzierung ermittelten Mutationen in den sequenzierten Genen aufweisen (Mutation = m) oder nicht (Wild-

typ = wt). Zur besseren Übersicht sind auch die beiden Familienmitglieder angegeben, die in die Exomsequenzierung integriert waren (#19707 und #19272).

Gen	Mutation	AS-Austausch	#19707	#19272	#19703	#19465	#19796	#19693	#25424
UBN1	c.3361T>C	S1121P	m	m	m	wt	m	/	/
GBF1	c.2387C>T	P796L	m	m	m	wt	wt	wt	/
PDCD11	c.4829G>T	R1610L	m	m	m	wt	wt	wt	/
SYTL4	c.85G>A	R29W	m	m	m	wt	wt	m	/
SLC35G1	c.736G>A	G246R	m	m	m	wt	wt	wt	/
SRSF12	c.549-551delTTC	C119delR	m	m	m	wt	wt	wt	/
<b>AEBP1</b>	<b>c.3033insCTAT</b>	<b>M1011fs</b>	<b>m</b>	<b>m</b>	<b>m</b>	<b>wt</b>	<b>wt</b>	<b>wt</b>	<b>wt</b>
<b>ACTL7A</b>	<b>c.1083_1084insG</b>	<b>C361_G362fs</b>	<b>m</b>	<b>m</b>	<b>m</b>	<b>wt</b>	<b>wt</b>	<b>m</b>	<b>wt</b>
<b>Erkrankt</b>			ja	ja	ja	nein	nein	ja (PK?)	nein

Tabelle 12: Ergebnisse der Sequenzierungen in Familie 2; m=Mutation; wt=Wildtyp; PK=Phänokopie.

### Einschätzung:

Als Kandidatengene in Familie 2 sind solche übrig geblieben, bei denen die Mutation in der DNS erkrankter Familienmitglieder in der Sequenzanalyse nachweisbar war, in der DNS nicht erkrankter Familienmitglieder jedoch nicht. Durch den Nachweis einer trunkierenden Genmutation in der DNS nicht erkrankter Familienmitglieder, ist eine Beteiligung dieses Gens an der Entstehung des Brustkrebses in der Familie unwahrscheinlich. Umgekehrt spricht das Fehlen der Mutation in der DNS erkrankter Familienmitglieder gegen das entsprechende Gen als möglichen Auslöser.

Unter Berücksichtigung des klinischen Status der Familienmitglieder bezüglich des Vorliegens eines Mammakarzinoms ergaben sich für Familie 2 in der Segregationsanalyse die Kandidatengene **AEBP1**, **GBF1**, **PDCD11**, **SRSF12**, **ACTL7A** und **SYTL4**.

Hierbei fällt auf, dass die Gene *GBF1*, *PDCD11*, *SRSF12*, *ACTL7A* und *SYTL4* vollständig segregieren, also alle Erkrankten die Mutation aufweisen, die Gesunden jedoch nicht. Das Gen *AEBP1* segregiert nicht vollständig, da die Person mit der DNA #19693 zwar erkrankt ist, jedoch keine Mutation im Gen aufweist. Es könnte sich hierbei um eine Phänokopie handeln, also um eine Brustkrebserkrankung ohne genetische Disposition. Eine abschließende Betrachtung dieses Punktes erfolgt später.



### 3.1.2 Ergebnisse der Validierung aus Familie 19

Analog zur ersten untersuchten Familie (Familie 2) wurde bei der zweiten zu untersuchenden Familie (Familie 19) vorgegangen: auch hier wurden die durch die Exomsequenzierung (Ambry Genetics, USA) ermittelten, gemeinsamen Mutationen bei mehreren erkrankten Familienmitgliedern mittels In Silico- und Segregationsanalysen validiert, um Kandidatengene herauszufiltern.

#### 3.1.2.1 Ergebnisse der Vorhersageprogramme in Familie 19

In nachfolgender Tabelle finden sich die Ergebnisse der Vorhersageprogramme PolyPhen-2, SIFT und MutationTaster für die Missense-Mutationen in Familie 19.

Gen	Mutation	Protein ID	PolyPhen-2	SIFT	MutationTaster
ABCG2	R383H	Q9UNQ0-2	probably damaging 1,0	affect protein function 0,0	disease causing 0,999
ANK1	G1014S	P16157	probably damaging 1,0	affect protein function 0,01	disease causing 0,999
BARX2	H2L	Q9UMQ3	possibly damaging 0,845	affect protein function 0,0	disease causing 0,999
DISP1	L888R	Q96F81	benigne 0,23	tolerated 0.39	disease causing 0,999
DNAJC13	I1272V	O75165	possibly damaging 0,734	tolerated 0.14	disease causing 0,999
DPP10	K504N	Q8N608-2	benigne 0,001	tolerated 0.45	disease causing 0,535
ESYT3	S591N	A0FGR9	benigne 0,421	tolerated 0.17	Polymorphism 0,997
FAM149A	G219E	A5PLN7-2	benigne 0,095	tolerated 1,0	Polymorphism 0,999
FAM208B	G1117R	Q5VWN6	benigne 0,005	tolerated 0.47	Polymorphism 0,999
FAM89A	E116Q	Q96GI7	probably damaging 0,990	affect protein function 0,0	disease causing 0,999
FBXL18	A159V	Q96ME1-4	possibly damaging 0,908	tolerated 1,0	disease causing 0,873
FBXW5	TCTC/T	Q969U6	-	-	disease causing 0,999
GRID1	T223M	Q9ULK0	probably damaging 0,999	tolerated 0.12	disease causing 0,999
HIP1R	D408Y	O75146	probably damaging 0,995	affect protein function 0,02	disease causing 0,999
IARS2	E854Q	Q9NSE4	probably damaging 0,997	tolerated 0.21	disease causing 0,999
KDM4E	P127T	B2RXH2	benigne 0,001	tolerated 1,0	Polymorphism 0,999
KIF21A	N629S	F5H0C3	benigne 0,218	tolerated 0,73	disease causing 0,996
LRRC43	L1577R	Q8N309	probably damaging 0,965	tolerated 0.48	Polymorphism 0,999
LRRFIP2	D296G	Q9Y608	possibly damaging 0,495	tolerated 0.15	Polymorphism 0,553
MACF1	G3580D	Q9UPN3-2	probably damaging 1,0	tolerated 0.61	disease causing 0,999
N4BP2	Q95K	Q86UW6	benigne 0,028	tolerated 0.48	Polymorphism 0,999
NCL	TTCA/T	P19338	-	-	Polymorphism 0,999
NLRP5	R280H	P59047	benigne 0,001	tolerated 0.89	Polymorphism 0,999
NSUN2	H142Y	Q08J23-2	-	tolerated 0,11	disease causing 0,999
PGLYRP4	A283T	Q96LB8	possibly damaging 0,805	tolerated 0.56	Polymorphism 0,999
SELO	R495Q	Q9BVL4	benigne 0,433	tolerated 0.23	Polymorphism 0,873
SERPINB4	N220K	P48594	benigne 0,002	tolerated 1,0	Polymorphism 0,999
SLC22A1	S114R	O15245	possibly damaging 0,494	tolerated 0,11	disease causing 0,999
SPIRE1	N424K	Q08AE8-2	benigne 0,139	tolerated 0,85	disease causing 0,986

TBC1D1	R695C	Q86TI0-2	-	tolerated 0,11	Polymorphism 0,039
TCP10L2	G254R	B9ZVM9	probably damaging 1,0	tolerated 0.47	Polymorphism 0,999
TCP10L2	V255G	B9ZVM9	benigne 0,0	tolerated 0.47	Polymorphism 0,999
TTLL2	S129F	Q9BWW7	probably damaging 0,985	tolerated 0.30	-
TUBB8	W101S	Q3ZCM7	probably damaging 1,0	affect protein function 0,0	disease causing 0,999
UGT2B28	Q101R	Q9BY64-2	benigne 0,0	tolerated 0.52	Polymorphism 0,999
USH1C	R136Q	Q9Y6N9	probably damaging 1,0	tolerated 0.09	disease causing 0,999
ZNF642	E499K	Q49AA0	probably damaging 0,987	tolerated 0.13	Polymorphism 0,916
ZNF673	T120S	Q5JUW0-2	benigne 0,432	tolerated 0.70	Polymorphism 0,999
ZNF784	S264Y	Q8NCA9	probably damaging 0,995	affect protein function 0,0	Polymorphism 0,939
ZNF784	S264T	Q8NCA9	probably damaging 0,982	affect protein function 0,02	Polymorphism 0,996

Tabelle 13: Ergebnisse der Vorhersageprogramme in Familie 19.

### Einschätzung:

In dieser Familie stimmten alle drei Vorhersageprogramme bei nur 6 Genen überein, dass diese Varianten die Proteinfunktion wahrscheinlich oder sicher beeinflussen: *ABCG2*, *ANK1*, *BARX2*, *FAM89A*, *HIP1R* und *TUBB8*. Da in dieser Familie nach der Überprüfung durch die Vorhersageprogramme weniger Gene als in der ersten Familie übriggeblieben waren, wurden hier zudem Gene ausgewählt, bei denen lediglich zwei Vorhersageprogramme übereinstimmten, um die Auswahl zu erhöhen: *FBXW5*, *GRID1*, *IARS2*, *MACF1*, *USH1C* und *ZNF784*. Diese 12 Gene mit VUS, sowie die 2 Gene mit trunkierender Mutation, die in der Familie gefunden wurden, wurden in einem nächsten Schritt mittels Datenbankanalysen weiter validiert.

Die **trunkierenden** Mutationen, die in Familie 19 vorlagen und per se die Proteinfunktion beeinträchtigen sind in nachfolgender Tabelle aufgelistet:

Gen	Mutation	Protein ID	Trunkierende Mutation
EBNA1BP2	R296X	Q99848	Stop-Mutation
TXNDC8	Q50X	Q6A555	Stop-Mutation

Tabelle 14: Trunkierende Mutationen Familie 19.

### 3.1.2.2 Ergebnisse der Datenbankanalysen in Familie 19

Die Datenbankanalysen wurden analog zu Familie 2 durchgeführt. In der nachfolgenden Tabelle sind die Anzahl und die Mutation Load der VUS und trunkierenden Mutationen, die in der Datenbank des Exome Variant Server des NHBLI Grand Opportunity Exome Sequencing Projects (National Heart Blood and

Lung Institute) in den ausgewählten Genen während des Schreibens dieser Arbeit beschrieben waren aufgelistet. Auch hier wurden nur die Allele der europäisch-amerikanischen Bevölkerung (EA) berücksichtigt.

Gen	Position	rsID	Funktion	Allele	Häufigkeit in EA	Ø ST	ML
ABCG2	4:89015728	rs199897813	Splice	C>T	T=3/C=8597	110	49
	4:89034584	unbekannt	Frameshift	AC>A	A=36/AC=8218	160	
	4:89039366	rs200190472	Stop	G>A	A=1/G=8599	134	
	4:89039396	rs140207606	Stop	G>A	A=4/G=8596	118	
	4:89060950	unbekannt	Frameshift	ATTCGATAT AT>A	A=5/ TTCGATAATAT=8249	55	
ANK1	8:41543669	unbekannt	Frameshift	CTGTT>C	C=60/CTGTT=8194	127	60
BARX2	11:129306846	rs375622525	Stop	C>T	T=1/C=8593	40	1
EBNA1BP2	1:43630338	unbekannt	Frameshift	CTT>C, CTT>CT	C=0/CT=1/CTT=8253	70	1
FAM89A	1:231155683	rs138650916	Stop	G>A	A=1/G=8599	82	10
	1:231155873	rs150281521	Splice	C>G	G=1/C=8599	35	
	1:231175911	unbekannt	Frameshift	AC>A	A=8/AC=2770	1	
FBXW5	9:139835381	unbekannt	Frameshift	CA>C	C=22/CA=8190	19	25
	9:139835442	unbekannt	Frameshift	G>GGA	GGA=2/G=8140	56	
	9:139836910	unbekannt	Frameshift	C>CT	CT=1/C=8163	28	
GRID1	-	-	-	-	-	-	0
HIP1R	12:123343493	rs370849780	Splice	G>A	A=1/G=8599	37	1
IARS2	1:220300169	rs373436822	Stop	G>A	A=1/G=8599	213	3
	1:220316291	rs140172974	Stop	A>T	T=2/A=8598	116	
MACF1	1:39753018	unbekannt	Frameshift	GA>G	G=2/GA=8252	176	812
	1:39776023	unbekannt	Frameshift	CTGATCGC TGCCT>C	C=704/CTGATCGCTT GCGCT=7550	108	
	1:39878273	unbekannt	Frameshift	CTG>C	C=12/CTG=7910	93	
	1:39878467	rs376849966	Stop	A>T	T=1/A=8297	34	
	1:39879036	unbekannt	Frameshift	G>GC	GC=57/G=6853	5	
	1:39879078	unbekannt	Frameshift	CA>C	C=36/CA=5528	2	
TUBB8	10:93189	unbekannt	Frameshift	GAC>G	G=20/GAC=8226	78	626
	10:93500	unbekannt	Frameshift	TGCCCC>T GGCCCC, TGCCCC>T	TGGCCCC=269/T=38 /TGCCCC=6025	26	
	10:93501	unbekannt	Frameshift	GCCCC>G	G=299/GCCCC=6059	25	
TXNDC8	-	-	-	-	-	-	0
USH1C	11:17522651	unbekannt	Frameshift	A>AT	AT=1/A=8253	65	101
	11:17533499	unbekannt	Frameshift	CCT>C	C=83/CCT=8169	173	
	11:17533499	rs148115969	Stop	C>A	A=1/C=8585	173	
	11:17544454	unbekannt	Frameshift	GT>G	G=12/GT=8182	11	
	11:17548769	rs138138689	Splice	C>T	T=1/C=8585	109	
	11:17548803	rs377145777	Stop	G>A	A=1/G=8585	118	
	11:17552955	unbekannt	Frameshift	C>CG	CG=2/C=8252	31	
ZNF784	19:56133788	unbekannt	Frameshift	T>TC	TC=487/T=7129	7	670
	19:56133789	unbekannt	Frameshift	C>CG	CG=170/C=7400	8	
	19:56133999	unbekannt	Frameshift	A>AG	AG=13/A=8145	11	

Tabelle 15: Mutation Load in Familie 19; ST= Sequenziertiefe; ML=Mutation Load.

### Einschätzung:

Analog zu Familie 2 wurde auch hier die Anzahl der weiter zu untersuchenden Gene auf Basis einer Mutation Load von <5 trunkierenden Mutationen mit einer verlässlichen Sequenziertiefe (ST) von mindestens 10 auf die folgenden Gene reduziert: *BARX2*, *HIP1R*, *FAM89A*, *EBNA1BP2*, *TXNDC*, *GRID1* und *IARS2*.

### 3.1.2.3 Ergebnisse der Segregationsanalysen in Familie 19

Analog zu Familie 2 wurden im Anschluss oben ausgewählte Gene innerhalb der Familie 19 sequenziert, um festzustellen, ob das jeweilige Gen als Kandidatengen für den Brustkrebs in dieser Familie in Frage kommt.

Die Ergebnisse der Segregationsanalysen sind in nachfolgender Tabelle dargestellt. Auch hier wird mutierte DNS (m) von Wildtyp-DNS (wt) unterschieden. Zur besseren Übersicht wurden die DNS der Familienmitglieder, die in der Exomsequenzierung integriert waren (#22796, #22935 und #23923) mit angegeben.

Gen	Mutation	AS-Austausch	#22796	#22935	#23923	#24516	#24522	#24605
BARX2	c.5A>T	H2L	m	m	wt	m	wt	/
HIP1R	c.1222G>T	D408Y	m	m	wt	m	m	/
<b>FAM89A</b>	<b>c.346C&gt;G</b>	<b>E116Q</b>	<b>m</b>	<b>m</b>	<b>wt</b>	<b>wt</b>	<b>m</b>	<b>m</b>
EBNA1BP2	c.886G>A	R296*	m	m	wt	m	m	m
<b>TXNDC8</b>	<b>c.148G&gt;A</b>	<b>Q50*</b>	<b>m</b>	<b>m</b>	<b>wt</b>	<b>wt</b>	<b>m</b>	<b>m</b>
GRID1	c.668G>A	T223M	m	m	wt	m	m	m
IARS2	c.2560G>C	E854Q	m	m	wt	m	m	m
<b>Erkrankt</b>			ja	ja	nein	nein	ja	ja

Tabelle 16: Ergebnisse der Sequenzierungen in Familie 19; m=Mutation; wt=Wildtyp.

### Einschätzung:

Unter Berücksichtigung des klinischen Status der Familienmitglieder bezüglich des Vorliegens eines Mammakarzinoms ergaben sich für Familie 19 in der Segregationsanalyse die Kandidatengene ***TXNDC8*** und ***FAM89A***, da diese beiden Gene als einzige in der Familie komplett segregierten.

### 3.1.3 Ergebnisse der RNA-Isolierung

Um feststellen zu können, ob die beiden Kandidatengene der Familie 19 im Brustdrüsengewebe exprimiert werden und deren Mutationen als Ursache für den familiären Brustkrebs in Frage kommen, wurde aus tiefgefrorenem, benignem Brustdrüsengewebe RNA extrahiert und das RNA-Template anschließend in cDNA transkribiert. Mit dieser wurde im Anschluss daran eine PCR durchgeführt und getestet, ob sich die Primer der beiden Gene *FAM89A* und *TXNDC8* an die Matrize der Brustdrüsen-cDNA anlagern und diese vervielfältigt wird. Dies ist nur der Fall, wenn ein Gen in der Brustdrüsen-DNS exprimiert wird und so der Amplifikation durch die Polymerase zur Verfügung steht. Zur Erfolgskontrolle wurde anschließend eine Gelelektrophorese durchgeführt. Die Abbildung 2 zeigt das Ergebnis der Gelelektrophorese nach erfolgter DNS-Amplifikation in der PCR.

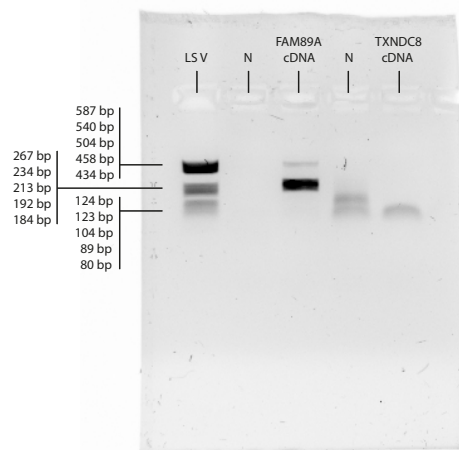


Abbildung 2: Gelelektrophorese mit der cDNA der beiden Gene *FAM89A* und *TXNDC8*

Im Gelbild lässt sich anhand des Bandenmusters erkennen, dass in der PCR nur der Abschnitt des Gens *FAM89A* vervielfältigt wurde. Beim Gen *TXNDC8* lassen sich keine PCR-Produkte erkennen. Die angedeuteten Schatten entsprechen am ehesten den Primern, die für die Amplifizierung verwendet wurden. Das lässt darauf schließen, dass *TXNDC8* nicht in der Brustdrüse der Frau exprimiert wird und somit nicht als Kandidatengenen für den Brustkrebs in dieser

Familie in Frage kommt. Demnach blieb in dieser Familie das Gen **FAM89A** mit einem auffälligen Aminosäureaustausch als einziger Kandidat übrig.

### 3.2 Kontrolle des Kandidatengens *AEBP1* in einem *BRCA1* / *BRCA2*-negativen Patientenkollektiv

Nach der Ermittlung der Kandidatengene in beiden untersuchten Familien durch die Vorhersageprogramme, Datenbank- und anschließende Segregationsanalysen, wurde das Gen *AEBP1* aus Familie 2 ausgewählt, um in einem größeren Patientenkollektiv nach weiteren Mutationen zu suchen. Hierzu wurden die DNS von 149 an Brustkrebs erkrankten *BRCA1*- und *BRCA2*-negativ getesteten Patientinnen der Risikogruppe A aus dem Bestand der Forschergruppe des Zentrums München auf Abweichungen in der DNS-Sequenz untersucht. Es handelt sich hierbei um je eine Indexpatientin pro Familie, in der mindestens drei Patientinnen an Brustkrebs erkrankt sind, zwei davon prämenopausal. Eine Liste der verwendeten DNS inklusive Erkrankungsalter der Patientinnen bei Erstdiagnose findet sich im Anhang.

#### 3.2.1 Primerauswahl und Testung

In einem ersten Schritt wurden die Primer aller 21 Exons des Gens *AEBP1* anhand des Gen-Alignments des USCS Genome Browser (University of California Santa Cruz) ausgewählt und mittels Real-Time PCR auf ihre Eignung getestet. Große Exons wurden zur besseren Beurteilbarkeit geteilt, kleinere zusammengelegt. Im Anhang findet sich eine Liste der endgültig verwendeten Primer.

#### 3.2.2 Evaluierung der Methode am Beispiel *AEBP1*

Zur Evaluierung der Methode wurden die 21 Exons des Gens *AEBP1* einzeln in der DNS der Patientinnen mittels Real time quantitative PCR und High Resolution Melting, bzw. DHPLC auf abweichende Basenabfolgen untersucht. Bei Auffälligkeiten in der Schmelzkurve, die auf eine Mutation im amplifizierten Genabschnitt hinwiesen, wurde das entsprechende Exon der DNS mittels Touchdown-PCR vervielfältigt und anschließend nach Sanger sequenziert. Die

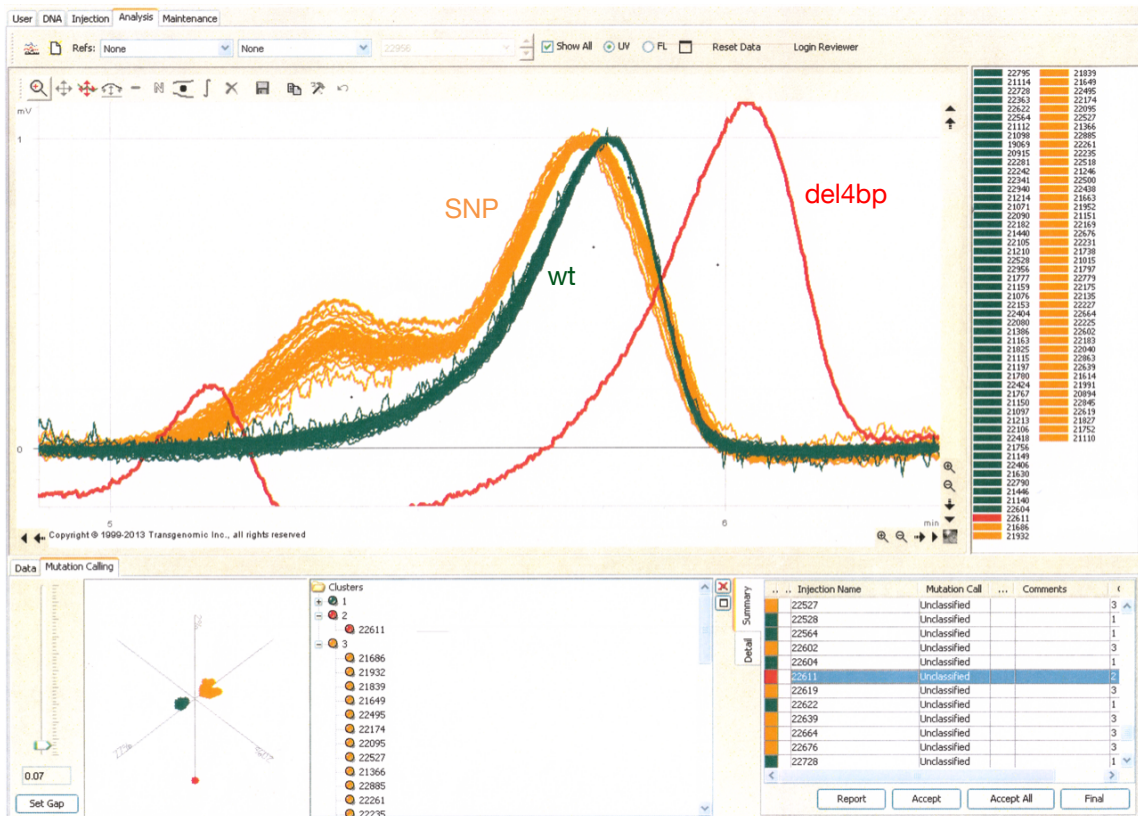
Sequenzen wurden im Anschluss daran mit dem CodonCode Aligner® ausgewertet. In den Fällen, in denen die Schmelzkurven im LightCycler aufgrund eines hohen C- und G-Basen – Gehaltes eines Exons durch stärkere Bindung der Basenpaare und folglich erschwerter Aufschmelzung schlecht auswertbar waren, wurde der Versuch mit der DHPLC wiederholt. Bei auffälligen Kurvenverläufen wurde hier ebenso verfahren wie oben. Sequenzvariationen sind in der DHPLC an einem doppelgipfligen Kurvenverlauf zu erkennen, Wildtyp-DNS dagegen weist einen einfachen Kurvenverlauf auf.

### 3.2.3 Ergebnisse: Varianten und Mutationen

Bei auffälligen Kurvenverläufen im High Resolution Melting und in der DHPLC wurde der entsprechende Genabschnitt mittels Touchdown-PCR amplifiziert und anschließend nach Sanger sequenziert. Bei den identifizierten Sequenzvariationen wurden bekannte SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms), also genetische Varianten, die im USCS Genome Browser (University of California Santa Cruz) beschrieben waren, von trunkierenden, das Genprodukt verändernden Mutationen, unterschieden.

Sowohl im High Resolution Melting, als auch in der DHPLC konnten in mehreren Exons des Gens *AEBP1* bekannte SNPs identifiziert werden.

Mittels DHPLC konnte jedoch auch eine trunkierende Frameshift-Mutation im Exon 7 des Gens *AEBP1* identifiziert werden. In der folgenden Abbildung ist der doppelgipflige Kurvenverlauf der DNS mit der Nummer #22611 (rot) im Gegensatz zu mehreren Wildtyp-DNS (grün) und DNS mit Polymorphismen (orange) im Exon 7 des Gens *AEBP1* zu erkennen:



User: WADMIN      Project: AEBP      Sample Name: 22611  
 Tray: AEBP1\_Ex7\_MUC2      Temp(min): 63.9°C      Press.(min): 699 psi      Vial: 81      Volume: 10µL  
 Method: AEBP1\_7\_63.9-63.9C      Temp(max): 63.9°C      Press.(max): 733 psi      Injection Date: 2013-11-16 05:57:12.0  
 Comments:

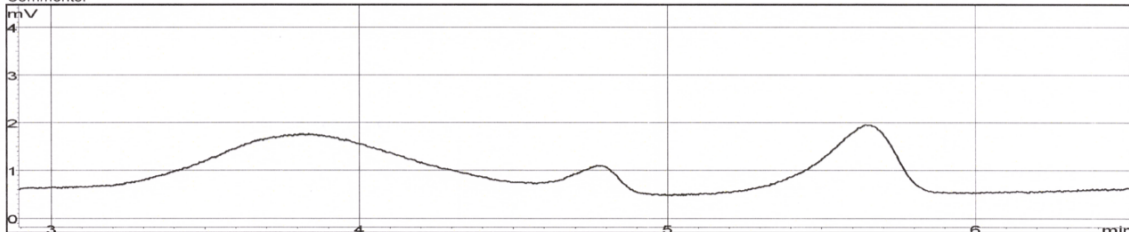


Abbildung 3+4: Mutation del4bp in AEBP1 in der DHPLC, Exon 7, DNS #22611

Bei der anschließenden Sequenzierung nach Sanger wurde eine trunkierende Mutation in der untersuchten DNS bestätigt. Es handelte sich dabei um eine Deletion von 4 Basenpaaren (AGAC) im Exon 7 des Gens AEBP1 mit Verschiebung des Leserasters:

DNS #	Bestand	Leipzig-ID	Mutation	AS-Austausch
22611	München	14-1283-301	c.996delAGAC	T332fs

Tabelle 17: Frameshift-Mutation in Exon 7 des Gens AEBP1



In nachfolgender Abbildung wird die Auswertung der mutierten Sequenz mittels des CodonCode Aligner® wiedergegeben. Um herauszufinden, ob die gefundene Mutation in der Familie der Patientin (#22611) segregiert, ob also auch weitere erkrankte Familienmitglieder diese Mutation vorweisen, wurde die DNA der ebenfalls an Brustkrebs erkrankten Mutter der Patientin (#22714) auf eine Mutation im Gen *AEBP1* untersucht und parallel ausgewertet.

Durch die Deletion von 4 Basenpaaren in der mutierten DNS-Sequenz der Tochter erscheint diese im darauffolgenden DNS-Abschnitt überlagert, während die DNA-Sequenz der Mutter deutlich lesbar ist:

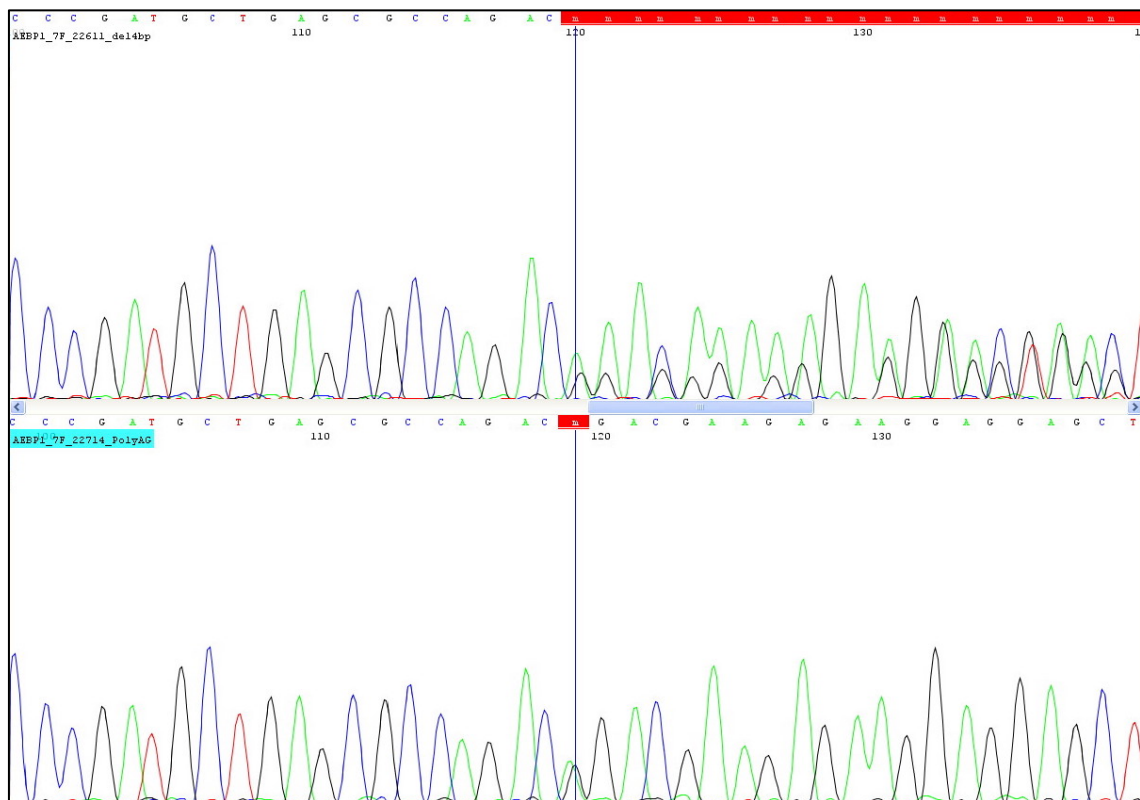


Abbildung 4: Ergebnis der Sequenzanalyse: c.996delAGAC im Gen *AEBP1* Exon7 der DNS #22611 im Vergleich zu nicht mutierter DNS #22714

#### Einschätzung:

In der Sequenzanalyse zeigte sich also, dass die erkrankte Tochter die Mutation aufweist, während sie bei der erkrankten Mutter nicht nachgewiesen werden konnte. Somit segregiert in dieser Familie die in *AEBP1* gefundene Mutation nicht. Allerdings ist die Mutter deutlich später erkrankt und eine Belastung der

väterlichen Linie kann aufgrund einer limitierten Familienanamnese nicht ausgeschlossen werden.

### 3.3 Weitere Mutationen im *ACTL7A*-Gen

Wie oben beschrieben, segregiert in der Familie nicht nur eine trunkierende Mutation im *AEBP1*-Gen, sondern auch eine Mutation im *ACTL7A*-Gen. Dieses Gen wurde experimentell nicht weiter validiert, aber es wurde eine Auswertung der untersuchten Exome durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass sich insgesamt 3 trunkierende Mutationen in 950 untersuchten Exomen befinden. Die Mutationen in einer weiteren Familie aus unserem Zentrum und einer Familie der Universität Köln wurden durch eine Sanger-Sequenzierung bestätigt (siehe Diskussion).

## 4 Diskussion

### 4.1 Diskussion der Methoden

In dieser Arbeit wurden in zwei ausgewählten Hochrisikofamilien mit mehreren jung an Brustkrebs erkrankten Frauen Kandidatengene für ein erbliches Mammakarzinom validiert. Hierbei ergaben sich Fehlerquellen, die bei der Interpretation der Ergebnisse beachtet werden müssen. Zum einen können in der initialen Exomsequenzierung gemeinsame Mutationen übersehen worden sein; zum anderen wird bei der Exomsequenzierung ausschließlich der kodierende Bereich mit direkt anschließenden Intronsequenzen der DNS untersucht. Dabei werden mögliche regulatorische Bereiche außerhalb der kanonischen Spleißsequenzen und intergenische Bereiche nicht untersucht. Es wird vermutet, dass ca. ein Drittel aller Mutationen bei familiärem Brustkrebs sich in den intergenischen Bereichen, wie z. B. Long noncoding RNAs oder entfernt liegende „Enhancer“, befinden (A. Meindl, persönliche Mitteilung).

Des Weiteren ist es möglich, dass die Einschätzungen der verwendeten Vorhersageprogramme über den Charakter einer Mutation nicht optimal sind. Um dieses Risiko so gering wie möglich zu halten, wurden in dieser Arbeit drei verschiedene Vorhersageprogramme verwendet und eine Mutation erst dann als potentiell pathogen eingestuft, sobald mindestens zwei, bzw. alle drei Programme in ihrer Einschätzung übereinstimmten.

Bei der Auswahl der Hochrisiko-Familien muss berücksichtigt werden, dass nicht bei allen Familienmitgliedern eine Tumorphistologie und damit eine unabhängige Bestätigung des Mammakarzinoms vorliegt, weil beispielsweise die Operation des Tumors bereits Jahrzehnte zurückliegt. So mussten wir uns teilweise auf die mündlich geäußerte Familienanamnese der Indexpatientinnen verlassen.

## 4.2 Eigene Daten

### 4.2.1 Auswahl der Kandidatengene

Die Entscheidung, das Gen *AEBP1* in einem größeren Patientenkollektiv weiter zu validieren, beruhte neben der Tatsache, dass es sich bei der familiären Mutation um eine trunkierende Mutation handelt, zum einen auf seiner biologischen Bedeutung als entscheidender Regulator der funktionellen Differenzierung und der Involution des Brustdrüsenepithels (Zhang et al., 2011) und zum anderen auf der fast vollständigen Segregation in der Familie 2.

Bei dem anderen Gen, *ACTL7A*, das in der Familie 2 komplett segregiert, hätte es sich um einen sogenannten „Modifizier“ handeln können, der den Krankheitsverlauf aufgrund einer Gen-Gen-Interaktion beeinflusst. Bei *BRCA1*- und *BRCA2*-Mutationsträgerinnen beispielsweise gibt es einige Hinweise darauf, dass das Brustkrebsrisiko von anderen genetischen Faktoren modifiziert wird (Antoniou et al., 2006). Die Tatsache, dass Frauen, die auf ihre familiäre *BRCA1/2*-Mutation negativ getestet wurden, trotzdem ein erhöhtes Brustkrebsrisiko aufweisen (Smith et al., 2007), könnte auf vererbte Genvarianten zurückzuführen sein, die bei *BRCA1/2*-Mutations-Trägerinnen als Modifizier-Gene und bei *BRCA1/2*-negativ getesteten Patientinnen als niedrig-penetrante Polymorphismen wirken (Ripperger et al., 2009).

Aktuelle Daten aus dem noch laufenden PERSPECTIVE-Projekt des Helmholtz-Zentrums legen allerdings nahe, dass die Mutation im Gen *ACTL7A* möglicherweise sogar penetranter ist als die Mutation im Gen *AEBP1* (siehe unten).

In der Familie 19 ist *FAM89A* als einziges Gen übriggeblieben. Es könnte sich bei der familiären Mutation in diesem Gen um die entscheidende, den Brustkrebs auslösende Mutation handeln, jedoch muss die Möglichkeit bedacht werden, dass in dieser Familie im Verlauf der gentechnischen Untersuchungen, z.B. im Zuge der Exomsequenzierung oder der Verwendung der Vorhersageprogramme weitere Kandidatengene übersehen worden sind.

#### 4.2.2 Nur fast vollständige Segregation von *AEBP1*

Bei Betrachtung des Stammbaums der Familie 2 fällt ein Familienmitglied (#19693) auf, das zwar an Brustkrebs erkrankt war, jedoch keine Mutation im Gen *AEBP1* aufwies. Es könnte sich hier aber um eine sogenannte Phänokopie handeln, da die Patientin im Gegensatz zu ihren Verwandten bei Erstdiagnose bereits 77 Jahre alt war. Da drei jung an Brustkrebs erkrankte Familienmitglieder (44 Jahre, 46 Jahre und 56 Jahre bei Erstdiagnose) die Mutation im Gen *AEBP1* aufweisen und drei gesunde Familienmitglieder nicht, kann davon ausgegangen werden, dass *AEBP1* in dieser Familie nahezu komplett segregiert.

In der Familie (TU1283) aus dem *BRCA1/2*-negativen Patientenkollektiv des Bestandes der Forschergruppe des Zentrums München konnte die in der Analyse gefundene trunkierende Mutation im Gen *AEBP1* nur bei einem Familienmitglied (ED 45 Jahre mit Mammakarzinom beidseits) nachgewiesen werden; die ebenfalls an Brustkrebs erkrankte Mutter dieser Patientin (ED 60 Jahre) wies die Mutation nicht auf, so dass *AEBP1* hier nicht segregiert. Aber auch hier ist das unterschiedliche Alter bei Erstdiagnose zu bedenken.

### 4.3 Weitere *AEBP1*-Mutationen in der Exom-Analyse

Neben den 149 an Brustkrebs erkrankten, *BRCA1/2*-negativen Patientinnen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, erfolgte parallel eine Untersuchung des *AEBP1*-Gens mittels Exomsequenzierung im Rahmen des PERSPECTIVE-Projekts des Helmholtz Zentrums. Dabei wurden die Exome von weiteren 874 Brustkrebspatientinnen auf vorliegende Varianten im Gen *AEBP1* untersucht.

#### 4.3.1 Ergebnisse der Exomsequenzierung: trunkierende und Missense – Mutationen im Gen *AEBP1*

Im Rahmen dieser Analyse konnten vier weitere Missense-Mutationen sowie eine trunkierende Stop-Mutation, die innerhalb einer Familie bei zwei Familienmitgliedern nachgewiesen werden konnte, identifiziert werden. Diese waren alle in den Fällen nachweisbar, in den Kontrollen sind sie dagegen nicht gefunden worden. Die Ergebnisse sind in nachfolgender Tabelle aufgeführt.

DNA#	Bestand	Leipzig-ID	HGVS-nomenclature	Funktion	HGVS-Protein
25094	Quebec	04-2030-302	c.267G>C	Missense	K89N
24158	Quebec	14-1948-205	c.1225G>T	Missense	G409C
22097	Tim Strom	14-1022-401	c.916_917insA	Stop	Y306*
23010	Tim Strom	14-1022-302	c.916_917insA	Stop	Y306*
-	Köln	09-5317-001	c.1175C>T	Missense	S392L
-	Köln	09-6302-001	c.1692C>G	Missense	H564Q

Tabelle 18: Ergebnisse der Exomsequenzierung - trunkierende und Missense-Mutationen

#### 4.3.2 Missense-Mutationen in den Vorhersageprogrammen

Um eine Aussage über den Einfluss der Missense-Mutationen auf die Proteinfunktion treffen zu können, wurden abermals die webbasierten Vorhersageprogramme SIFT des J. Craig Venter Institutes, PolyPhen-2 und MutationTaster verwendet. Die Ergebnisse sind in nachfolgender Tabelle aufgeführt.

Gen	Mutation	Protein ID	PolyPhen-2	SIFT	MutationTaster
<i>AEBP1</i>	K89N	Q8IUX7	probably damaging 0,998	affect protein function 0,04	disease causing 0,744
<i>AEBP1</i>	G409C	Q8IUX7	probably damaging 1,0	affect protein function 0,00	disease causing 0,999
<i>AEBP1</i>	S392L	Q8IUX7	probably damaging 0,976	affect protein function 0,00	disease causing 0,999
<i>AEBP1</i>	H564Q	Q8IUX7	probably damaging 0,999	affect protein function 0,00	disease causing 0,999

Tabelle 19: Ergebnisse der Vorhersageprogramme für die Missense-Mutationen aus der Exomsequenzierung des Gens *AEBP1*

Bei allen vier Missense-Mutationen stimmten alle drei Vorhersageprogramme überein, dass diese Varianten die Proteinfunktion wahrscheinlich oder sicher beeinflussen. Zu diesem Zeitpunkt der Arbeit erhärteten diese Ergebnisse die Einschätzung, dass es sich bei dem Gen *AEBP1* um ein mögliches Kandidatengen handelt.

#### 4.3.3 Einschätzung der trunkierenden Mutationen im Gen *AEBP1*

Die Annahme, dass es sich bei *AEBP1* um ein mögliches Kandidatengen handeln könnte, wurde hauptsächlich durch die Tatsache unterstützt, dass insgesamt 3 Mutationen (2x in 874 Exomen und 1x in 149 validierten Familien) in familiär Erkrankten (3 in 1023 = 0,0029), aber nur 127 in 125.000 gesunden Kontrollen (0,0010) entsprechend der GNOMAD-Datenbank (p-value = 0.0899,

OR = 2.89) und 18 in 25.000 gesunden Kontrollen (0,0007) entsprechend der ExAC (Soria et al.)-Datenbank gefunden wurden. Wenn wir ein Folgepanel von 250 Kandidatengen analysieren würden, müssten wir insgesamt 10461 Fälle, d.h. 9438 zusätzliche Fälle einschließen, um in 80% der Fälle eine statistische Signifikanz zu erreichen.

Interessanterweise wurde die zweite trunkierende *AEBP1*-Mutation auch bei einer 21-jährigen Brustkrebspatientin gefunden (14-1022), bei der ebenfalls die Kosegregation mit einer zusätzlichen Mutation wahrscheinlich ist. Nach aktuellen Daten scheint aber insgesamt das ko-segregierende *ACTL7A*-Gen, das im Folgenden beschrieben wird, interessanter zu sein als *AEBP1*.

#### 4.4 Das ko-segregierende Gen *ACTL7A*

Der experimentelle Fokus dieser Arbeit lag auf dem Gen *AEBP1*, das aufgrund seiner eingangs beschriebenen biologischen Bedeutung bei der Brustdrüsenentwicklung als gutes Kandidatengen erschien.

Im Laufe der Arbeit wurde jedoch ein weiteres Gen identifiziert, das ebenfalls in der Familie 2 mutiert ist und das, wie später im Rahmen dieser Arbeit gezeigt wurde, im Gegensatz zu *AEBP1* vollständig in der Familie segregiert: das Gen *ACTL7A*.

##### 4.4.1 Das Gen *ACTL7A*

Das Gen *ACTL7A* ist aus vielerlei Hinsicht für weitere Betrachtungen interessant. Zum einen segregiert es in Familie 2 komplett, das heißt, alle an Brustkrebs erkrankten Familienmitglieder sind Träger der Mutation, alle Gesunden zeigen diese Mutation nicht. Zudem wurden im Zuge der PERSPECTIVE-Studie zwei weitere trunkierende Mutationen im Gen *ACTL7A* gefunden, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit experimentell bestätigt wurden: in dem Münchener Kollektiv (14-1185-401) wurde eine Stopmutation (c.463C→T, p.Arg155X) gefunden, im Kölner Kollektiv eine weitere „frameshift“-Mutation (c.74dupC = p.Gln26Thrfs\*31). Die getestete Patientin aus der Familie 1185 erkrankte mit 31 Jahren und zeigt eine zusätzliche Mutation im *DARS2*-Gen. Nach ersten vorläufigen Auswertungen handelt es sich bei letzterem ebenfalls eher um ein

Niedrigrisikogen (A. Meindl, persönliche Mitteilung), so dass wir davon ausgehen, dass in dieser Familie noch ein anderes, bis jetzt unbekanntes Gen, verändert ist. In der Kölner Familie ko-segregiert nach Angaben von PD Dr. Eric Hahnen eine *FANCM*-Mutation, bei der es sich aber auch eher um eine moderate Genmutation handelt.

Der stärkste Hinweis auf ein vermutlich moderates Kandidatengen für Brustkrebs ergibt sich allerdings wiederum durch einen Vergleich mit den Mutationsfrequenzen bei gesunden Kontrollen. Während insgesamt 3 trunkierende Mutationen in 950 untersuchten Exomen gefunden wurden ( $3 \text{ in } 950 = 0,0032$ ), befinden sich nur 87 LOF-Mutationen (= loss of function) in ca. 125.000 gesunden Kontrollen ( $0,0007$ ) entsprechend der GNOMAD-Datenbank ( $p\text{-value} = 0.03098$ ,  $OR = 4.54$ ) und nur 17 LOF-Mutationen in 26.000 gesunden Kontrollen ( $0,00065$ ) entsprechend der ExAC-Datenbank. Damit scheinen die Mutationen in den familiären Fällen deutlich überrepräsentiert zu sein. Hinzu kommt noch, dass gegenwärtig nicht ausgeschlossen ist, dass einige in der Gnomad-Datenbank gemeldeten Mutationen im *ACTL7A*-Gen aus dem Paralog *ACTL7B* stammen.

Wenn wir ein Folgepanel von 250 Kandidatengenen analysieren würden, müssten wir insgesamt 5634 Fälle, d.h. 4684 zusätzliche Fälle einschließen, um in 80% der Fälle eine statistische Signifikanz zu erreichen.

#### 4.4.2 Funktion des *ACTL7A*-Proteins

Es gibt zwei Formen dieses Gens: *ACTL7A* wird in vielen menschlichen Geweben exprimiert, während *ACTL7B* testisspezifisch ist und zu einem geringen Anteil in der Prostata exprimiert wird (Chadwick et al., 1999).

Tanaka et al. zeigten, dass *ACTL7A* als *t-actin2* (= *mACTL7A*) neben *ACTL7B* als *t-actin1* (= *mACTL7B*) im Hoden der Maus exprimiert wird und eine wichtige Rolle bei der Spermiogenese und in der Spermienfunktion einnimmt (Tanaka et al., 2003). Sowohl im Genom der Maus, als auch beim Menschen sind beide Gene Kopf-an-Kopf positioniert und weisen keine Introns auf (Hisano et al., 2003). Besonders interessant sind die Ergebnisse einer genomweiten Assoziationsstudie aus dem Jahr 2011: Fletcher et al. verglichen mehrere hunderttausend Single Nucleotid Polymorphismen in den Genomen von 1694 Brustkrebs-



patientinnen und 2365 Kontrollen, um neue sogenannte „susceptibility loci“ zu identifizieren, also Bereiche im Genom, die den Menschen für Brustkrebs anfälliger machen (Fletcher et al., 2011). Dabei ging es wiederum um Patientinnen ohne Mutation in den Brustkrebsgenen *BRCA1* und *BRCA2*. Das familiäre Risiko dieser Patientinnen lässt sich durch ein polygenes Modell erklären, bei dem eine große Anzahl von Varianten mit geringer Penetranz zusammen ein sehr unterschiedliches Risiko in der Bevölkerung, an Brustkrebs zu erkranken, zur Folge haben (Pharoah et al., 2002). In der Studie von Fletcher et al. konnte ein solcher Bereich im Genom des Menschen, der mit einem niedrigen Brustkrebsrisiko assoziiert ist, identifiziert werden (9q31.2). Dabei lagen die Gene *KLF4*, *RAD23B* und *ACTL7A* in der Nähe eines identifizierten SNP (Fletcher et al., 2011). *KLF4* ist ein Transkriptionsfaktor, der in der Tumorsuppression und Onkogenese eine Rolle spielt, wobei ein verminderter Spiegel von *KLF4*-RNA-Transkripten bei Brustkrebs und eine Assoziation zwischen *KLF4*-Expression und einer Östrogenrezeptor-Positivität gezeigt werden konnte (Akaogi et al., 2009). *RAD23B* und die aktinverwandte Proteinfamilie, zu der auch *ACTL7A* gehört, sind in diverse zelluläre Prozesse involviert, wie z.B. Vesikeltransport, Spindelapparat, Kernmigration und Chromatin-Remodellierung (Maglott et al., 2005).

Auch diese biologischen Befunde sprechen dafür, dass es sich bei *ACTL7A* um ein interessantes moderates Kandidatengen für erblichen Brustkrebs handelt, das in Familie 2 mit *AEBP1*, dem Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit, ko-segregiert. Dies ist sehr wahrscheinlich auch der Fall bei der 31-jährigen Patientin aus der zweiten Münchner Familie 1185, in der aber vermutlich ein stärker penetrantes Gen ko-segregiert.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Der Fokus dieser Arbeit lag hauptsächlich auf dem Gen *AEBP1*, das aus biologischer Sicht ein interessantes Kandidatengen für das erbliche Mammakarzinom darstellt: zum einen aufgrund seiner Rolle beim Erhalt der normalen Gewebsarchitektur und Funktion des Brustdrüsengewebes sowie seiner kontrollierenden Funktion bei der Interaktion zwischen Stroma und Epithel in der Brustdrüse (Zhang et al., 2011). Nachdem *AEBP1* zunächst mittels Datenbank- und Segregationsanalysen und anschließend durch Kontrollen an einem Patientenkollektiv von 149 Patientinnen als Kandidatengen untersucht worden ist, wurde das Gen in einem nächsten Schritt durch eine Exomsequenzierung mit 874 Patientinnen als mögliches Kandidatengen für das familiäre Mammakarzinom validiert. Es handelt sich hierbei um ein Gen, das weniger als ein halbes Prozent bei Patientinnen mit einem erblichen Mammakarzinom mutiert ist und kann somit der Kategorie der moderat-penetranten Gene zugeteilt werden.

Dies gilt vermutlich noch eher für das Gen *ACTL7A*: sehr selten mutiert, moderat penetrant und vermutlich öfters ko-segregierend mit anderen moderat penetranten Genen. Um in 80% der Fälle eine statistische Signifikanz zu erreichen, müssten wir beim Analysieren eines Folgepanels von 250 Kandidatengenen insgesamt 5634 Fälle, d.h. 4684 zusätzliche Fälle einschließen.

Durch die vorliegende Arbeit wurde eine digene („different compound heterozygote“) Vererbung in einer großen Familie gezeigt und damit zwei aussichtsreiche moderate Kandidatengene für folgende, größere Validierungsstudien identifiziert.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei nachstehenden Personen besonders bedanken, ohne deren Mithilfe diese Promotion niemals zustande gekommen wäre:

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. Alfons Meindl, für das Überlassen dieses interessanten Themas, das mich auf meinem Weg zur Fachärztin für Gynäkologie und Geburtshilfe weiterhin täglich begleitet. Darüber hinaus möchte ich mich für die langjährige professionelle und warmherzige Unterstützung während aller Phasen der Dissertation bedanken.

Die Arbeit im Labor der gynäkologischen Tumorgenetik am Klinikum Rechts der Isar war sehr vielfältig und auch auf persönlicher Ebene sehr bereichernd, da mich das Team um Heide Hellebrand, Stefanie Engert, Marco Bertone, Juliane Ramser, Kathrin Holz und André Kis sehr herzlich aufgenommen, täglich unterstützt und auf all meine Fragen immer eine Antwort gewusst hat. Liebe Heide, ich bin dir von Herzen dankbar, dass du mich unter deine Fittiche genommen hast!

Ich danke Mike Dufault für seine vorausgehende Arbeit, die Genlisten mit gemeinsamen Mutationen innerhalb einer Familie, die die Basis unserer weiteren Untersuchungen darstellten.

Vielen Dank auch an Brigitte Berger-Piefke und Heide Ludwig aus dem Sekretariat der gynäkologischen Tumorgenetik für das Zurverfügungstellen der Stammbäume.

Ich möchte mich außerdem bei Prof. Dr. Bertram Müller-Myhsok, Forschungsgruppenleiter der statistischen Genetik des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie, für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung bedanken.

Ich danke meinem Ehemann Alexander Fritzemeyer für sein offenes Ohr, sein Verständnis und sein Wohlwollen, auch in den stressigeren Phasen meines Studiums.

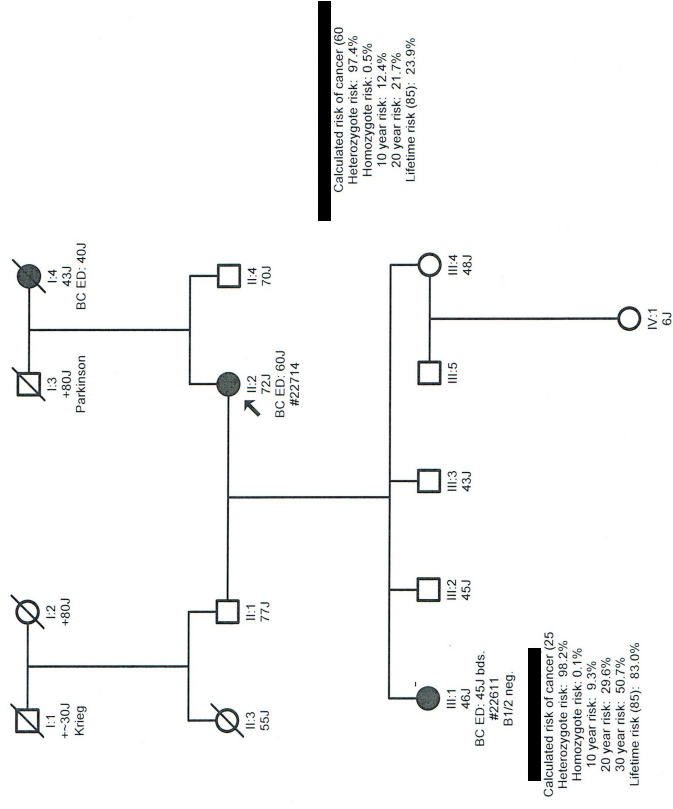
Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir mein Studium ermöglicht und mir während der Fertigstellung dieser Dissertation mit vielen motivierenden Gesprächen zur Seite gestanden haben. Ich möchte euch beiden, Jane und Jörg Grünler, diese Arbeit widmen.





# Stammbaum der Familie aus der Hochrisikogruppe A (TU 1283)

# 22611
# 22714



## Primerdesign

### Liste der für die PCR und Sequenzierung verwendeten Primer in Familie 2:

Name	Sequenz	Tm
ACTL7AEx1-F	5'-GCATCGTGGAGGACATCAAG-3'	62 °C
ACTL7AEx1-R	5'-ATGCTACAGGAATAAGCGCC-3'	60 °C
AEBP1-Ex21-F	5'-CAGGACTGAGTGGGAGGGT-3'	62 °C
AEBP1-Ex21-R	5'-CTATGGTAGTGCTCAGGGTG-3'	60 °C
GBF1-Ex18-F	5'-GGACAGTGACTAAAAGAGCC-3'	58 °C
GBF1-Ex18-R	5'-AGCTGGATTCTTCAGCCCTC-3'	60 °C
PDCD11-Ex31-F	5'-AACTCGTGACTTCCACCACA-3'	58 °C
PDCD11-Ex31-R	5'-CCCACAGGTTGAGAACTTC-3'	58 °C
UBN1-Ex17-F	5'-GTGTCTCCCTTGAAGTTTGG-3'	58 °C
UBN1-Ex17-R	5'-AACACCAAGCAGCAGAAAGG-3'	58 °C
SLC35G1-EX3-F	5'-CAGAACTGGGTTTATAGGCC-3'	58 °C
SLC35G1-EX3-R	5'-CAGAGAGGATGATGACACTTT-3'	57 °C
SRSF12-Ex4-F	5'-GTTGAGTGGTTGTTACTGTG-3'	56 °C
SRSF12-Ex4-R	5'-GGAAACAATGAGACCCTATC-3'	56 °C
SYTL4-Ex1-F	5'-TTTCAGGCAACTCTGGTAGC-3'	58 °C
SYTL4-Ex1-R	5'-CGTGACCCAATAAGTAGTGG-3'	58 °C

### Liste der für die PCR und Sequenzierung verwendeten Primer in Familie 19:

Name	Sequenz	Tm
BARX2-Ex1-F	5'-TCTCCTCCGCGCGCCAC-3'	62 °C
BARX2-Ex1-R	5'-TCTCGCCCTCGGATCGCAA-3'	63 °C
EBNA1BP2-Ex9-F2	5'-TGCCTAAGGGGCTTTGCTTA-3'	58 °C
EBNA1BP2-Ex9-R2	5'-CACATAGCAGCTTGCCTTCT-3'	58 °C
FAM89A-Ex2-F	5'-GAAGGAATGTGCTGGCAGG-3'	59 °C
FAM89A-Ex2-R	5'-GTCCACAACGGAGGTGCTT-3'	59 °C
GRID1-Ex4-F	5'-GGTGGAACGTGTTGCAGTTA-3'	58 °C
GRID1-Ex4-R	5'-CGTTTAGGCCATGCGTAAGA-3'	58 °C
HIP1R-Ex14-F	5'-GAGAGCTTGAAGAGAGAGGT-3'	58 °C
HIP1R-Ex14-R	5'-TCCTTCAGCTTGTGTAGCG-3'	58 °C
IARS2-Ex20-F	5'-TAAACTCAACCTGAGGCAGG-3'	58 °C
IARS2-Ex20-R	5'-AGTGCCCTTTTATGAAGCA-3'	56 °C
TXNDC8-Ex3-F	5'-GGCTCTAGGCTGTAGTAAA-3'	58 °C
TXNDC8-Ex3-R	5'-AATTACTGAGACAGTGCTATTC-3'	57 °C
FAM89A-cDNA-F	5'-CAAAGAGCTTGAGCGGGCT-3'	59 °C
FAM89A-cDNA-R	5'-TGCAGGGAGTTCTGCTCCT-3'	59 °C
TXNDC8-cDNA-F	5'-TTCTTCGAAACGGTGTGGTC-3'	58 °C
TXNDC8-cDNA-R	5'-CAGGTTGCTCATGAATCCAC-3'	58 °C

Liste der für die Real-Time PCR und die DHPLC verwendeten Primer des Gens

AEBP1:

Exon	Name	Sequenz	Tm	Kommentar
1	AEBP1-Ex1-F2	5'-TTCCTGGATTCCCTCACCC-3'	59 °C	Real-time PCR
	AEBP1-Ex1-R2	5'-TGGCCAGACCCTACCGAAT-3'	59 °C	
2a	AEBP1-Ex2-F2	5'-GAGCTGGCTCTGTTTCATTTG-3'	58 °C	Real-time PCR
	AEBP1-Ex2-R3	5'-GTGGCCTTGGGTGGCTTCT-3'	62 °C	
2b	AEBP1-Ex2-F3	5'-AAGGAGAAGCCACCCAAGG-3'	59 °C	Real-time PCR
	AEBP1-Ex2-R2	5'-ACCCGAGCAGGCAGTCAGA-3'	62 °C	
3 + 4	AEBP1-Ex3F-2	5'-CGCCCACCTGCTTCTGGA-3'	60 °C	DHPLC
	AEBP1-Ex4R-2	5'-CAGGTGGGGCTGGCAGGA-3'	62 °C	
5 + 6	AEBP1-Ex5/6F-2	5'-TGGGCCCATCCCAGCCTT-3'	61 °C	DHPLC
	AEBP1-Ex5/6R-2	5'-ACCTGCCTATGTCCCTCAGA-3'	60 °C	
7	AEBP1-Ex7/8/9-F	5'-TGTCCTGCTGAGCTCCTGT-3'	59 °C	DHPLC
	AEBP1-Ex7-R	5'-AGGTGGCCTTCAGGGCAG-3'	61 °C	
8	AEBP1-Ex8/9-F	5'-CATGGTCTCAAAGCCCAGA-3'	60 °C	Real-time PCR
	AEBP1-Ex8-R	5'-TCAGGAGTCCAGATGCTGC-3'	59 °C	
9	AEBP1-Ex9-F	5'-GCAGCATCTGGACTCCTGA-3'	59 °C	Real-time PCR
	AEBP1-Ex7/8/9-R	5'-TTGGGCCAGTCACTTGTCC-3'	59 °C	
10 + 11	AEBP1-Ex10/11-F	5'-TCCTTGGTTCTGGGTTTGGT-3'	58 °C	Real-time PCR
	AEBP1-Ex10/11-R	5'-GCCCACTGGAATCTCCTTAA-3'	58 °C	
12	AEBP1-Ex12-F	5'-AGCTCTTAAATTCTTGGGGC-3'	56 °C	Real-time PCR
	AEBP1-Ex12-R	5'-CAGGCCTCAGAGCAGTACT-3'	59 °C	
13 + 14	AEBP1-Ex13/14-F	5'-TGGCTCTGCTCCCATTGTCT-3'	60 °C	Real-time PCR
	AEBP1-Ex13/14-R	5'-AGAAGCACCAGGCACACAC-3'	59 °C	
15	AEBP1-Ex15-F	5'-TGGAAGTGGAAGGGGCATG-3'	59 °C	Real-time PCR
	AEBP1-Ex15-R	5'-CAAGCCAGAATCCCCAGAGA-3'	60 °C	
16	AEBP1-Ex16-F	5'-GTCTGGGTCCCTTCCTCAGCT-3'	63 °C	Real-time PCR
	AEBP1-Ex16-R2	5'-GCTACCCACACCCCCACAA-3'	62 °C	
17	AEBP1-Ex17-F2	5'-TGTGGGTAGCCGATGCCTA-3'	59 °C	Real-time PCR
	AEBP1-Ex17-R2	5'-CTGCTCCCTCCTGCCCTT-3'	62 °C	
18	AEBP1-Ex18-F	5'-ATGGAGGGTGATCGGGCTA-3'	59 °C	Real-time PCR
	AEBP1-Ex18-R	5'-GGACAGATACAGACCCAAAG-3'	58 °C	
19	AEBP1-Ex19-F	5'-GAGAGGGGCTGACTTTGGG-3'	62 °C	Real-time PCR
	AEBP1-Ex19-R	5'-ATCCAGGAGCCTGTGCAGC-3'	62 °C	
20	AEBP1-Ex20-F	5'-CTTCCTGAGGACCAGCAGC-3'	62 °C	Real-time PCR
	AEBP1-Ex19/20-R	5'-CTGCTCGCTGAGTTCCTCAA-3'	60 °C	
21a	AEBP1-Ex21-F	5'-CAGGACTGAGTGGGAGGGT-3'	62 °C	DHPLC
	AEBP1-Ex21-R	5'-CTATGGTAGTGCTCAGGGTG-3'	60 °C	



Liste *BRCA1/BRCA2* – negative Patientinnen der Risikogruppe A

(Gynäkologische Tumorgenetik Klinikum Rechts der Isar):

DNA#	Kat	ED	weitere Tumore	Leipzig-ID	Platte	Position
18726	A	39		04-0065-205	1	D2
10690	A	71		04-0113-303	1	A1
18888	A	40		04-0122-302	1	H2
20161	A	39		04-0127-403	1	A7
10885	A	39+39		04-0142-301	1	B1
18822	A	59		04-0162-401	1	F2
12340	A	38+57		04-0166-202	1	C1
12648	A	46+47		04-0207-302	1	D1
13290	A	39		04-0218-302	1	E1
13786	A	48		04-0232-301	1	F1
15737	A	44+44		04-0284-210	1	G1
18865	A	33+35		04-0300-301	1	G2
18706	A	45		04-0356-301	1	C2
20737	A	67		04-0358-201	1	B11
18444	A	45		04-0412-402	1	A2
18488	A	32	DCIS	04-0423-405	1	B2
20000	A	42		04-0504-302	1	E6
19023	A	58+62		04-0514-302	1	A3
19272	A	46		04-0589-301	1	D3
19251	A	46+46		04-0602-301	1	C3
19456	A	42+43		04-0615-202	1	H3
19447	A	25+33		04-0627-401	1	G3
19401	A	37+37		04-0636-301	1	F3
19458	A	49		04-0647-301	1	A4
19549	A	44		04-0651- /	1	C4
19514	A	39		04-0653-301	1	B4
19634	A	45		04-0662-302	1	F4
19679	A	46		04-0683-301	1	G4
20186	A	38+38		04-0691-203	1	E7
19861	A	40+40		04-0711-401	1	H5
19997	A	44		04-0748-302	1	D6
20095	A	39+52		04-0767-402	1	G6
20573	A	49		04-0768-202	1	C9
20179	A	40		04-0780-301	1	C7
20232	A	44		04-0785-405	1	F7
20583	A	28		04-0796-305	1	D9
20563	A	48		04-0797-302	1	A9
20527	A	46		04-0838-301	1	F8
20571	A		DCIS 44	04-0843-401	1	B9
20421	A	47		04-0847-401	1	H1
20646	A	48		04-0859-401	1	C10
20631	A	28		04-0900-401	1	A10
19072	A	46		14-0022-411	1	B3
19391	A	54		14-0033-301	1	E3

19833	A	49		14-0061-401	1	G5
19795	A	58		14-0067-309	1	F5
19556	A	41		14-0117-402	1	D4
19794	A	80		14-0147-202	1	E5
20178	A	42		14-0160-503	1	B7
19690	A	63	Uterus Ca 63	14-0176-302	1	H4
19773	A	40		14-0199-401	1	C5
19775	A	42+64		14-0202-401	1	D5
19901	A	43		14-0244-401	1	B6
19921	A	50		14-0251-307	1	C6
20054	A	46		14-0281-301	1	F6
20112	A	40		14-0286-319	1	H6
20303	A	40		14-0357-401	1	B8
20338	A	32+34		14-0369-301	1	C8
20499	A			14-0406- /	1	D8
20543	A	27+48		14-0433-401	1	G8
20604	A	28+32		14-0457-401	1	G9
20600	A	33		14-0467-401	1	F9
20820	A	27		14-0469-402	1	H11
20648	A	39		14-0478-301	1	E10
20767	A	40		14-0487-204	1	E11
20719	A	55		14-0500-401	1	A11
20761	A	37+37		14-0505-401	1	D11
20743	A	32+32		14-0513-302	1	C11
20870	A	50		14-0524-202	1	E12
20871	A	64		14-0524-205	1	F12
20833	A	39		14-0535-402	1	A12
20841	A	59		14-0538-302	1	C12
20802	A	41+47		14-0547-301	1	F11
20834	A	66		14-0551-301	1	B12
21825	A	54		04-0416-304	2	H5
22281	A	43		04-0648-302	2	A9
21114	A	44+44		04-0912-401	2	C2
21097	A	45		04-0955-305	2	G1
20894	A	43	DCIS 43	04-0963-301	2	B1
22602	A	49+57		04-0969-402	2	G10
21150	A	49+49		04-0986-305	2	G2
21151	A	50		04-1012-401	2	H2
21159	A	41		04-1014-801	2	A3
21149	A	43		04-1015-302	2	F2
21214	A	47		04-1034-503	2	F3
21446	A	51		04-1084-303	2	C4
21686	A	70		04-1105-305	2	H4
21630	A	53+53		04-1119-401	2	E4
21839	A	39		04-1159-501	2	B6
21932	A	38+48		04-1173-301	2	C6
22095	A	32		04-1207-301	2	A7
22106	A	44		04-1216-401	2	C7

22183	A	43+43		04-1228-401	2	B8
22182	A	63		04-1240-301	2	A8
22225	A	27+27		04-1243-401	2	C8
22341	A	43		04-1280-301	2	B9
22622	A	69		04-1283-302	2	C11
22495	A	37		04-1289-303	2	A10
22528	A	28		04-1322-301	2	E10
22619	A	72		04-1328-302	2	B11
22639	A	50		04-1341-302	2	D11
22676	A			04-1350-401	2	F11
22728	A	45		04-1365-401	2	G11
22845	A	41		04-1389-304	2	C12
22863	A	53		04-1393-301	2	D12
22363	A	49		14-0214-402	2	C9
21071	A	42+59		14-0496-317	2	E1
20915	A	48		14-0573-301	2	C1
21015	A	54		14-0616-401	2	D1
21112	A	42		14-0647-301	2	B2
21115	A	42		14-0653-407	2	D2
21110	A	46		14-0656-301	2	A2
21767	A	49		14-0663-304	2	D5
21140	A	38		14-0665-301	2	E2
21163	A	46		14-0667-501	2	B3
21752	A	31		14-0691-401	2	B5
21213	A	50		14-0696-301	2	E3
21210	A	43		14-0701-401	2	D3
21246	A	44		14-0705-305	2	G3
21386	A	50		14-0733-301	2	A4
21366	A	49		14-0752-301	2	H3
21440	A	36		14-0776-401	2	B4
21614	A	40+64		14-0815-301	2	D4
21663	A	46		14-0830-202	2	G4
21649	A	64		14-0834-301	2	F4
21738	A	43+51		14-0876-401	2	A5
21827	A	31		14-0892-304	2	A6
21952	A	30+47		14-0963-202	2	D6
21991	A	40+45		14-0979-307	2	E6
22040	A	49		14-1010-401	2	F6
22090	A	43		14-1036-401	2	H6
22080	A	45		14-1071-401	2	G6
22135	A		OvCa 37	14-1079-302	2	D7
22175	A	48		14-1084-301	2	H7
22956	A	32+38		14-1093-404	2	A1
22235	A	40		14-1094-302	2	F8
22418	A	42		14-1105-303	2	F9
22227	A	45		14-1115-202	2	D8
22231	A	41		14-1117-301	2	E8
22404	A	41		14-1168-404	2	D9

22406	A	37		14-1175-501	2	E9
22500	A	45	OvCa 38	14-1187-303	2	B10
22604	A	36		14-1274-303	2	H10
22611	A	45+45		14-1283-301	2	A11
22779	A	49		14-1353-401	2	H11
22795	A	46		14-1357-301	2	B12
22790	A	44		14-1360-301	2	A12
22885	A	40		14-1389-302	2	E12
22940	A	38+38		14-1461-401	2	F12

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Expression von <i>AEBP1</i> in unterschiedlichen Geweben .....	12
Abbildung 2: Gelelektrophorese mit der cDNA der beiden Gene <i>FAM89A</i> und <i>TXNDC8</i> .....	37
Abbildung 3+4: Mutation del4bp in <i>AEBP1</i> in der DHPLC, Exon 7, DNS #22611 .....	40
Abbildung 4: Ergebnis der Sequenzanalyse: c.996delAGAC im Gen <i>AEBP1</i> Exon7 der DNS #22611 im Vergleich zu nicht mutierter DNS #22714 .....	41

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien. ....	19
Tabelle 2: Reaktionsansatz zur Durchführung einer PCR. ....	20
Tabelle 3: Ablauf des Thermocyclings im TOUCHDOWN-Programm. ....	20
Tabelle 4: Reaktionsansatz für die Sequenzierung nach Sanger. ....	21
Tabelle 5: Ablauf des Thermocyclings bei der Sequenzierung nach Sanger. ....	21
Tabelle 6: Reaktionsansatz für eine Real-time quantitative PCR. ....	23
Tabelle 7: Ablauf der Real-time PCR und des High Resolution Melting im LightCycler®. ....	23
Tabelle 8: Reaktionsansatz für eine PCR in einer 96 Well Platte. ....	25
Tabelle 9: Ergebnisse der Vorhersageprogramme in Familie 2. ....	29
Tabelle 10: Trunkierende Mutationen Familie 2; X=Stop-Mutation; fs=Frameshift-Mutation. ....	29
Tabelle 11: Mutation Load in Familie 2. ....	31
Tabelle 12: Ergebnisse der Sequenzierungen in Familie 2; m=Mutation; wt=Wildtyp; PK=Phänokopie. ....	32
Tabelle 13: Ergebnisse der Vorhersageprogramme in Familie 19. ....	34
Tabelle 14: Trunkierende Mutationen Familie 19. ....	34
Tabelle 15: Mutation Load in Familie 19; ST= Sequenziertiefe; ML=Mutation Load. ....	35
Tabelle 16: Ergebnisse der Sequenzierungen in Familie 19; m=Mutation; wt=Wildtyp. ....	36
Tabelle 17: Frameshift-Mutation in Exon 7 des Gens AEBP1. ....	40
Tabelle 18: Ergebnisse der Exomsequenzierung - trunkierende und Missense- Mutationen. ....	46
Tabelle 19: Ergebnisse der Vorhersageprogramme für die Missense- Mutationen aus der Exomsequenzierung des Gens AEBP1. ....	46

## Literaturverzeichnis

- Adzhubei, I. A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V. E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A. S., & Sunyaev, S. R. (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*, 7(4), 248-249. doi:10.1038/nmeth0410-248
- Akaogi, K., Nakajima, Y., Ito, I., Kawasaki, S., Oie, S. H., Murayama, A., Kimura, K., & Yanagisawa, J. (2009). KLF4 suppresses estrogen-dependent breast cancer growth by inhibiting the transcriptional activity of ER $\alpha$ . *Oncogene*, 28(32), 2894-2902. doi:10.1038/onc.2009.151
- Alexander, C. M., Selvarajan, S., Mudgett, J., & Werb, Z. (2001). Stromelysin-1 regulates adipogenesis during mammary gland involution. *J Cell Biol*, 152(4), 693-703. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11266461>
- Antoniou, A. C., & Easton, D. F. (2006). Models of genetic susceptibility to breast cancer. *Oncogene*, 25(43), 5898-5905. doi:10.1038/sj.onc.1209879
- Ariad, S., Seymour, L., & Bezwoda, W. R. (1991). Platelet-derived growth factor (PDGF) in plasma of breast cancer patients: correlation with stage and rate of progression. *Breast Cancer Res Treat*, 20(1), 11-17. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1667486>
- Barham, W., Chen, L., Tikhomirov, O., Onishko, H., Gleaves, L., Stricker, T. P., Blackwell, T. S., & Yull, F. E. (2015). Aberrant activation of NF-kappaB signaling in mammary epithelium leads to abnormal growth and ductal carcinoma in situ. *BMC Cancer*, 15, 647. doi:10.1186/s12885-015-1652-8
- Baud, V., & Karin, M. (2001). Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol*, 11(9), 372-377. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11514191>
- Baud, V., & Karin, M. (2009). Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nat Rev Drug Discov*, 8(1), 33-40. doi:10.1038/nrd2781
- Brigham and Women's Hospital. PolyPhen-2: prediction of functional effects of human nsSNPs. Online verfügbar unter <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>, zuletzt geprüft am 28.02.2016.
- Burton, H., Chowdhury, S., Dent, T., Hall, A., Pashayan, N., & Pharoah, P. (2013). Public health implications from COGS and potential for risk stratification and screening. *Nat Genet*, 45(4), 349-351. doi:10.1038/ng.2582
- Chadwick, B. P., Mull, J., Helbling, L. A., Gill, S., Leyne, M., Robbins, C. M., Pinkett, H. W., Makalowska, I., Maayan, C., Blumenfeld, A., Axelrod, F. B., Brownstein, M., Gusella, J. F., & Slaugenhaupt, S. A. (1999). Cloning, mapping, and expression of two novel actin genes, actin-like-7A (ACTL7A) and actin-like-7B (ACTL7B), from the familial dysautonomia candidate region on 9q31. *Genomics*, 58(3), 302-309. doi:10.1006/geno.1999.5848
- Chapman, R. S., Lourenco, P. C., Tonner, E., Flint, D. J., Selbert, S., Takeda, K., Akira, S., Clarke, A. R., & Watson, C. J. (1999). Suppression of epithelial apoptosis and delayed mammary gland involution in mice with

- a conditional knockout of Stat3. *Genes Dev*, 13(19), 2604-2616.  
Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10521404>
- Charité Universitätsmedizin Berlin. MutationTaster. Online verfügbar unter <http://www.mutationtaster.org>, zuletzt überprüft am 28.02.2016.
- Dupont, J., Renou, J. P., Shani, M., Hennighausen, L., & LeRoith, D. (2002). PTEN overexpression suppresses proliferation and differentiation and enhances apoptosis of the mouse mammary epithelium. *J Clin Invest*, 110(6), 815-825. doi:10.1172/JCI13829
- Economopoulou, P., Dimitriadis, G., & Psyrris, A. (2015). Beyond BRCA: new hereditary breast cancer susceptibility genes. *Cancer Treat Rev*, 41(1), 1-8. doi:10.1016/j.ctrv.2014.10.008
- Er, T. K., & Chang, J. G. (2012). High-resolution melting: applications in genetic disorders. *Clin Chim Acta*, 414, 197-201. doi:10.1016/j.cca.2012.09.012
- Fletcher, O., Johnson, N., Orr, N., Hosking, F. J., Gibson, L. J., Walker, K., Zelenika, D., Gut, I., Heath, S., Palles, C., Coupland, B., Broderick, P., Schoemaker, M., Jones, M., Williamson, J., Chilcott-Burns, S., Tomczyk, K., Simpson, G., Jacobs, K. B., Chanock, S. J., Hunter, D. J., Tomlinson, I. P., Swerdlow, A., Ashworth, A., Ross, G., dos Santos Silva, I., Lathrop, M., Houlston, R. S., & Peto, J. (2011). Novel breast cancer susceptibility locus at 9q31.2: results of a genome-wide association study. *J Natl Cancer Inst*, 103(5), 425-435. doi:10.1093/jnci/djq563
- Foidart, J. M., Desreux, J., Pintiaux, A., & Gompel, A. (2007). Hormone therapy and breast cancer risk. *Climacteric*, 10 Suppl 2, 54-61. doi:10.1080/13697130701598324
- Gorbenko, O., Kuznetsov, V., Kukharenko, O., Zhyvoloup, A., Panasyuk, G., Nemazanyy, I., Filonenko, V., & Gout, I. (2004). Identification of a novel binding partners for tumor suppressor PTEN by a yeast two-hybrid approach. *Eksp Onkol*, 26(1), 15-19. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15112574>
- Green, K. A., & Streuli, C. H. (2004). Apoptosis regulation in the mammary gland. *Cell Mol Life Sci*, 61(15), 1867-1883. doi:10.1007/s00018-004-3366-y
- Hall, P., & Easton, D. (2013). Breast cancer screening: time to target women at risk. *Br J Cancer*, 108(11), 2202-2204. doi:10.1038/bjc.2013.257
- Haslam, S. Z., & Woodward, T. L. (2003). Host microenvironment in breast cancer development: epithelial-cell-stromal-cell interactions and steroid hormone action in normal and cancerous mammary gland. *Breast Cancer Res*, 5(4), 208-215. doi:10.1186/bcr615
- He, G. P., Muise, A., Li, A. W., & Ro, H. S. (1995). A eukaryotic transcriptional repressor with carboxypeptidase activity. *Nature*, 378(6552), 92-96. doi:10.1038/378092a0
- Hennighausen, L., & Robinson, G. W. (2001). Signaling pathways in mammary gland development. *Dev Cell*, 1(4), 467-475. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11703938>
- Hisano, M., Yamada, S., Tanaka, H., Nishimune, Y., & Nozaki, M. (2003). Genomic structure and promoter activity of the testis haploid germ cell-specific intronless genes, Tact1 and Tact2. *Mol Reprod Dev*, 65(2), 148-156. doi:10.1002/mrd.10276



- Holloway, R. W., Bogachev, O., Bharadwaj, A. G., McCluskey, G. D., Majdalawieh, A. F., Zhang, L., & Ro, H. S. (2012). Stromal adipocyte enhancer-binding protein (AEBP1) promotes mammary epithelial cell hyperplasia via proinflammatory and hedgehog signaling. *J Biol Chem*, 287(46), 39171-39181. doi:10.1074/jbc.M112.404293
- Howlett, A. R., & Bissell, M. J. (1993). The influence of tissue microenvironment (stroma and extracellular matrix) on the development and function of mammary epithelium. *Epithelial Cell Biol*, 2(2), 79-89. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8353596>
- Hutt, J. A., O'Rourke, J. P., & DeWille, J. (2000). Signal transducer and activator of transcription 3 activates CCAAT enhancer-binding protein delta gene transcription in G0 growth-arrested mouse mammary epithelial cells and in involuting mouse mammary gland. *J Biol Chem*, 275(37), 29123-29131. doi:10.1074/jbc.M004476200
- Inoue-Choi, M., Sinha, R., Gierach, G. L., & Ward, M. H. (2016). Red and processed meat, nitrite, and heme iron intakes and postmenopausal breast cancer risk in the NIH-AARP Diet and Health Study. *Int J Cancer*, 138(7), 1609-1618. doi:10.1002/ijc.29901
- J. Craig Venter Institute. SIFT Home. Online verfügbar unter <http://sift.jcvi.org>, zuletzt geprüft am 28.02.2016.
- Jansohn, M., & Rothhämel, S. (2012). *Gentechnische Methoden* Heidelberg Spektrum Akademischer Verlag
- Karim, R. Z., Scolyer, R. A., Tse, G. M., Tan, P. H., Putti, T. C., & Lee, C. S. (2009). Pathogenic mechanisms in the initiation and progression of mammary phyllodes tumours. *Pathology*, 41(2), 105-117. doi:10.1080/00313020802579342
- Karin, M. (2006). Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature*, 441(7092), 431-436. doi:10.1038/nature04870
- Kass, L., Erler, J. T., Dembo, M., & Weaver, V. M. (2007). Mammary epithelial cell: influence of extracellular matrix composition and organization during development and tumorigenesis. *Int J Biochem Cell Biol*, 39(11), 1987-1994. doi:10.1016/j.biocel.2007.06.025
- Khera, A. V., Chaffin, M., Aragam, K. G., Haas, M. E., Roselli, C., Choi, S. H., Natarajan, P., Lander, E. S., Lubitz, S. A., Ellinor, P. T., & Kathiresan, S. (2018). Genome-wide polygenic scores for common diseases identify individuals with risk equivalent to monogenic mutations. *Nat Genet*, 50(9), 1219-1224. doi:10.1038/s41588-018-0183-z
- Kim, S. W., Muise, A. M., Lyons, P. J., & Ro, H. S. (2001). Regulation of adipogenesis by a transcriptional repressor that modulates MAPK activation. *J Biol Chem*, 276(13), 10199-10206. doi:10.1074/jbc.M010640200
- Kumar, P., Henikoff, S., & Ng, P. C. (2009). Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc*, 4(7), 1073-1081. doi:10.1038/nprot.2009.86
- Ladha, J., Sinha, S., Bhat, V., Donakonda, S., & Rao, S. M. (2012). Identification of genomic targets of transcription factor AEBP1 and its role in survival of glioma cells. *Mol Cancer Res*, 10(8), 1039-1051. doi:10.1158/1541-7786.MCR-11-0488

- Li, G., Robinson, G. W., Lesche, R., Martinez-Diaz, H., Jiang, Z., Rozengurt, N., Wagner, K. U., Wu, D. C., Lane, T. F., Liu, X., Hennighausen, L., & Wu, H. (2002). Conditional loss of PTEN leads to precocious development and neoplasia in the mammary gland. *Development*, *129*(17), 4159-4170. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12163417>
- Maglott, D., Ostell, J., Pruitt, K. D., & Tatusova, T. (2005). Entrez Gene: gene-centered information at NCBI. *Nucleic Acids Res*, *33*(Database issue), D54-58. doi:10.1093/nar/gki031
- Majdalawieh, A., & Ro, H. S. (2009). LPS-induced suppression of macrophage cholesterol efflux is mediated by adipocyte enhancer-binding protein 1. *Int J Biochem Cell Biol*, *41*(7), 1518-1525. doi:10.1016/j.biocel.2009.01.003
- Majdalawieh, A., Zhang, L., Fuki, I. V., Rader, D. J., & Ro, H. S. (2006). Adipocyte enhancer-binding protein 1 is a potential novel atherogenic factor involved in macrophage cholesterol homeostasis and inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(7), 2346-2351. doi:10.1073/pnas.0508139103
- Majdalawieh, A., Zhang, L., & Ro, H. S. (2007). Adipocyte enhancer-binding protein-1 promotes macrophage inflammatory responsiveness by up-regulating NF-kappaB via IkappaBalpha negative regulation. *Mol Biol Cell*, *18*(3), 930-942. doi:10.1091/mbc.E06-03-0217
- Manolio, T. A., Collins, F. S., Cox, N. J., Goldstein, D. B., Hindorf, L. A., Hunter, D. J., McCarthy, M. I., Ramos, E. M., Cardon, L. R., Chakravarti, A., Cho, J. H., Guttmacher, A. E., Kong, A., Kruglyak, L., Mardis, E., Rotimi, C. N., Slatkin, M., Valle, D., Whittemore, A. S., Boehnke, M., Clark, A. G., Eichler, E. E., Gibson, G., Haines, J. L., Mackay, T. F., McCarroll, S. A., & Visscher, P. M. (2009). Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature*, *461*(7265), 747-753. doi:10.1038/nature08494
- Mavaddat, N., Michailidou, K., Dennis, J., Lush, M., Fachal, L., Lee, A., Tyrer, J. P., Chen, T. H., Wang, Q., Bolla, M. K., Yang, X., Adank, M. A., Ahearn, T., Aittomaki, K., Allen, J., Andrulis, I. L., Anton-Culver, H., Antonenkova, N. N., Arndt, V., Aronson, K. J., Auer, P. L., Auvinen, P., Barrdahl, M., Beane Freeman, L. E., Beckmann, M. W., Behrens, S., Benitez, J., Bermisheva, M., Bernstein, L., Blomqvist, C., Bogdanova, N. V., Bojesen, S. E., Bonanni, B., Borresen-Dale, A. L., Brauch, H., Bremer, M., Brenner, H., Brentnall, A., Brock, I. W., Brooks-Wilson, A., Brucker, S. Y., Bruning, T., Burwinkel, B., Campa, D., Carter, B. D., Castelao, J. E., Chanock, S. J., Chlebowski, R., Christiansen, H., Clarke, C. L., Collee, J. M., Cordina-Duverger, E., Cornelissen, S., Couch, F. J., Cox, A., Cross, S. S., Czene, K., Daly, M. B., Devilee, P., Dork, T., Dos-Santos-Silva, I., Dumont, M., Durcan, L., Dwek, M., Eccles, D. M., Ekici, A. B., Eliassen, A. H., Ellberg, C., Engel, C., Eriksson, M., Evans, D. G., Fasching, P. A., Figueroa, J., Fletcher, O., Flyger, H., Forsti, A., Fritschi, L., Gabrielson, M., Gago-Dominguez, M., Gapstur, S. M., Garcia-Saenz, J. A., Gaudet, M. M., Georgoulas, V., Giles, G. G., Gilyazova, I. R., Glendon, G., Goldberg, M. S., Goldgar, D. E., Gonzalez-Neira, A., Grenaker Alnaes, G. I., Grip, M., Gronwald, J., Grundy, A., Guenel, P., Haeberle, L., Hahnen, E., Haiman, C. A., Hakansson, N., Hamann, U.,

- Hankinson, S. E., Harkness, E. F., Hart, S. N., He, W., Hein, A., Heyworth, J., Hillemanns, P., Hollestelle, A., Hooning, M. J., Hoover, R. N., Hopper, J. L., Howell, A., Huang, G., Humphreys, K., Hunter, D. J., Jakimovska, M., Jakubowska, A., Janni, W., John, E. M., Johnson, N., Jones, M. E., Jukkola-Vuorinen, A., Jung, A., Kaaks, R., Kaczmarek, K., Kataja, V., Keeman, R., Kerin, M. J., Khusnutdinova, E., Kiiski, J. I., Knight, J. A., Ko, Y. D., Kosma, V. M., Koutros, S., Kristensen, V. N., Kruger, U., Kuhl, T., Lambrechts, D., Le Marchand, L., Lee, E., Lejbkowicz, F., Lilyquist, J., Lindblom, A., Lindstrom, S., Lissowska, J., Lo, W. Y., Loibl, S., Long, J., Lubinski, J., Lux, M. P., MacInnis, R. J., Maishman, T., Makalic, E., Maleva Kostovska, I., Mannermaa, A., Manoukian, S., Margolin, S., Martens, J. W. M., Martinez, M. E., Mavroudis, D., McLean, C., Meindl, A., Menon, U., Middha, P., Miller, N., Moreno, F., Mulligan, A. M., Mুলot, C., Munoz-Garzon, V. M., Neuhausen, S. L., Nevanlinna, H., Neven, P., Newman, W. G., Nielsen, S. F., Nordestgaard, B. G., Norman, A., Offit, K., Olson, J. E., Olsson, H., Orr, N., Pankratz, V. S., Park-Simon, T. W., Perez, J. I. A., Perez-Barrios, C., Peterlongo, P., Peto, J., Pinchev, M., Plaseska-Karanfilska, D., Polley, E. C., Prentice, R., Presneau, N., Prokofyeva, D., Purrington, K., Pylkas, K., Rack, B., Radice, P., Rau-Murthy, R., Rennert, G., Rennert, H. S., Rhenius, V., Robson, M., Romero, A., Ruddy, K. J., Ruebner, M., Saloustros, E., Sandler, D. P., Sawyer, E. J., Schmidt, D. F., Schmutzler, R. K., Schneeweiss, A., Schoemaker, M. J., Schumacher, F., Schurmann, P., Schwentner, L., Scott, C., Scott, R. J., Seynaeve, C., Shah, M., Sherman, M. E., Shrubsole, M. J., Shu, X. O., Slager, S., Smeets, A., Sohn, C., Soucy, P., Southey, M. C., Spinelli, J. J., Stegmaier, C., Stone, J., Swerdlow, A. J., Tamimi, R. M., Tapper, W. J., Taylor, J. A., Terry, M. B., Thone, K., Tollenaar, R., Tomlinson, I., Truong, T., Tzardi, M., Ulmer, H. U., Untch, M., Vachon, C. M., van Veen, E. M., Vijai, J., Weinberg, C. R., Wendt, C., Whittemore, A. S., Wildiers, H., Willett, W., Winqvist, R., Wolk, A., Yang, X. R., Yannoukakos, D., Zhang, Y., Zheng, W., Ziogas, A., Investigators, A., kConFab, A. I., Collaborators, N., Dunning, A. M., Thompson, D. J., Chenevix-Trench, G., Chang-Claude, J., Schmidt, M. K., Hall, P., Milne, R. L., Pharoah, P. D. P., Antoniou, A. C., Chatterjee, N., Kraft, P., Garcia-Closas, M., Simard, J., & Easton, D. F. (2019). Polygenic Risk Scores for Prediction of Breast Cancer and Breast Cancer Subtypes. *Am J Hum Genet*, *104*(1), 21-34. doi:10.1016/j.ajhg.2018.11.002
- McPherson, K., Steel, C. M., & Dixon, J. M. (2000). ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ*, *321*(7261), 624-628. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10977847>
- Meindl, A., Ditsch, N., Kast, K., Rhiem, K., & Schmutzler, R. K. (2011). Familiäres Mamma- und Ovarialkarzinom: Neue Gene, neue Therapien, neue Konzepte. *Dtsch Arztebl International*, *108*(19), 323-330. Retrieved from <http://www.aerzteblatt.de/int/article.asp?id=89359>
- Meindl, A., Hellebrand, H., Wiek, C., Erven, V., Wappenschmidt, B., Niederacher, D., Freund, M., Lichtner, P., Hartmann, L., Schaal, H., Ramser, J., Honisch, E., Kubisch, C., Wichmann, H. E., Kast, K.,

- Deissler, H., Engel, C., Muller-Myhsok, B., Neveling, K., Kiechle, M., Mathew, C. G., Schindler, D., Schmutzler, R. K., & Hanenberg, H. (2010). Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene. *Nat Genet*, *42*(5), 410-414. doi:10.1038/ng.569
- Meindl, A., Ramser, J., Hauke, J., & Hahnen, E. (2015). Genetik des familiären Brust- und Eierstockkrebses: Paneldiagnostik - Möglichkeiten und Grenzen *medizinische genetik* *27*(2), 202-210.
- Meindl, A., Rhiem, K., Engel, C., Ditsch, N., Kast, K., Hahnen, E., & Schmutzler, R. K. (2013). Klinik und Genetik des familiären Brust - und Eierstockkrebses. *medizinische genetik* *25*(2), 259-277.
- Mommers, E. C., Leonhart, A. M., von Mensdorff-Pouilly, S., Schol, D. J., Hilgers, J., Meijer, C. J., Baak, J. P., & van Diest, P. J. (1999). Aberrant expression of MUC1 mucin in ductal hyperplasia and ductal carcinoma In situ of the breast. *Int J Cancer*, *84*(5), 466-469. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10502721>
- Munk, K. (2010). *Taschenlehrbuch Biologie, Genetik* Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- Murken, J. (2006). *Taschenlehrbuch Humangenetik*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- National Heart Blood and Lung Institute. NHBLI Grand Opportunity Exome Sequencing Project. Online verfügbar unter <https://esp.gs.washington.edu>, zuletzt geprüft am 16.03.2016.
- Nicholson, R. I., Gee, J. M., & Harper, M. E. (2001). EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer*, *37 Suppl 4*, S9-15. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11597399>
- Nister, M., Hammacher, A., Mellstrom, K., Siegbahn, A., Ronnstrand, L., Westermarck, B., & Heldin, C. H. (1988). A glioma-derived PDGF A chain homodimer has different functional activities from a PDGF AB heterodimer purified from human platelets. *Cell*, *52*(6), 791-799. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2832065>
- Pharoah, P. D., Antoniou, A., Bobrow, M., Zimmern, R. L., Easton, D. F., & Ponder, B. A. (2002). Polygenic susceptibility to breast cancer and implications for prevention. *Nat Genet*, *31*(1), 33-36. doi:10.1038/ng853
- Reddy, S. P., Britto, R., Vinnakota, K., Aparna, H., Sreepathi, H. K., Thota, B., Kumari, A., Shilpa, B. M., Vrinda, M., Umesh, S., Samuel, C., Shetty, M., Tandon, A., Pandey, P., Hegde, S., Hegde, A. S., Balasubramaniam, A., Chandramouli, B. A., Santosh, V., Kondaiah, P., Somasundaram, K., & Rao, M. R. (2008). Novel glioblastoma markers with diagnostic and prognostic value identified through transcriptome analysis. *Clin Cancer Res*, *14*(10), 2978-2987. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-4821
- Ripperger, T., Gadzicki, D., Meindl, A., & Schlegelberger, B. (2009). Breast cancer susceptibility: current knowledge and implications for genetic counselling. *Eur J Hum Genet*, *17*(6), 722-731. doi:10.1038/ejhg.2008.212
- Ro, H. S., Kim, S. W., Wu, D., Webber, C., & Nicholson, T. E. (2001). Gene structure and expression of the mouse adipocyte enhancer-binding protein. *Gene*, *280*(1-2), 123-133. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11738825>

- Robert-Koch-Institut. (2015). Krebs in Deutschland 2011/2012. Eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Berlin, Robert Koch-Institut.
- Romieu, I., Scoccianti, C., Chajes, V., de Batlle, J., Biessy, C., Dossus, L., Baglietto, L., Clavel-Chapelon, F., Overvad, K., Olsen, A., Tjonneland, A., Kaaks, R., Lukanova, A., Boeing, H., Trichopoulou, A., Lagiou, P., Trichopoulos, D., Palli, D., Sieri, S., Tumino, R., Vineis, P., Panico, S., Bueno-de-Mesquita, H. B., van Gils, C. H., Peeters, P. H., Lund, E., Skeie, G., Weiderpass, E., Quiros Garcia, J. R., Chirlaque, M. D., Ardanaz, E., Sanchez, M. J., Duell, E. J., Amiano, P., Borgquist, S., Wirfalt, E., Hallmans, G., Johansson, I., Nilsson, L. M., Khaw, K. T., Wareham, N., Key, T. J., Travis, R. C., Murphy, N., Wark, P. A., Ferrari, P., & Riboli, E. (2015). Alcohol intake and breast cancer in the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Int J Cancer*, *137*(8), 1921-1930. doi:10.1002/ijc.29469
- Salomon, D. S., Brandt, R., Ciardiello, F., & Normanno, N. (1995). Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol*, *19*(3), 183-232. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7612182>
- Schwarz, J. M., Cooper, D. N., Schuelke, M., & Seelow, D. (2014). MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods*, *11*(4), 361-362. doi:10.1038/nmeth.2890
- Shekhar, M. P., Pauley, R., & Heppner, G. (2003). Host microenvironment in breast cancer development: extracellular matrix-stromal cell contribution to neoplastic phenotype of epithelial cells in the breast. *Breast Cancer Res*, *5*(3), 130-135. doi:10.1186/bcr580
- Shen, H., & Maki, C. G. (2011). Pharmacologic activation of p53 by small-molecule MDM2 antagonists. *Curr Pharm Des*, *17*(6), 560-568. doi:10.2174/138161211795222603
- Sherr, C. J., Beach, D., & Shapiro, G. I. (2016). Targeting CDK4 and CDK6: From Discovery to Therapy. *Cancer Discov*, *6*(4), 353-367. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-0894
- Smith, A., Moran, A., Boyd, M. C., Bulman, M., Shenton, A., Smith, L., Iddenden, R., Woodward, E. R., Laloo, F., Maher, E. R., & Evans, D. G. (2007). Phenocopies in BRCA1 and BRCA2 families: evidence for modifier genes and implications for screening. *J Med Genet*, *44*(1), 10-15. doi:10.1136/jmg.2006.043091
- Smith-Warner, S. A., Spiegelman, D., Yaun, S. S., van den Brandt, P. A., Folsom, A. R., Goldbohm, R. A., Graham, S., Holmberg, L., Howe, G. R., Marshall, J. R., Miller, A. B., Potter, J. D., Speizer, F. E., Willett, W. C., Wolk, A., & Hunter, D. J. (1998). Alcohol and breast cancer in women: a pooled analysis of cohort studies. *JAMA*, *279*(7), 535-540. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9480365>
- Snape, K., Ruark, E., Tarpey, P., Renwick, A., Turnbull, C., Seal, S., Murray, A., Hanks, S., Douglas, J., Stratton, M. R., & Rahman, N. (2012). Predisposition gene identification in common cancers by exome sequencing: insights from familial breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, *134*(1), 429-433. doi:10.1007/s10549-012-2057-x

- Sokolenko, A. P., Suspitsin, E. N., Kuligina, E., Bizin, I. V., Frishman, D., & Imyanitov, E. N. (2015). Identification of novel hereditary cancer genes by whole exome sequencing. *Cancer Lett*, *369*(2), 274-288. doi:10.1016/j.canlet.2015.09.014
- Soria, G., Ofri-Shahak, M., Haas, I., Yaal-Hahoshen, N., Leider-Trejo, L., Leibovich-Rivkin, T., Weitzenfeld, P., Meshel, T., Shabtai, E., Gutman, M., & Ben-Baruch, A. (2011). Inflammatory mediators in breast cancer: coordinated expression of TNFalpha & IL-1beta with CCL2 & CCL5 and effects on epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Cancer*, *11*, 130. doi:10.1186/1471-2407-11-130
- Swanson, C. A., Brinton, L. A., Taylor, P. R., Licitra, L. M., Ziegler, R. G., & Schairer, C. (1989). Body size and breast cancer risk assessed in women participating in the Breast Cancer Detection Demonstration Project. *Am J Epidemiol*, *130*(6), 1133-1141. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2589306>
- Tanaka, H., Iguchi, N., Egydio de Carvalho, C., Tadokoro, Y., Yomogida, K., & Nishimune, Y. (2003). Novel actin-like proteins T-ACTIN 1 and T-ACTIN 2 are differentially expressed in the cytoplasm and nucleus of mouse haploid germ cells. *Biol Reprod*, *69*(2), 475-482. doi:10.1095/biolreprod.103.015867
- Transgenomic®. (2009). WAVE® Systems 4500 Series - Automated High Sensitivity Mutation Detection and Nucleic Acids Analysis, Anweisung des Herstellers, USA
- University of California Santa Cruz. UCSC Genome Browser Home. Online verfügbar unter <https://genome.ucsc.edu/>, zuletzt geprüft am 15.03.2016.
- van den Brandt, P. A., Spiegelman, D., Yaun, S. S., Adami, H. O., Beeson, L., Folsom, A. R., Fraser, G., Goldbohm, R. A., Graham, S., Kushi, L., Marshall, J. R., Miller, A. B., Rohan, T., Smith-Warner, S. A., Speizer, F. E., Willett, W. C., Wolk, A., & Hunter, D. J. (2000). Pooled analysis of prospective cohort studies on height, weight, and breast cancer risk. *Am J Epidemiol*, *152*(6), 514-527. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10997541>
- Wiseman, B. S., & Werb, Z. (2002). Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. *Science*, *296*(5570), 1046-1049. doi:10.1126/science.1067431
- Yamada, K. M., & Araki, M. (2001). Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis. *J Cell Sci*, *114*(Pt 13), 2375-2382. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11559746>
- Zhang, L., Reidy, S. P., Bogachev, O., Hall, B. K., Majdalawieh, A., & Ro, H. S. (2011). Lactation defect with impaired secretory activation in AEBP1-null mice. *PLoS One*, *6*(11), e27795. doi:10.1371/journal.pone.0027795
- Zhang, L., Reidy, S. P., Nicholson, T. E., Lee, H. J., Majdalawieh, A., Webber, C., Stewart, B. R., Dolphin, P., & Ro, H. S. (2005). The role of AEBP1 in sex-specific diet-induced obesity. *Mol Med*, *11*(1-12), 39-47. doi:10.2119/2005-00021.Ro