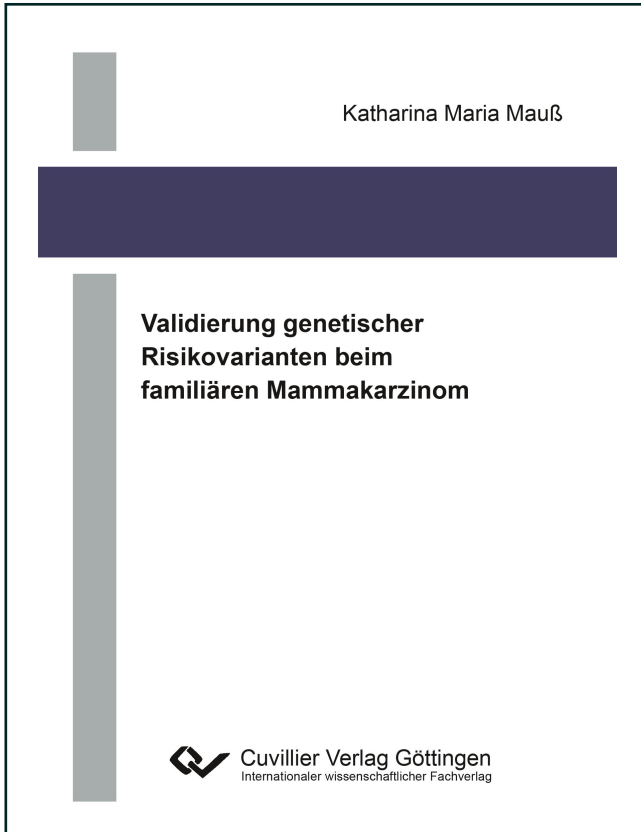




Katharina Mauß (Autor)
**Validierung genetischer Risikovarianten beim
familiären Mammakarzinom**



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/8181>

Copyright:
Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,
Germany
Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>



1 Einleitung

1.1 Das Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist der häufigste bösartige Tumor der Frau in Deutschland. Im Jahr 2013 gab es 71 640 Neuerkrankungen, zusätzlich werden jährlich ca. 6500 in situ Karzinome (DCIS) gezählt. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 64 Jahren und somit deutlich niedriger als bei anderen Krebserkrankungen. Im Jahr 2013 bedingte Brustkrebs in Deutschland 17 853 Todesfälle und liegt damit bei der Frau an erster Stelle der Krebstodesfälle vor dem Bronchial- und dem Kolonkarzinom (Barnes, Kraywinkel et al. 2016).

Die Inzidenz ist seit den 1970er Jahren kontinuierlich angestiegen. Erklärt wird dies unter anderem durch ein verändertes Risikoprofil der Frau als auch durch verbesserte Früherkennungsmethoden (Armstrong, Eisen et al. 2000, Dumitrescu and Cotarla 2005, Barnes, Kraywinkel et al. 2016).

Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt derzeit bei 88% und die Mortalität nimmt seit den 1990er Jahren kontinuierlich ab (Barnes, Kraywinkel et al. 2016). Zurückgeführt wird die Verbesserung der Mortalität auf verbesserte Früherkennung und bessere Therapiemöglichkeiten (Richter-Kuhlmann 2016).

1.1.1 Risikofaktoren

Das Mammakarzinom stellt in der Mehrheit eine multifaktorielle Erkrankung unterschiedlicher Genese dar (Meindl, Ramser et al. 2015, Hahnen, Rhiem et al. 2016). Die wichtigsten Risikofaktoren für die Entwicklung eines Mammakarzinoms sind das Geschlecht, das Alter und die familiäre Belastung (Dumitrescu and Cotarla 2005). Verschiedene Faktoren sind zusätzlich mit einem erhöhten Risiko an einem Mammakarzinom zu erkranken assoziiert. Hierzu zählen hohe Östrogenspiegel (frühe Menarche, Menopause, Kinderlosigkeit) und fortgeschrittenes Alter bei der Geburt des ersten Kindes (Jemal, Bray et al. 2011).

Neben zahlreichen etablierten Umweltfaktoren (Frisch, Wyshak et al. 1985, Allen, Monroe et al. 2000, Dumitrescu and Cotarla 2005, Suzuki, Orsini et al. 2009, Cibula, Gompel et al. 2010, Cao, Willett et al. 2015, Catsburg, Miller et al. 2015, Neuhauser, Aragaki et al. 2015) spielen Veränderungen in der DNA eine Rolle. Für die Mehrheit der singulären Fälle, die nach der Menopause diagnostiziert werden, spielen vermutlich sogenannte Niedrigrisikovarianten ebenfalls eine wichtige Rolle (Turnbull and Rahman 2008).



1.2 Das Familiäre Mammakarzinom

Der Großteil der Mammakarzinome tritt sporadisch, also ohne familiäre Häufung auf, bei 25% der Erkrankten ist jedoch eine familiäre Belastung oder eine frühe Erkrankung zu beobachten. Eine genetische Belastung geht vor allem einher mit einem jungen Erkrankungsalter, dem vermehrten Auftreten von prämenopausalen Mammakarzinomen vor dem 50. Lebensjahr und bilateralen Karzinomen (Meindl, Ramser et al. 2015). Ein starker Hinweis auf ein erbliches Mammakarzinom ist aber vor allem das gemeinsame Auftreten mit einem Ovarialkarzinom (Nathanson, Wooster et al. 2001).

Die familiären Mammakarzinome sind sehr wahrscheinlich auf monogene oder oligogene Vererbungen zurückzuführen (Walsh, Lee et al. 2010). Grund hierfür ist, dass es hochpenetrante, wie auch moderat-penetrante Genmutationen gibt. Diese Gene fungieren in der Regel als Tumorsuppressorgene und werden autosomal-dominant vererbt (Walsh, Lee et al. 2010, Meindl, Ditsch et al. 2011).

1.2.1 Hochrisikogene

1.2.1.1 *BRCA1/2*

Mithilfe von Kopplungsanalysen wurden 1994 und 1995 die Hochrisikogene *BRCA1* und *BRCA2* entdeckt. Die beiden Gene sind am Zellzyklus und der DNA-Reparatur beteiligt und erklären ca. 25% der familiären Mammakarzinome (Grill and Kiechle 2015). Diese Gene weisen eine hohe Penetranz auf (Meindl, Ditsch et al. 2011) – das lebenslange Risiko von Mutationsträgerinnen für die Entwicklung eines Mamma- (69–74%) beziehungsweise eines Ovarialkarzinoms (12–46%) ist deutlich erhöht (King, Marks et al. 2003). Die Erkrankungsrisiken für Mutationsträgerinnen unterscheiden sich stark von Studie zu Studie. Studien, die Risiken vor allem durch Untersuchungen von Familien mit einer großen Anzahl an betroffenen Familienmitgliedern ermitteln neigen dazu, das Risiko von Familien mit einer weniger auffälligen Familienanamnese zu überschätzen (Engel, Zachariae et al. 2015, Kuchenbaecker, Hopper et al. 2017).

Zahlreiche Studien legen nahe, dass *BRCA1/2*-Mutationen neben Brust- und Eierstockkrebs auch zu einem allgemein gesteigerten Risiko für maligne Erkrankungen beitragen. So erhöhen Mutationen in beiden Genen das Risiko für Pankreaskarzinome und *BRCA2*-Mutationen erhöhen auch bei Männern das Risiko, an einem Brust- oder Prostatakarzinom zu erkranken (Meindl, Hahnen et al. 2014).

1.2.1.2 *PALB2*

PALB2 ist ebenfalls im Zusammenspiel mit *BRCA2* an der DNA-Doppelstrangreparatur beteiligt (Antoniou, Foulkes et al. 2014). Biallelische Mutationen führen auch wie *BRCA2* zu einer Unterform der Fanconi-Anämie und multiplen pädiatrischen Tumoren



(Bogliolo and Surralles 2015). Mutationen in *PALB2* führen zu einem bis zu 8-fach gesteigerten Brustkrebsrisiko (Antoniou, Foulkes et al. 2014) und sind ebenfalls mit Pancreaskarzinomen assoziiert (Meindl, Ramser et al. 2015). Diskutiert wird im Zusammenhang mit *PALB2*-Mutationen insbesondere der „birth cohort effect“, der zeigen soll, dass die Penetranz der Mutationen stark davon abhängt, in welchem Jahrzehnt die jeweiligen Mutationsträgerinnen geboren wurden. Für diese Antizipation werden Umweltfaktoren verantwortlich gemacht (Antoniou, Foulkes et al. 2015).

1.2.1.3 *TP53* und *CDH1*

TP53 und *CDH1* sind ursächlich für das Li-Fraumeni-Syndrom Typ1 und das hereditäre diffuse Magenkarzinom, zwei seltenen autosomal-dominanten Tumordispositionserkrankungen. *TP53*-Mutationen stellen eine Prädisposition für unterschiedliche Tumorerkrankungen dar, Mutationsträger erkranken zu 90% an einem malignen Tumor, bei Frauen kommt es am häufigsten zum Auftreten von Mammakarzinomen. *CHD1*-Mutationen sind mit lobulären Mammakarzinomen assoziiert (Schrader, Masciari et al. 2008), allerdings scheint die familiäre Konstellation eine Rolle zu spielen ob eher Mamma- oder Magenkarzinome entwickelt werden (Meindl, Ramser et al. 2015).

1.2.2 Niedrig bis moderat penetrante Gene

1.2.2.1 *CHEK2*

Das *CHEK2*-Gen kodiert eine Serinprotease, die als Zellzyklusregulator bei DNA-Schädigungen aktiviert wird und einen Teil der zellulären Antwort auf DNA-Doppelstrangbrüche darstellt (Stracker, Usui et al. 2009). Ursprünglich wurde *CHEK2* als (Mit-)Auslöser des *TP53*-negativen Li-Fraumeni-Syndroms identifiziert (Ruijs, Broeks et al. 2009).

Mutationen in *CHEK2* führen zu einer 2-3-fachen Risikoerhöhung. Allerdings ist auch hier in betroffenen Familien eine noch stärkere Risikoerhöhung zu beobachten, sodass davon auszugehen ist, dass hier weitere genetische Modifier eine Rolle spielen und einen Einfluss auf die Penetranz von *CHEK2*-Mutationen haben (Meindl, Hahnen et al. 2014, Cybulski, Lubinski et al. 2015).

1.2.2.2 *ATM*/*NBN*

ATM und *NBN* kodieren ebenfalls Proteine, die eine Rolle bei den zellulären Reparaturmechanismen bei Doppelstrangbrüchen spielen (McKinnon 2004).

Beide Gene werden rezessiv mit Syndromen in Verbindung gebracht, *ATM* mit Ataxia Teleangiektasia (AT) und *NBN* mit dem Nijmegen-Breakage-Syndrom, einer AT-Unterform.



Bei beiden Erkrankungen handelt es sich um Chromosomenbruchsindrome (Varon, Demuth et al. 1993, Nissenkorn and Ben-Zeev 2015). Bei homozygotem Vorliegen von Mutationen kommt es zu Immundefizienz, multiplen Tumoren und neurologischen Auffälligkeiten (Shiloh 1997).

Beim heterozygoten Vorliegen pathogener Mutationen in *ATM* und *NBN* ist das Brustkrebsrisiko 2,4-fach erhöht (Meindl, Ramser et al. 2015). Aktuellere Daten sprechen jedoch dafür, dass die Risiken für *ATM* höher, für *NBN* dagegen deutlich niedriger sind (Uzunoglu, Korak et al. 2016, Bubien, Bonnet et al. 2017, Kraus, Hoyer et al. 2017, Schmutzler 2017).

1.2.3 Weitere Risikogene mit unklarer Penetranz

Die beiden Gene *RAD51C* und *RAD51D* konnten in der letzten Zeit mit erhöhtem Risiko für Eierstockkrebs assoziiert werden – die Korrelation mit signifikant erhöhtem Brustkrebsrisiko ist aber immer noch unklar. Allerdings konnte in aktuellen Untersuchungen bereits ein erhöhtes Risiko für Brustkrebs bei *RAD51D*-Mutationen gezeigt werden, bei *RAD51C* ist dies immer noch nicht geklärt (Meindl, Hellebrand et al. 2010, Loveday, Turnbull et al. 2011, Loveday, Turnbull et al. 2012, Meindl, Ramser et al. 2015).

Klar ist dagegen, dass Mutationen im *FANCM*-Gen das Risiko an Brustkrebs zu erkranken ungefähr verdoppeln (Neidhardt, Hauke et al. 2016, Hahnen, Hauke et al. 2017).

Schließlich werden auch Gene wie *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* und *PMS2*, welche mit hereditärem, nicht-polypösem Darmkrebs (HNPCC) assoziiert sind, mit einem gehäuften Auftreten von Mammakarzinomen in Verbindung gebracht (Lotsari, Gylling et al. 2012, Tung, Lin et al. 2016, Goldberg, Bell et al. 2017, Tedaldi, Tebaldi et al. 2017). Allerdings gibt es hierzu noch keine gesicherten Daten und die Ergebnisse sind stark von der jeweils untersuchten Population abhängig (Harkness, Barrow et al. 2015).

In der Summe erklären diese bekannten und kurz vorgestellten Brustkrebs-Suszeptibilitätsgene **aber nur 25–30%** der familiären Mammakarzinome.

1.2.4 Deutsches Konsortium Familiärer Brust- und Eierstockkrebs

Das Deutsche Konsortium Familiärer Brust- und Eierstockkrebs stellt ein durch die Deutsche Krebshilfe gegründetes und finanziertes, nationales Verbundprojekt zur besseren Betreuung von Familien mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko dar. Im Rahmen dieses Projektes wurde z.B. ein interdisziplinäres Konzept zur Abschätzung des Risikos, der Beratung und der genetischen Untersuchung betroffener Familien entwickelt (Meindl, Ramser et al. 2015).



1.2.4.1 Diagnostik und Detektion neuer Varianten im Konsortium

Für mehr als zwei Drittel der familiären Mammakarzinome konnte noch keine genetische Grundlage gefunden werden. Eine Möglichkeit neue, noch unbekannte prädisponierende Gene zu identifizieren stellt die Exom-Sequenzierung dar.

Weitere potentielle Brustkrebsgene sind Gene, die im Rahmen von Exomsequenzierungen in Erkrankten häufiger als in Kontrollpopulationen zu finden sind. Validiert werden solche Gene entweder durch die Untersuchung weiterer bis zu 1000 Exomen, oder durch sogenannte Multigen-Analysen, die einfacher und billiger durchzuführen sind. Im Rahmen des Deutschen Konsortiums für familiären Brust- und Eierstockkrebs werden Betroffene z.B. mithilfe des TruSight-Genpanels von Illumina auf Veränderungen in unterschiedlichen Kandidaten-Genen untersucht. Zum einen sind dies 10 sogenannte „Konsensusgene“, deren Zusammenhang mit Mammakarzinomen bereits bestätigt ist. Hierbei handelt es sich um die *Gene ATM, BRCA1, BRCA2, CDH1, CHEK2, NBN, PALB2, RAD51C, RAD51D* und *TP53* (Schmutzler 2017). Zum anderen werden Betroffene auf 84 weitere Gene untersucht, bei denen eine Assoziation mit erblichem Brustkrebs vermutet wird, die aber zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht ausreichend validiert sind. Dazu gehörte z. B. das Gen *ERCC2*, das Gen *XPC* wird in einem aktualisierten Panel aufgenommen.

1.2.5 Familiäre Mammakarzinome und Mutationen in *ERCC2, XPC* und *MARCO*

Im Rahmen einer vom MRI beauftragten und extern durchgeführten Exom-Analyse wurden drei Gene entdeckt, die in dieser Arbeit detaillierter bearbeitet wurden:

1.2.5.1 *XPC*

Die Auswertung von ca. 900 Exom-Sequenzierungsdaten zeigte, dass die Missense-Variante c.872 C>G p.S291C im Gen *XPC* in 1200 Erkrankten 6 x und in 3531 Kontrollen 7x zu finden (PD Dr. Tim Strom, persönliche Mitteilung). Außerdem wurden zwei trunkierte Mutationen gefunden, die bestätigt wurden. Es stellte sich die Frage, ob in der Gruppe erkrankter Patientinnen weitere Genveränderungen im *XPC*-Gen zu finden sind.



1.2.5.2 ERCC2

Exom-Projekt MRI, Familie 1:

In Familie 1 konnte im Rahmen einer Exom-Sequenzierung bei drei Familienmitgliedern (II1, II3, III6, III7), die an einem Mammakarzinom erkrankt waren, die Variante c.1606 C→T, p.V536M gefunden und bestätigt werden (siehe Abbildung 1). Diese Genveränderung war von den Vorhersageprogrammen „Sift“, „mutation-taster“ und „polyphen“ (Kumar, Henikoff et al. 2009, Adzhubei, Jordan et al. 2013, Schwarz, Cooper et al. 2014) als pathogen und „probably damaging“ eingestuft worden.

Im Hinblick auf diese Familie und die Korrelation zwischen Mutation und Auftreten der Krankheit konnte *ERCC2* als ein vielversprechendes Kandidatengen erachtet werden. *ERCC2* war zudem bereits von Rump. et al. als mögliches Brustkrebsgen beschrieben und funktionell untersucht worden (Rump, Benet-Pages et al. 2016).

Ein weiteres erkranktes Familienmitglied und zwei gesunde Familienmitglieder von Familie 1 sollten ebenfalls auf die Mutation untersucht werden.

Fraglich war, inwiefern Veränderungen in diesem Gen auch in der nicht erkrankten Bevölkerung vorkommen und ob auch in anderen an Brustkrebs erkrankten Patientinnen Veränderungen in diesem Gen zu finden sind.

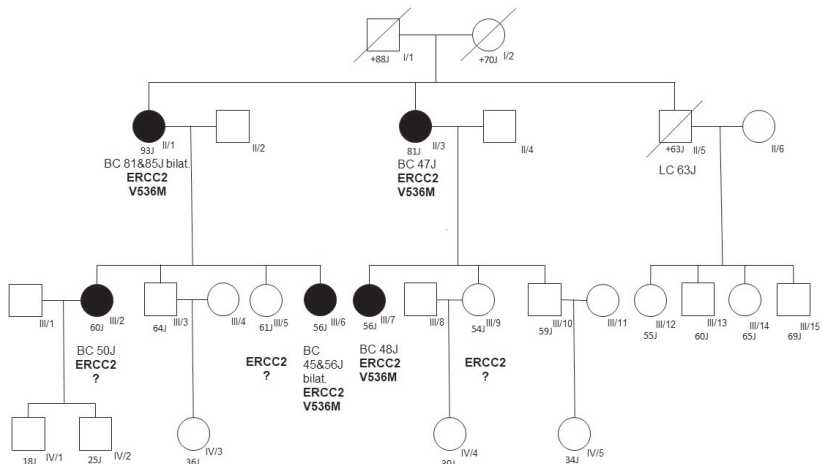


Abbildung 1: Stammbaum Familie 1



1.2.5.3 MARCO

Exom-Projekt MRI, Familie 5

Bei Familie 5 wurde ebenfalls im Rahmen einer Exom-Sequenzierung bei einer an einem Mammakarzinom erkrankten Frau (IV/3) die Frameshift-Mutation c.1261delTC p.(Ser421fs) im *MARCO*-Gen gefunden. Bei der mit Pfeil markierten Patientin handelt es sich um das initial ratsuchende Familienmitglied.

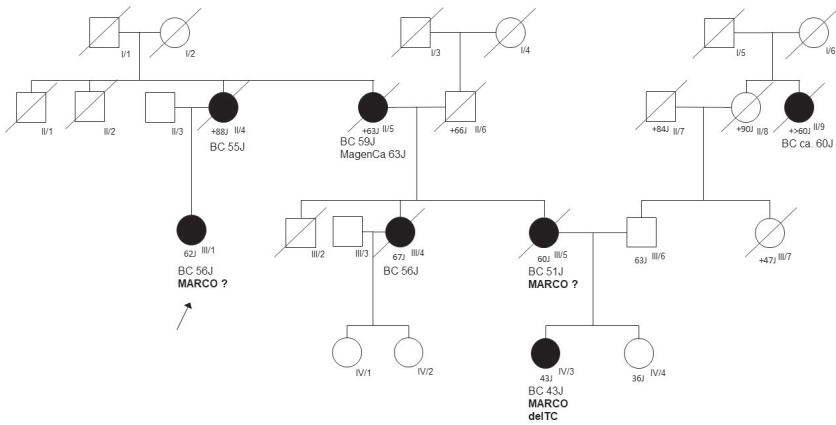


Abbildung 2: Stammbaum Familie 5

Die in Familie 5 beobachtete Korrelation zwischen Genotyp und der Erkrankung lässt *MARCO* als mögliches Kandidatengen für Brustkrebs erscheinen.

In dieser Familie sollten zwei weitere Erkrankte (III/1 und III/5) auf die entsprechende Frameshift-Mutation untersucht werden.

Analog zum Vorgehen bei *ERCC2* sollten weitere an Brustkrebs erkrankte Frauen und ein gesundes Kontrollkollektiv auf Veränderungen in *MARCO* untersucht werden.

1.2.5.4 ERCC2, XPC und MARCO

Das Gen *ERCC2* kodiert das Protein XPD, welches sowohl bei der Transkription als auch der Nukleotid-Exzisionsreparatur eine Rolle spielt (Kuper, Braun et al. 2014). Das Gen *XPC* kodiert das gleichnamige Protein und wird lediglich mit der Nukleotid-Exzisionsreparatur in Verbindung gebracht (Sugasawa, Ng et al. 1998, Khan, Muniz-Medina et al. 2002).



Im homozygoten Zustand führen Mutationen in *ERCC2* und *XPC* zur autosomal-rezessiven Erkrankung Xeroderma pigmentosum, einige Mutationen in *ERCC2* bedingen die Trichothiodystrophie (Takayama, Salazar et al. 1995).

Xeroderma pigmentosum ist eine durch Hautveränderungen, erhöhte UV-Sensitivität und einer Neigung zu Hautkrebs gekennzeichnete Erkrankung (Moriwaki, Kanda et al. 2017). Trichothiodystrophie äußert sich als heterogenes Krankheitsbild mit Haar- und Nagelveränderungen, das mit erhöhter Photosensitivität und neurologischen Symptomen einhergehen kann (Kraemer, Patronas et al. 2007).

Je nach Art und Lage der Mutation in *ERCC2* kommt es zum Auftreten einer der beiden Krankheitsbilder oder einer Kombination aus beiden (Kuper, Braun et al. 2014).

Heterozygote Mutationen in *ERCC2* und *XPC* sind mit dem gehäuftem Auftreten von unterschiedlichen Tumoren assoziiert (Aggarwal, Donald et al. 2017, Santiago, Junior et al. 2017). Veränderungen in *ERCC2* wurden auch mit dem erhöhten Auftreten von Mammakarzinomen in Verbindung gebracht (He, Xu et al. 2016).

ERCC2 und *XPC* sind an der Nukleotidexzisionsreparatur beteiligt (Takayama, Salazar et al. 1995), während die Proteine der meisten mit Mamma- und Ovarialkarzinomen assoziierten Gene eine Rolle in der homologen Rekombinationsreparatur spielen (Turnbull and Rahman 2008).

Im Gegensatz zu *ERCC2* und *XPC* stellt *MARCO* kein an der Zellreparatur beteiligtes Protein dar. Stattdessen kodiert *MARCO* das gleichnamige Protein, welches einen Oberflächenrezeptor in Makrophagen darstellt.

MARCO dient der Erkennung bakterieller Strukturen zur Opsonierung von Bakterien im Rahmen der angeborenen Immunität (Palecanda and Kobzik 2001). Zudem spielt *MARCO* auch bei der erworbenen Abwehr eine Rolle, indem es die Transduktion von Viren in Makrophagen beschleunigt und so die Reaktion mit proinflammatorischen Zytokinen fördert (Maler, Nielsen et al. 2017).

Neben der immunologischen Rolle wurde außerdem beobachtet, dass die Expression von *MARCO* durch Tumor-assoziierte Makrophagen im an Mammakarzinome angrenzenden Bindegewebe erhöht ist (Franklin, Liao et al. 2014, Sturtz, Deyarmin et al. 2014).



2 Fragestellung der Arbeit

In maximal 30% der familiären Mammakarzinome finden sich Veränderungen in bereits bekannten Genen, die mit erhöhtem Risiko für die Entwicklung eines Mammakarzinoms einhergehen. Es wird deshalb vermutet, dass es weitere Gene gibt, bei welchen pathogene Veränderungen ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Mammakarzinoms darstellen. Man geht davon aus, dass es sich hierbei um seltene unbekannte Genveränderungen mit unterschiedlicher Penetranz handelt. Im Rahmen von Exom-Sequenzierungsprojekten wurden bereits einige Gene identifiziert, bei denen Mutationen in Erkrankten vergleichsweise häufiger als in Gesunden vorkommen, die aber in nachfolgenden Studien nicht bestätigt werden konnten (wie z.B. *RECQL*, *BLM* (Li, Rowley et al. 2018, Schubert, van Luttikhuisen et al. 2018)).

Erste Zielsetzung dieser Arbeit war es, die in einem familienbasierten Exom-Projekt auffälligen Gene *ERCC2* und *XPC* in größeren Kohorten zu validieren. Hierbei wurde für die beiden untersuchten Gene unterschiedlich vorgegangen:

- a) Für das Gen *XPC* wurden „Screening“-Methoden entwickelt, um Mutationen in Erkrankten aufzufinden und anschließend zu sequenzieren. Zusätzlich wurden weitere Patientinnen im Rahmen von „Multigen“-Analysen in einer zweiten Validierungsrunde auf Mutationen untersucht.
- b) Für das Gen *ERCC2* entwickelten sich folgende Ziele:
 - Für Familie 1 sollten weitere Familienangehörige auf eine Mutation in *ERCC2* untersucht werden.
 - Im Rahmen einer Multigen-Analyse sollten weitere Veränderungen in *ERCC2* analysiert werden.

Schließlich sollten weitere Segregationsanalysen durchgeführt werden und die Häufigkeiten von Mutationen in den Kohorten mit Kontrollpopulationen verglichen werden.

Eine zusätzliche Aufgabe war, ein drittes Gen (*MARCO*), das ebenfalls initial in der internen Exom-Sequenzierung (Familie 5), und später innerhalb des PERSPECTIVE-Projektes auffällig war, in den entsprechenden Familien zu charakterisieren. Dieses Gen sollte, wenn bestätigt, in eine zweite weitere große Validierungsstudie eingeschlossen werden.



3 Material und Methoden

3.1 Art der Studie

Diese Arbeit stellt eine Fall-Kontroll-Studie dar mit dem Ziel, neue genetische Risikovarianten für das familiäre Mammakarzinom zu validieren. Bei den Teilnehmerinnen handelt es sich um Frauen, die im Zentrum München in Behandlung waren beziehungsweise sind. Pro Familie wurde nur ein Fall eingeschlossen.

3.1.1 Patientenkollektiv, Studienkriterien

Das in dieser Arbeit untersuchte Patientenkollektiv umfasste Patientinnen, die an einem Mammakarzinom erkrankt waren, eine familiäre Belastung aufwiesen und in der Regel keine pathogenen Mutationen in den Hochrisikogenen *BRCA1* und *BRCA2* trugen.

Auf Mutationen in *XPC* wurden 265 Patientinnen aus Risikogruppe A getestet, das bedeutet, dass in den entsprechenden Familien \geq drei Brustkrebsfälle und hiervon zwei vor dem 50. Lebensjahr aufgetreten waren (Engert, Wappenschmidt et al. 2008).

Bezüglich Veränderungen in *ERCC2* wurden Patientinnen mithilfe des TruSightCancer Panels von Illumina untersucht. In diese Untersuchungen wurden Patientinnen eingeschlossen, die die Einschlusskriterien des Deutschen Konsortiums erfüllten (Schmutzler 2017).

3.1.2 Einhaltung ethischer Richtlinien

Die Studienteilnehmer wurden über die Studie aufgeklärt und es lagen von allen Teilnehmern Einverständniserklärungen vor. Die Untersuchungen entsprachen geltendem Recht, den Anforderungen der überarbeiteten Fassung der Deklaration von Helsinki 1975 an Untersuchungen von Menschen und waren von der zuständigen Ethikkommission genehmigt worden.