

Aus der Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie
(Direktor (komm.): Prof. Dr. med. Dr. D. C. Bröring)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**UNTERSUCHUNG DER BEDEUTUNG DER
DNA-MISMATCH REPARATURGENE
PMS2 UND *MSH6*
BEIM SPORADISCHEN KOLONKARZINOM**

Inaugural – Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Sven Schwiedernoch
aus Heidelberg

Kiel 2009

1. Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. Schafmayer
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Stanulla
Tag der mündlichen Prüfung:	11.08.2009
Zum Druck genehmigt, Kiel, den	11.08.2009
Gez.	Prof. Dr. Fickenscher (Vorsitzender der Prüfungskommission)

Diese Dissertation widme ich meinen Eltern, Monika und Dr. Gerd Schwiedernoch -
Vielen Dank für Alles!

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Polymorphe Stellen in der DNA-Sequenz im Vergleich zweier Chromosomen	Seite 15
Abbildung 2	Geographische Darstellung der teilnehmenden Kliniken Norddeutschlands	Seite 18
Abbildung 3	Einschätzung der Aussagekraft des Tests	Seite 28
Abbildung 4	Blockstruktur des Kandidatengens <i>MSH6</i> aus HAPMAP für kaukasische Genotypen. Erzeugt mittels HAPLOVIEW	Seite 29
Abbildung 5	Blockstruktur des Kandidatengens <i>PMS2</i> aus HAPMAP für kaukasische Genotypen. Erzeugt mittels HAPLOVIEW	Seite 31

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Verteilung der für die Studie angeschriebenen Patienten über die verschiedenen partizipierenden Krankenhäuser bzw. das Krebsregister S-H	Seite 26
Tabelle 2	Darstellung der analysierten Patienten	Seite 27
Tabelle 3	Ergebnisse der genetischen Assoziationsanalyse der auf dem untersuchten Gen <i>MSH6</i> liegenden 15 SNP's	Seite 30
Tabelle 4	Ergebnisse der genetischen Assoziationsanalyse der auf dem untersuchten Gen <i>PMS2</i> liegenden 10 SNP's	Seite 32

<u>Inhaltsverzeichnis:</u>		Seite
1.	Einleitung	1
1.1	Das sporadische Kolonkarzinom	1
1.1.1	Pathogenese	2
1.1.2	Klinik / Diagnostik	3
1.1.3	Therapie	4
1.1.4	Familiäre Häufung – syndromale Erkrankungen	5
1.2	Molekulargenetische Befunde zum sporadischen Kolonkarzinom	8
1.3	Genetische Aufklärung komplexer Erkrankungen	9
1.3.1	Fall /Kontroll – Studien	10
1.3.2	Kopplung / Assoziation	11
1.3.3	Haplotyp Blockstruktur	12
1.3.4	HAPMAP – Projekt	13
1.3.5	Genetische Marker	14
1.4	Die Kandidatengene <i>MSH 6</i> und <i>PMS 2</i>	15
1.4.1	<i>MSH6</i>	15
1.4.2	<i>PMS2</i>	16
1.5	Zielsetzung	17
2.	Material und Methoden	18
2.1	Patientenkollektiv	18
2.1.1	Datenschutz und Ethik	20
2.2	Genotypisierung	21

2.2.1	DNA – Extraktion	21
2.2.2	Whole Genome Amplification	22
2.2.3	Genotypisierung mit dem SNPlex System	23
2.2.4	Auswahl der SNP's	25
2.3	Analyse	25
3.	Ergebnisse	26
3.1	Darstellung des Gesamtkollektivs	26
3.2	Das Kollektiv der untersuchten Patienten	27
3.3	Berechnung der Power	28
3.4	Ergebnisse zu den Kandidatengenen	28
3.4.1	<i>MSH6</i>	28
3.4.2	<i>PMS2</i>	31
4.	Diskussion	34
4.1	Familiäre Häufung	34
4.2	Methoden	35
4.3	Ergebnisse und Fallzahl	35
4.4	Rekrutierung	36
4.5	Variation in der Population	38
4.6	Resumee und Ausblick	38

5. Zusammenfassung	40
6. Literaturverzeichnis	42
7. Anhang	47
7.1 Einwilligungserklärung	47
7.2 Merkblatt zur Einverständniserklärung	48
7.3 Fragebogen	49
8. Danksagung	56
9. Lebenslauf	58

1. EINLEITUNG

1.1 Das sporadische Kolonkarzinom

Mit etwa 75.000 Neuerkrankungen in Deutschland pro Jahr ist das kolorektale Karzinom (KRK) das zweithäufigste Karzinom in Deutschland [Robert-Koch-Institut 2006]. Weltweit kommt es schätzungsweise zu einer halben Millionen Neuerkrankungen. Das KRK kommt sowohl in erblicher als auch in sporadischer Form vor. Auf die sporadische Form des KRK entfallen etwa 65-85% der Fälle. Die übrigen 15-35% der KRK entfallen auf hereditäre Formen [Burt et al. 1996]. Nur etwa 5% der hereditären Formen gehen mit syndromalen Erkrankungen einher, deren genetischer Ursprung geklärt zu sein scheint. Es bleibt ein Prozentsatz von etwa 30% der KRK Fälle bei denen Familiarität und genetischer Ursprung nur ungenügend geklärt ist.

Die Inzidenz des KRK ist in den Industrie-Ländern deutlich höher – 6-8x so hoch - als beispielsweise in Afrika oder Zentral- und Südamerika [Parkin et al. 1999]. Ein Erklärungsansatz für diese Verteilung mag die unterschiedliche Ernährung sein. Ballaststoffarme, sowie an rotem Fleisch und tierischen Fetten reiche Ernährung scheint das Risiko der Karzinomentstehung zu erhöhen. Eine an Früchten, Gemüse und Ballaststoffen reiche Ernährung scheint einen protektiven Effekt zu haben [Winawer et al. 1997]. Ist ein kolorektales Karzinom in den ersten vier Lebensjahrzehnten noch eher selten, muss ein sprunghafter Anstieg der Neuerkrankungen ab einem Lebensalter von etwa 50 Jahren verzeichnet werden. Erkrankten beispielsweise im Alter von 50 Jahren noch etwa 20/100.000 Deutschen Männern an einem KRK, so sind es in der Altersspanne von 55-59 Jahren bereits etwa 75/100.000 und im Alter zwischen 80 und 84 Jahren weit über 200 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner in Deutschland. Die Sterblichkeit beim KRK ist hoch. Im Jahr 2002 verstarben in Deutschland 14.032 Patienten und 14.891 Patientinnen an den Folgen eines KRK [Robert-Koch-Institut 2006].

Die Einteilung des KRK erfolgt primär nach der Lokalisation des Tumors. Etwa 42% der Tumore finden sich in Rektum und Sigma, 9% im Colon descendens, 15% im Colon transversum und 34% in Colon ascendens und im Zökum [Tumorzentrum München 2001]. Die Metastasierung per continuitatem erfolgt in das perikolische bzw. perirektale Gewebe.

Die lymphogene Metastasierung erfolgt analog dem Verlauf der 2 versorgenden Hauptgefäße, der A. mesenterica superior und inferior. Bei der hämatogenen Metastasierung muss zwischen tiefsitzenden Rektumkarzinomen, die ein Metastasierungsverhalten vom Cava-Typ aufweisen, und übrigen KRK unterschieden werden, die über das Pfortadersystem metastasieren. Dementsprechend findet man beim tiefsitzenden Rektumkarzinom am ehesten Lungenmetastasen, bei den übrigen KRK ist am ehesten mit Lebermetastasen zu rechnen. Pathologisch handelt es sich überwiegend um Adenokarzinome (90%). Ausser den Adenokarzinomen kommen noch Siegelringzellkarzinome, undifferenzierte Karzinome, adenosquamöse und kleinzellige Karzinome vor.

Etwa 95% der KRK entstehen aus Polypen, wobei die Mutation vom Polypen zum Karzinom etwa 10 Jahre in Anspruch nimmt. Das individuelle Lebenszeitrisiko, dass sich aus einem Polypen ein Karzinom entwickelt, wird auf 1:10 geschätzt [Fearon et al. 1990].

1.1.1 Pathogenese

Grundlage der malignen Entartung der Zellen ist das Ungleichgewicht von Protoonkogenen/Onkogenen und Tumorsuppressorgenen. Als wichtigste Tumorsuppressorgene werden das *APC*-Gen (adenomatous polyposis coli), das *DCC*-Gen (deleted in colon carcinoma), sowie die Gene *p53* und *MCC* (mutated in colorectal cancer) beschrieben. Das bedeutendste Onkogen in der Genese des kolorektalen Karzinoms ist das *K-ras*-Gen [Tomlinson et al. 1988].

Die Produkte der Protoonkogene/Onkogene und Tumorsuppressorgene regulieren das Wachstum der Zellen. Mutationen, bzw. die Akkumulation multipler Mutationen, in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen können Boden einer malignen Entartung sein. Die Aktivierung der Protoonkogene zu Onkogenen wird durch Zellproliferation induziert. Soll eine maligne Entartung gehemmt werden, sind Tumorsuppressorgene notwendig. Die Forscher Vogelstein und Fearon entdeckten die sogenannte Adenom-Karzinom-Sequenz. Diese beschreibt eine Abfolge molekulargenetischer Veränderungen als Entwicklungsstufen vom normalen Kolonepithel zum Karzinom [Fearon et al. 1990]. Der initiiierende Schritt ist der Funktionsverlust, bzw. die Inaktivierung des Tumorsuppressorgens *APC* [Powell et al. 1992]. Hierdurch kommt es zu einer Hyperproliferation des Epithels. In etwa 85% der kolorektalen Karzinome ist eine Veränderung des *APC*-Gens nachweisbar [Michor et al. 2004]. Durch Mutationen im Onkogen *K-ras* werden dauerhaft Wachstumssignale an die

Zelle gesendet, wodurch das entstehende Adenom zu wachsen beginnt. Fällt nun das Tumorsuppressorgen *DCC* aus, entstehen durch den Verlust an Zellzusammenhalt in den mittlerweile gewachsenen Adenomen ausgeprägte Dysplasien. Den Übergang zum Karzinom bedingt schließlich der Ausfall des Tumorsuppressorgens *p53*. Im gesunden Organismus verhindert das Protein, welches für das *p53*-Gen kodiert, die Replikation geschädigter DNA und regt abnorme und überflüssige Zellen zur Apoptose an. Eine Inaktivierung des *p53*-Gens bedingt ein Ausbleiben der Apoptose – dem programmierten Zelltod. Durch wenig kontrolliertes Wachstum entsteht somit das Karzinom [Bradley et al. 1997, Jakobasch et al. 1997].

1.1.2 Klinik / Diagnostik

Die klinischen Symptome des KRK können sehr unspezifisch sein. Die Patienten klagen über Phasen der Obstipation oder Durchfall sowie über schmerzhafte Stuhlabgänge (Tenesmen), Meteorismus oder Flatulenzen. Das Symptom des „falschen Freundes“ wird von betroffenen Patienten häufig genannt. Es beschreibt einen unbeabsichtigten Abgang von Stuhl schon bei leichter Flatulenz. Nicht selten berichten die Patienten über Abgeschlagenheit, oft in Folge einer Anämie, über einen ungewollten Gewichtsverlust oder Blutanhaftungen am Stuhl.

Erste diagnostische Maßnahme sollte es sein, den Patienten körperlich zu untersuchen. Ohne Zuhilfenahme technischer Vorrichtungen sind KRK – allerdings in prognostisch eher ungünstigen, fortgeschrittenen Stadien – oft schon durch die Inspektion des Afters, die digital rektale Untersuchung, sowie durch Palpation des Abdomens zu entdecken.

Die Suche nach einem KRK kann außerdem durch eine Sonographie oder eine Computertomographie (CT) erfolgen. Jedoch sind beide Verfahren nicht sensitiv genug. Das diagnostische Instrument der Wahl ist die Koloskopie. Mit dieser zuverlässigsten Methode zum Nachweis eines KRK können etwa 98% der KRK erkannt werden (im Vergleich dazu 60% bei der Rektoskopie und etwa 75% bei der Sigmoidoskopie). Nach Diagnosestellung ist eine gezielte Suche nach Metastasen unerlässlich. Etwa 63% der Patienten haben bei Diagnosestellung bereits regionale- oder Fernmetastasen. Nur 37% der KRK werden bereits im Stadium der lokalisierten Erkrankung diagnostiziert [Tumorzentrum München 2006].

1.1.3 Therapie

Die Therapiestrategien beim KRK hängen in erster Linie vom Vorhandensein von Metastasen ab. Beim Karzinom ohne Fernmetastasen kann von einem kurativen Therapieansatz ausgegangen werden. Die Heilungschance bei früher Entdeckung des Karzinoms und ebenso früher chirurgischer Intervention ist hoch. Jedes Kolonkarzinom sollte nach Möglichkeit radikal reseziert werden. Die Beseitigung des Primärtumors „en bloc“, sowie die Entfernung des entsprechenden Lymphabflussgewebes steht im Vordergrund. Ob eine adjuvante Chemotherapie an die operative Maßnahme Anschluss findet, hängt vom Stadium des Tumors ab. Insbesondere beim tiefsitzenden Rektumkarzinom kann eine neoadjuvante Radiochemotherapie, im Hinblick auf den Erhalt der Sphinktermuskulatur, sinnvoll sein. Durch „Downstaging“ bzw. „Downsizing“ des Tumors soll eine bessere Resektabilität gewährleistet werden [Bradley et al. 1997].

Hat das KRK bereits metastasiert, wird das Therapieregime von der Klinik des Patienten bzw. von der Ausdehnung der Metastasen bestimmt. Primäre Zielorgane der Metastasierung sind Leber (75%), Lunge (15%) und Knochen (5%) [Woltmann et al. 2000].

Ob ein kurativer oder rein palliativer Ansatz gewählt wird, muss im Einzelfall entschieden werden. Ein palliativer Therapieansatz schließt jedoch eine chirurgische Intervention nicht aus. Besteht eine Stenosesymptomatik oder kommt es zu starken Blutungen, so kann eine Operation zwingend notwendig werden. Dem Patienten kann in palliativem Sinne durch Anlage eines Bypasses bzw. eines vorgeschalteten Anus praeters geholfen werden. Um Komplikationen wie Perforation, Tumorzerfall etc. vorzubeugen, wird der Tumor hierbei intraoperativ knapp im Gesunden reseziert. Die Stadieneinteilung des KRK folgt der TNM-Klassifikation. Abhängig von der TNM-Klassifikation ist die Einteilung der UICC (International Union against cancer). Alternativ kann auch nach Dukes/Turnbull klassifiziert werden. Die Wahl des Operationsverfahren im kurativen Ansatz richtet sich im Allgemeinen nach der Lokalisation des Tumors.

1.1.4 Familiäre Häufung – syndromale Erkrankungen

Etwa 65-85% der KRK entstehen „spontan“, 10-30% der KRK-Fälle entfallen auf Patienten bei denen überzufällig häufig Karzinome in der Familie vorkommen, also eine positive Familienanamnese besteht, aber kein Mendelscher Erbgang erkennbar ist. Etwa 5% der entstandenen KRK fußen auf den syndromalen Erkrankungen HNPCC (Hereditary NonPolyposis ColorectalCancer), FAP (familiäre Adenomatöse Polyposis) und einigen sehr seltenen KRK-Syndromen, die einem klar erkennbaren Erbgang folgen und somit innerhalb von Familien vererbt werden können [Burt et al. 1996].

Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass es auch außerhalb der bekannten syndromalen Erkrankungen einen familiären Zusammenhang beim sporadischen KRK zu geben scheint. Ein schwedisches Forscherteam hat sich der Frage angenommen, inwiefern es Umwelteinflüsse und/oder erbliche Einflüsse sind, die eine positive Familienanamnese zum Risikofaktor für das KRK werden lässt. Zur Klärung dieser Frage bediente man sich der schwedischen Datenbank für familiäre Krebserkrankungen, in der 10.3 Millionen Individuen mit invasiven Krebserkrankungen erfasst sind. Es wurden standardisierte Verhältnisse für das Auftreten (SIR's – standardized incidence ratio's) bei Nachkommen, Geschwistern und Ehegatten berechnet, die auf Attributen wie Alter, Geschlecht, Wohnort und sozioökonomischem Hintergrund basierten. Eine SIR von „0“ entspricht einem nicht-signifikantem Ergebnis. Ein erhebliches Risiko für die Nachkommen von Patienten mit KRK konnte im Eltern-Kind Vergleich festgestellt werden (SIR 1,74-1,84). Das Geschwisterrisiko, insbesondere für die Entstehung von Karzinomen im Kolon ascendens (rechtsseitiges Kolon), war enorm erhöht und wurde mit einem SIR von 6,89 angegeben. Anhand dieser Ergebnisse musste also von einer erblichen Komponente ausgegangen werden. Zur Untersuchung der Auswirkungen von sozioökonomischem Status, Wohnort etc. wurden Ehepaare untersucht. Die als Ergebnis vorliegenden SIR-Werte von <1,0 lassen keinen aussagekräftigen Zusammenhang zwischen dem Auftreten eines KRK bei nicht verwandten aber im gleichen Umfeld, in ähnlichen Gewohnheiten lebenden Personen zu [Hemminki et al. 2004].

Eine in Frankreich in den Jahren 1993-1998 durchgeführte Studie befasste sich mit dem Risiko für Verwandte erkrankter Angehöriger und dem Zusammenhang zwischen Erkrankung und Alter bzw. Geschlecht. 761 Familien wurden hierfür untersucht. Die gefundenen Ergebnisse zeigten, dass das KRK Risiko beim Vergleich von Fällen und Kontrollen

verschiedener Altersgruppen in Abhängigkeit des Geschlechts stieg bzw. fiel. So stieg das kumulative KRK-Risiko in der Gruppe der unter 60-jährigen männlichen Probanden früher an als das Risiko der weiblichen Probanden in der gleichen Altersgruppe. Dies spricht für möglicherweise vorhandene geschlechtsspezifische Mechanismen in der Entstehung des KRK, beispielsweise ein Interagieren genetischer Faktoren, bei Individuen weiblichen Geschlechts [Andrieu et al. 2003].

Eine irische Studie untersuchte die Eltern und Geschwister von 205 an KRK erkrankten Patienten. Es wurden hierbei nur Patienten mit einbezogen bei denen die Erkrankung in einem Alter unter 55 Jahren auftrat. Diese Studie befasste sich mit der Mortalität bzw. mit dem Auftreten eines KRK bei erstgradig Verwandten. Den Ergebnissen zufolge haben Geschwister eines an KRK erkrankten Patienten unter 55 Jahren ein bis zu 6.15 – fach erhöhtes Erkrankungsrisiko [Johns et al. 2002]. Das Geschwisterrisiko liegt damit im Bereich anderer polygener Erkrankungen.

Je nach Anzahl der erkrankten Verwandten und nach Verwandtschaftsgrad lassen sich ausgehend vom bereits erwähnten Lebenszeitrisko in der Normalbevölkerung von 2-5% folgende Lebenszeitriskiken bei positiver Familienanamnese schätzen: Ist ein 1^o Verwandter erkrankt so steigt das individuelle Risiko auf etwa 6%, bei einem 1^o und einem 2^o erkrankten Verwandten beträgt das Risiko etwa 8%. Hat man einen 1^o Verwandten mit Manifestation des KRK im Alter < 45 Jahren in der Familie, so steigt das eigene Risiko an einem KRK zu erkranken bereits auf 10%. Sogar 17% Lebenszeitrisko bestehen, wenn bei zwei 1^o Verwandten ein KRK diagnostiziert wurde [Aarnio et al. 1995, Houlston et al. 1990, St John et al. 1993].

Wie bereits erwähnt, haben etwa 5% der vorkommenden KRK Ihren Ursprung in verschiedenen syndromalen Erkrankungen, bei denen ein Erbgang im Sinne der Mendelschen Regeln erkennbar ist. Die beiden häufigsten Syndrome, das HNPCC sowie die FAP, aber auch seltenere syndromale Erkrankungen werden im Folgenden vorgestellt.

Das HNPCC (hereditäres nicht-polypöses-colorectales-Carcinom) ist das zahlenmäßig häufigste KRK mit erkennbarem Mendelschen Erbgang. Erstmals beschrieben wurde es bereits 1913 von Dr. Alfred S. Warthin, einem US-amerikanischen Pathologen. Einer der bekanntesten Beschreiber des HNPCC ist aber Henry T. Lynch. Es wird mit etwa 80%

Dominanz autosomal-dominant vererbt. Mittlerweile gelten, durch systematisch durchgeführte genetische Untersuchungen des HNPCC, 5 Gene als wegweisend für die Entstehung dieser Erkrankung.

Keimbahnmutationen in den folgenden Genen können zum Auftreten eines hereditären non-polypösen Karzinoms führen: *MSH2* [Leach et al. 1993], *MLH1* [Papadopoulos et al. 1994, Bronner et al. 1994], *PMS1*, *PMS2* [Akiyama et al. 1997] und *MSH6* [Miyaki et al. 1997]. Diese Gene gehören zur Gruppe der so genannten DNA-Mismatch-Reparaturgene, deren Aufgabe es ist, eventuelle Fehler bei der Replikation der DNA im Rahmen der Zellteilung zu erkennen und zu beseitigen. Je nach Quelle macht das HNPCC einen Anteil von 3-8% an den bekannten KRK Fällen aus [Vogelstein et al. 1988, Bradley et al. 1997].

Die FAP (familiäre adenomatöse Polyposis coli) macht etwa 1% der KRK-Fälle aus. Sie wird ebenfalls autosomal-dominant vererbt. Als Ursache gilt eine Keimbahnmutation des *APC*-Gens. Gekennzeichnet ist diese Erkrankung durch multiple Adenome (>100) und ein nahezu 100%-iges Erkrankungsrisiko für ein KRK. Die FAP-Patienten erkranken im Median bereits im Alter von 35 Jahren am KRK. Aufgrund des frühen Auftretens der Polypen und des beinahe 100%-igen Entartungsrisikos, werden FAP-Patienten nahezu regelhaft noch vor dem 20. Lebensjahr protektiv Proktokolektomiert [Layer et al. 2000].

Als Turcot-Syndrom, benannt nach dem kanadischen Chirurgen Jacques Turcot, wird eine Kombination aus der genannten FAP und einer Manifestation von Tumoren im ZNS bezeichnet. Dieses Syndrom ist ausgesprochen selten und macht < 1% der KRK-Fälle aus. Ursächlich für die Entstehung sind Mutationen im Tumorsuppressorgen APC und in den Mismatch-Reparatur-Genen *hMLH1* und *hPMS2* [Lebruna 2007, De Rosa et al. 2000, Hamilton et al. 1995].

Beim Peutz-Jeghers-Syndrom, benannt nach dem niederländischen Internisten Johannes Laurentius Augustinus Peutz und dem Amerikaner Harold Joseph Jeghers, oder Peutz-Jeghers-Hamartose, kommt es zu Polypen im Gastrointestinal-Trakt verbunden mit charakteristischen Pigmentflecken an Haut und Schleimhäuten. Auch dieser Erkrankung liegt ein autosomal-dominanter Erbgang zugrunde. Ursache für dieses äußerst seltene Syndrom ist eine Mutation der Serin-Threonin-Kinase STK-11. Der Anteil an KRK, die Ihren Ursprung im Peutz-Jeghers-Syndrom haben ist mit unter 0,1% sehr gering [Tomlinson et al. 1997].

1.2 Molekulargenetische Befunde zum sporadischen Kolonkarzinom

Seit Jahren beforschen internationale Teams Kandidatengene, also Gene die aufgrund Ihrer biologischen Funktion möglicherweise zur Ätiologie einer bestimmten Krankheit beitragen, die bei der Entstehung des KRK eine ursächliche Rolle spielen.

Da die Ursächlichkeit des Mismatch-repair-Mechanismus in der Entstehung des KRK, beispielsweise wie bei der oben beschriebenen syndromalen Erkrankung HNPCC, gut erforscht ist, sind diese MMR-Gene attraktive Kandidaten auch für die Untersuchung des sporadischen KRK. In mehreren internationalen Studien konnten bereits Hinweise dafür gefunden werden, dass Variationen im DNA Reparaturmechanismus auch eine Rolle ausserhalb der syndromalen KRK Erkrankungen spielen.

Beispielsweise war die Variante D132H Variante im MMR-Gen *MLH-1* mit israelitischen KRK Patienten assoziiert. Dies wurde in einer groß angelegten Fall-/Kontroll-Studie mit über 3000 einbezogenen Israelis belegt. Fälle und Kontrollen stammten hierbei aus dem Norden Israels. Als Fälle wurden Patienten ausgewählt bei denen im Zeitraum zwischen dem 01.01.1999 und dem 31.03.2004 ein KRK erstmals diagnostiziert wurde. Zur besseren Vergleichbarkeit der Fälle und Kontrollen wurde, wie auch in unserer Studie, ein Geschlechts- und Altersabgleich zwischen den beiden Gruppen durchgeführt. Bei 1,3% der Fälle konnte die Variante D132H im MMR-Gen *MLH-1* gesehen werden. [Lipkin et al. 2004].

Diese Studie wurde überprüft, indem in Amerika insgesamt über 1100 Krebspatienten (629 mit KRK und 515 mit Endometrium-Karzinom) auf die Variante D132H hin untersucht wurden. Das Ergebnis der Studie lies den Schluß zu, dass es erhebliche ethnische Unterschiede in der Entwicklung von Karzinomen zu geben scheint. Die bei den israelischen Patienten der Lipkin Studie vorkommende Variante D132H des MMR-Gens *MLH1*, konnte in der amerikanischen Kohorte nicht nachgewiesen werden. [Shin et al. 2005].

Eine koreanische Forschergruppe konnte die Variante R154H des Gens *OGG1* mit der Entstehung von KRK in Verbindung bringen. Insgesamt 14 R154H Polymorphismen des Gens *OGG1* wurden in Voruntersuchungen entdeckt. Anschließend wurden 625 Fälle mit hereditärem oder sporadischem KRK, sowie 527 Kontrollen auf diese Varianten hin untersucht.

Das Ergebnis, eine leicht höhere Expression der Variante bei den Fällen, lies den Schluß zu, dass R154H zumindest eine mäßig ausgeprägte Rolle in der Entstehung des KRK spielen könnte [Kim et al. 2004].

Farrington et. al berichteten 2005 über Defekte im Gen *MUTYH*, welche Sie bei 0,8% Ihrer untersuchten Patienten mit einem Krankheitsbeginn unter 55 Jahren bzw. bei 0,54% der gesamten Kohorte fanden. Die Kohorte umfasste über 4000 Individuen (2239 Fälle und 1845 Kontrollen). Die gefundenen Daten waren zur Zeit der Veröffentlichung der aussagekräftigste Beweis für die Ursächlichkeit von MMR-Gen Defekten in der Entstehung des KRK, und zeigten erstmal, dass die heterozygote Trägerschaft eines *MUTYH* Defekts für die Entwicklung eines KRK prädisponieren [Farrington et al. 2005].

Eine schottische Studie zeigte anhand von 870 Patienten die alle im Alter unter 55 Jahren die Diagnose KRK erhielten insgesamt 38 Mutationen in den Genen *MLH1*(15 Mutationen), *MSH2* (16 Mutationen) und *MSH6* (7 Mutationen). Auffällig war, dass die Trägerhäufigkeit bei Männern mit 6% doppelt so häufig war wie bei den untersuchten Frauen mit 3%.

Nach Auswertung von 2938 Patienten-Jahren Nachsorge wurde aber festgestellt, dass die Überlebensrate von Trägern und Nichtträgern der Mutationen identisch waren [Barnetson et al. 2006].

1.3 Genetische Aufklärung komplexer Erkrankungen

Innerhalb des menschlichen Genoms befindet sich eine beträchtliche Variabilität. Eben diese Variabilität ist von großer Bedeutung, wenn es um die Aufklärung der Ätiologie genetischer Ursachen einer Erkrankung geht. Die Suche nach „dem“ krankheitsrelevanten Gen ist außerordentlich schwierig und mit der Suche der sprichwörtlichen „Nadel im Heuhaufen“ zu vergleichen [Geschäftsstelle des Wissenschaftlichen Koordinierungskomitees des deutschen Humangenomprojekts 1998]. Insbesondere gilt dies für die polygenen – komplex genetischen – Erkrankungen, bei denen das Vererbungsmuster nicht allein durch die Mendelschen Gesetze erklärbar ist. Vielmehr kann man bei diesen komplex-genetischen Erkrankungen, wie z.B. der Adipositas, dem Morbus Crohn oder dem Kolonkarzinom, davon ausgehen, dass nicht ein Gen im Gegensatz zur gesunden Bevölkerung verändert ist, sondern, dass Varianten in gleich mehreren Genen bestehen, die darüber hinaus höchstwahrscheinlich auch noch mit Umwelteinflüssen interagieren [Ziegler 2002].

Das menschliche Genom ist zwar im direkten Vergleich zweier Individuen zu 99,9% gleich, jedoch entfallen auf die sich unterscheidenden 0,01% etwa 3.000.000 Sequenzunterschiede.

Da die herkömmlichen Studiendesigns in der Masse für die Erforschung monogener Erkrankungen entwickelt wurden und ein Studiendesign bzw. eine Methode eben immer genau das misst, was Sie messen soll, hat es sich das US-amerikanische Humangenomprojekt zur Aufgabe gemacht, neue Methoden zur Untersuchung komplexer Erkrankungen zu entwickeln [Vogel 2000, Collins et al. 1998]. Über von Francis Collins, dem Leiter des Humangenomprojekts, vorgeschlagene Pfade, wurden über komplizierte bzw. langwierige Kopplungsstudien, chromosomale Regionen entdeckt bzw. eingengt, um so die Krankheit auf eine spezifische genomische Region zu kartieren. Dieser Ansatz wurde in erster Linie in Untersuchungen mit Familien verwandt.

Durch die mittlerweile zum Standard gewordene genomweite Suche mit SNP's (single-nucleotid-polymorphisms) unter Verwendung des Prinzips der Assoziation, ist es möglich geworden im Sinne einer Fall/Kontroll-Studie, Gesunde mit Erkrankten zu vergleichen. Unabhängig von Familien, kostengünstiger und vor allem weniger zeitintensiv. Die verwendeten Begriffe werden im Folgenden näher erklärt.

1.3.1 Fall-/ Kontrollstudien

Fall Kontrollstudien (engl. case control study) gehen methodisch den umgekehrten Weg einer Kohortenstudie. Bei einer Fall-Kontrollstudie, wie auch in dieser Untersuchung, ist der Krankheitsstatus bekannt und die Exposition unbekannt. Sie eignet sich insbesondere für seltene Erkrankungen, da eine Kohortenstudie sehr viele Teilnehmer haben müsste, um eine statistisch ausreichende Anzahl Erkrankter zu erreichen. Die Studienpopulation der Fall-Kontrollstudie besteht aus Erkrankten und Gesunden, wobei aus statistischen Gründen auf einen Erkrankten auch zwei oder mehr Gesunde kommen können (1:2 matching, 1:n matching). Erst nach der Zuordnung zu den beiden Gruppen wird die Exposition erfasst, um Beeinflussungen des Ergebnisses durch die Beobachter auszuschließen.

Ausgewertet wird die Chance (engl. odds) der Erkrankten, exponiert zu sein. Sie ergibt sich aus der Zahl der Erkrankten mit Exposition dividiert durch die Zahl der Erkrankten ohne Exposition ('nicht' die Gesamtzahl der Erkrankten). Analog wird die Chance der Gesunden berechnet, exponiert zu sein. Die Division der Chance der Erkrankten durch die Chance der

Gesunden ergibt das Chancenverhältnis (engl. odds ratio).

Es entspricht dem Faktor, um den sich die Chance erhöht, durch die Exposition zu erkranken. In einer Fall-Kontrollstudie muss man das Chancenverhältnis und nicht etwa das Risikoverhältnis berechnen, da man durch die willkürliche Wahl der Anzahl von Kontrollpersonen den Nenner des Risikoterms (der Summe von a+b) verzerren würde. Hingegen würde sich eine Verdoppelung von Kontrollen beim Chancenverhältnis wieder rechnerisch herauskürzen (doppelt so viele im Zähler wie im Nenner). Bei seltenen Erkrankungen entspricht das Chancenverhältnis dem Risikoverhältnis. Fall-Kontrollstudien sind grundsätzlich retrospektiv.

1.3.2 Kopplung /Assoziation

In der genetischen Epidemiologie finden zwei Ansätze Anwendung, wenn es darum geht chromosomale Regionen einzuengen oder zu entdecken, in denen sich funktionsrelevante DNA-Varianten befinden. Gemeinsam haben die beiden Ansätze Assoziation und Kopplung, dass Sie eine Abweichung von den Mendelschen Gesetzen der unabhängigen Vererbung messen. Jedoch geschieht dies bei Assoziation bzw. Kopplung auf zweierlei Weisen. Von Kopplung spricht man, wenn ein Phänotyp und ein genetischer Marker – allgemein gesprochen „eine Krankheit“ - in überzufälliger Häufung in Familien co-segregieren, also immer gemeinsam vererbt werden (Segregation: Verteilung von genetischem Material während der Zellteilung).

Folgende Idee liegt der Kopplung zugrunde:

Liegt eine dem Phänotyp zugrunde liegende DNA-Sequenz und ein Marker nahe nebeneinander auf einem Chromosom, so ist die Wahrscheinlichkeit, dass diese DNA-Sequenz und der Marker durch Rekombination voneinander getrennt werden gering. Je näher sich DNA-Sequenz und Marker auf einem Chromosom sind, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit der Trennung durch Rekombination. Von Assoziation (lat. associare; dt. vereinigen, verbinden, verknüpfen, vernetzen) spricht man, wenn in einer bestimmten Population ein spezifisches Allel „m“ eines genetischen Markers häufiger bei Erkrankten als bei Gesunden vorkommt. Das Allel „m“ ist also wahrscheinlich mit einer bestimmten Erkrankung verknüpft [Böddeker I et al. 2000].

1.3.3 Haplotyp Blockstruktur

Bei der Untersuchung der Variabilität des menschlichen Genoms, mit dem Ziel bestimmte Sequenzvarianten für eine Krankheitsdisposition verantwortlich machen zu können, stößt man schnell auf ein grundlegendes Problem, nämlich die große Zahl der Varianten. Dieser Umstand macht es schwer diejenigen Varianten herauszufiltern, die an der Ätiologie von Krankheiten beteiligt sind. Eine deutliche Vereinfachung dieser Suche erfolgte durch die Entdeckung der Blockstruktur des menschlichen Genoms. Mit der Blockstruktur wurde ein Organisationsprinzip in den genetischen Variabilitäten gefunden, welches Erklärungen für die Abhängigkeit zweier Varianten findet, die in enger räumlicher Nähe auf einem Chromosom liegen. Ganz entscheidend ist die Variabilität des Genoms geprägt durch sogenannte SNP's (single nucleotide polymorphisms), dies sind kleinste Unterschiede in der DNA-Sequenz [Cichon et al. 2002]. Zwar ist nur ein geringer Teil dieser Einzelbasenpolymorphismen von Relevanz für die Entstehung von Krankheiten – bei einer Menge von mehreren Millionen SNP's ist es aber weder technisch, noch aus ökonomischen Gesichtspunkten sinnvoll, jeden einzelnen SNP zu untersuchen. Durch die Entdeckung der sogenannten Haplotyp-Blockstruktur des menschlichen Genoms ist dies aber in vielen Fällen auch gar nicht notwendig. Durch die Existenz des Kopplungsungleichgewichts, welches ein überzufällig häufiges gemeinsames Vorkommen zweier nahe beieinander liegender Loci beschreibt, kann man durch das Vorliegen der ersten Variante mit erheblicher Wahrscheinlichkeit auf das Vorhandensein der zweiten Variante schließen [Böddeker et al. 2000]. Für die Suche nach bestimmten Krankheitsgenen heisst dies, dass man die Zahl der zu untersuchenden Varianten eines Individuums stark einschränken kann, da man über gefundene Varianten die übrigen Varianten ableiten kann. Der experimentelle Aufwand einer Studie auf der Suche nach einem Krankheitsgen hängt nun aber noch entscheidend von der Größe der genomischen Strukturen ab, in denen Kopplungsungleichgewicht herrscht. Erste Berechnungen von Leonid Kruglyak - Professor für Ökologie und Evolutionsbiologie und Direktor des Lewis-Sigler Instituts für integrative Genomforschung Princeton, gingen von nur geringen Ausdehnungen des Kopplungsungleichgewichts aus. Glücklicherweise wurde aber inzwischen festgestellt, dass sich Kopplungsungleichgewichte häufig über ein Vielfaches der von Kruglyak berechneten Distanzen erstrecken [Kruglyak 1999, Reich et al. 2001, Reich et al. 2002]. Diese Distanzen, die sich durch Kopplungsungleichgewicht auszeichneten, wurden als Blöcke bezeichnet.

Diese Blöcke kommen im Wechsel mit meist kürzeren Regionen vor, in denen wiederum kein Kopplungsungleichgewicht herrscht [Jeffreys et al. 2001].

In den Regionen - in denen kein Kopplungsungleichgewicht nachweisbar ist – die also „variabler“ erscheinen, haben sich gewissermaßen alle Rekombinationsereignisse der Populationsgeschichte ereignet. In den Blöcken – in denen Kopplungsungleichgewicht nachweisbar ist – hat praktisch keine Rekombination stattgefunden. Daraus folgt, dass die Allele verschiedener Polymorphismen innerhalb dieser Blöcke voneinander abhängen. Dies wiederum bedingt, dass die Zahl der zu beobachtenden Allelkombination (Haplotypen) stark vermindert ist. Aus den gefundenen Blöcken und den zu beobachtenden Allelkombinationen – den Haplotypen – ergibt sich die Namensgebung Haplotyp-Blockstruktur.

1.3.4 HAPMAP – Projekt

Das HapMap (Haplotype-Mapping) Projekt begann offiziell mit einer Konferenz am 27. – 29. Oktober 2002. Eine Zusammenarbeit durch Forscher aus Japan, England, Canada, China, Nigeria und Amerika sollte, vorerst auf die Dauer von 3 Jahren beschränkt, in 2 Phasen unterteilt sein. Ziel des Projekts war die Kartographierung der Haplotypen des menschlichen Genoms. Hierfür wurde die DNA von insgesamt 270 Menschen untersucht. Herkunft dieser 270 Menschen war Nigeria, China, Japan und die USA – wobei bei den US-Amerikanern auch europäische Einflüsse durch Verwandtschaft mit Europäern mit eingeflossen waren. Durch diese Art der Vermischung ethnischer Gruppen sollte eine weltweite Gültigkeit der Ergebnisse erreicht werden. Einfach gesprochen hat dieses internationale Team 3 Jahre lang das menschliche Genom nach winzigen Unterschieden untersucht. Die Muster der genetischen Variation des Menschen sollten auf dieser HapMap (Haplotypen-Landkarte) beschrieben werden. Es sollte Forschern auf der ganzen Welt die Möglichkeit gegeben werden, kostenfrei auf die Ergebnisse zugreifen zu können, um Ihre Suche nach krankheitsbedingenden Genen bzw. Genen, die Einflüsse auf Umweltreize und Medikamente ausüben, möglichst effizient zu gestalten.

Das HapMap-Projekt hatte also nie den Anspruch in direkter Art und Weise nach den krankheitsbedingenden Genen zu fahnden, sondern vielmehr Forschern weltweit zu ermöglichen auf deutlich vereinfachtem Wege „selbst“ auf ein „krankmachendes“ Gen zu stoßen. Es ist nun durch die HapMap möglich geworden die Haplotypen einer Gruppe erkrankter Individuen (Fall) mit den Haplotypen einer ähnlichen Gruppe nicht erkrankter

Individuen (Kontrolle) zu vergleichen. Sollte ein bestimmter Haplotyp in der Gruppe der Erkrankten überzufällig häufig im Vergleich zur Kontrollgruppe vorkommen, so ist möglicherweise ein Gen lokalisiert worden, welches in - oder zumindest nahe bei - diesem Haplotypen liegt [www.hapmag.org].

Im Oktober 2005 wurde die erste Phase des Projekts durch Veröffentlichung der Ergebnisse in der Zeitschrift „Nature“ für erfolgreich beendet erklärt [Nature 437, 2005]. Phase 2 des Projekts wurde eingeläutet. Im Oktober 2007 konnte ebenfalls in der Zeitschrift „Nature“ die zweite Generation der Haplotypen-Landkarte des Menschen mit über 3.1 Millionen SNP's vorgestellt werden [Nature 449, 2007].

1.3.5 Genetische Marker

Bis heute sind 4 Arten von genetischen Markern bekannt, die sich wiederum in 2 Gruppen unterteilen lassen.

1. Die Mitte der 80er Jahre entdeckten Minisatelliten (VNTR's – variable number of tandem repeats), sowie die kurze Zeit später entdeckten Mikrosatelliten (STR – short tandem repeats). Diese beiden Typen der genetischen Marker liegen in der Regel in nichtkodierenden Sequenzen und werden als repetitive Sequenzen bezeichnet.

2. Die erste Generation genetischer Marker wurde Mitte der 70er Jahre entdeckt. Sie trägt den Namen Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLPs). Diese Marker stehen in einer Gruppe mit den so genannten single nucleotide polymorphisms (SNPs), die erst Ende der 90er Jahre entdeckt wurden. Beide Marker-Typen stehen sowohl in kodierenden als auch in nichtkodierenden Sequenzen und stellen Mutationen eines einzelnen Basenpaars, so genannte Einzelbasenaustausche, dar [Cichon 2002]. Die SNPs werden heute als Schlüssel zum Verständnis häufiger Erkrankungen gesehen. Sie machen etwas 90% der interindividuellen genetischen Variabilität aus [Collins et al. 1998].



Abb.1: Polymorphe Stellen in der DNA-Sequenz im Vergleich zweier Chromosomen

Diese Abbildung soll veranschaulichen, dass ein SNP nur durch den Austausch einer einzelnen Base gekennzeichnet ist. Im Gegensatz hierzu die Mini-/Mikrosatelliten, bei denen Sequenzmotive unterschiedlich oft wiederholt werden.

1.4 Die Kandidatengene *MSH6* und *PMS2*

Zusammen mit den Mismatch-Repair-Genen *MSH2*, *PMS1* und *MLH1* sind die MMR-Gene *MSH6* und *PMS2* bereits „alte Bekannte“ in der Entstehung des HNPCC. Nachdem Lipkin im Jahr 2004 die Variante D132H des MMR-Gens *MLH1* mit der Entstehung des sporadischen KRK assoziieren konnte, besteht die berechtigte Frage, ob nicht auch die MMR-Gene *MSH6* und *PMS2* mit dem Auftreten eines sporadischen KRK in Verbindung stehen könnten [Lipkin et al. 2004]. Folgend sollen diese beiden Vertreter der MMR-Gene vorgestellt werden.

1.4.1 *MSH6*

Der offizielle Name des *MSH6* Gens ist: „mutS homolog 6 (E. coli)“. Die molekulare Lokalisation auf Gen2 lautet: Basen-Paare 47,863,789 bis 47,887,595. Das *MSH6* Gen ist auf dem kurzen Arm (p) des Chromosoms 2 auf Position 16 lokalisiert (2p16).

Das *MSH6* Gen enthält Anweisungen zur Herstellung eines Proteins das eine wichtige Rolle in der DNA-Reparatur spielt. Dieses Protein erkennt Fehler, die bei der DNA-Replikation in Vorbereitung auf die Zellteilung gemacht werden. Zusammen mit dem *MSH2* Protein formiert sich *MSH6* zu einem aktiven Proteinkomplex, welcher die Orte auf der DNA erkennt, an denen im Laufe der DNA-Replikation Fehler geschehen sind. Nachdem der Fehler erkannt wurde, übernimmt ein *MLH1-PMS2* Proteinkomplex den eigentlichen Reparaturvorgang.

Das *MSH6* Gen ist also Mitglied einer Gruppe von Genen, welche als „mismatch-repair-gene“ (MMR) bezeichnet werden. Veränderungen im *MSH6* Gen können ernsthafte Folgen für den Organismus haben. In 7-10% der Familien mit HNPCC und vorhandener Mutation im Genom ist auch das *MSH6* Gen verändert [Miyaki et al. 1997, Berends et al. 2002, Peltomaki et al. 2003].

All diese Mutationen verursachen die Produktion eines besonders kurzen, nicht funktionstüchtigen MSH6 Proteins, oder eine nur teilweise aktive Form dieses Proteins. Fehlt das MSH6 Protein oder funktioniert es nicht richtig, steigt während der Zellteilung die Zahl der Fehler die unrepariert bleiben enorm an.

Teilen sich die Zellen weiter, akkumulieren die Fehler in der DNA. Die Zellen werden unfähig richtig zu funktionieren und können einen Tumor im Dickdarm oder an einem anderen Ort des Körpers, beispielsweise dem Endometrium, bilden. Menschen mit Mutationen im *MSH6* Gen haben ausserdem ein erhöhtes Risiko einen Tumor in den Ovarien, dem Magen, dem Dünndarm, der Leber, dem Gallenblasengang, dem oberen Harntrakt, dem Gehirn und an der Haut auszubilden.

Einige Mitglieder von Familien in denen HNPCC festgestellt wurde, zeigen eine Mutation in beiden Kopien des *MSH6* Gens. Menschen mit einer homozygoten Mutation des *MSH6* Gens haben eine syndromale Ausprägung des HNPCC. Sie könnten Leukämien oder Lymphome entwickeln. Ausserdem entwickeln sich bei einigen dieser Individuen nicht-kanzeröse Tumore, welche entlang der Nervenzellen wachsen, und als sogenannte „Cafe-au-lait-Flecken“ an der Haut in Erscheinung treten. Diese beiden Zeichen sind charakteristisch für den Zustand der Neurofibromatose. Der Beginn einer Dickdarmkrebserkrankung bei diesen Menschen kann extrem früh – oft schon während der Kindheit - stattfinden. Dieses Syndrom, das den Dickdarmkrebs an sich, Leukämie oder Lymphome sowie eine Neurofibromatose beinhaltet, wird CoLoN genannt [Genetic Home reference; <http://ghr.nlm.nih.gov>].

1.4.2 *PMS2*

Der offizielle Name dieses Gens ist: “postmeiotic segregation increased 2 (*S. cerevisiae*)”. Die molekulare Lokalisation auf Gen7 lautet: Basen-Paare 5,979,395 bis 6,015,231. Das *PMS2* Gen ist auf dem kurzen Arm des Gens 7 auf Position 22.2 lokalisiert (7p22.2).

Das *PMS2* Gen stellt Anweisungen zur Bildung eines Proteins zur Verfügung, welches eine wichtige Rolle in den Reparaturmechanismen der DNA spielt. Dieses Protein hilft Fehler zu beheben, die in Vorbereitung auf die Zellteilung während der DNA-Replikation entstanden sind. *PMS2* interagiert mit *MLH1* und formt mit ihm einen aktiven Proteinkomplex. Dieser Proteinkomplex koordiniert die Aktivitäten anderer Proteine, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind. Während des Reparaturvorganges wird die Fehler behaftete DNA-Sequenz ausgeschnitten und durch eine korrekte DNA-Sequenz ersetzt. Auch das *PMS2* Gen ist Mitglied der Familie der „Mismatch-Repair-Gene“. Mutationen im *PMS2* Gen werden bei einem geringen Prozentsatz von HNPCC Erkrankten als Teil der Ursache für die Entstehung der Erkrankung angesehen [Hendriks et al. 2006].

PMS2 Veränderungen verursachen die Produktion eines extrem kurzen oder inaktivierten *PMS2* Proteins, welches nicht effizient am DNA-Reparaturvorgang teilnehmen kann. Teilen sich die Zellen weiter, so akkumulieren die Fehler in der DNA, was zu einem unkontrollierten Zellwachstum und der Formation von Krebszellverbänden im Dickdarm oder Rektum führen kann. Veränderungen im *PMS2* Gen verursachen ausserdem vereinzelt eine Variante des HNPCC, das Turcot-Syndrom genannt wird. Zusätzlich zum HNPCC haben diese Patienten eine bestimmte Art von Gehirntumor – das Glioblastom. Sind beide Kopien von *PMS2* betroffen so führt auch dieser Gendefekt zu dem bereits weiter oben beschriebenen Syndromkomplex: CoLoN [Genetic Home reference; <http://ghr.nlm.nih.gov>].

1.5 Zielsetzung

Ziel des Projekts war, nach Aufstellung einer Kohorte mit kolorektalem Karzinom, die Aufklärung genetischer Risikofaktoren für das sporadische Kolonkarzinom anhand der für den DNA- Reparaturmechanismus zuständigen Kandidatengene *MSH6* und *PMS2*, im Fall-/ Kontroll Design.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Patientenkollektiv

Im Rahmen der Studie wurden Patienten rekrutiert, bei denen in den Jahren 2002 – 2005 ein histologisch gesichertes kolorektales Karzinom diagnostiziert bzw. operiert wurde und die durch Operationsberichte verschiedener chirurgischer Kliniken Norddeutschlands und/oder dem Krebsregister Schleswig-Holstein ausfindig gemacht werden konnten. Eingebunden wurden Patienten aus den chirurgischen Abteilungen des Universitätsklinikums, des städtischen Krankenhauses Kiel, sowie im Krebsregister Schleswig-Holstein verzeichnete Patienten. Weiterhin haben das Städtische Klinikum Lüneburg, das Martin- Luther Krankenhaus in Schleswig, die Kreiskrankenhäuser in Eckernförde und Husum, das Malteserkrankenhaus sowie die Diakonissenanstalt Flensburg, das Westküstenklinikum Heide, das Klinikum Nordfriesland in Niebüll, das Klinikum Husum, das Friedrich-Ebert-Krankenhaus in Neumünster, die Klinik Bad Oldesloe, das Klinikum Neustadt, das Klinikum Itzehoe, das Klinikum Rotenburg (Wümme), das Klinikum Stade, das Kreiskrankenhaus Reinbek St. Adolf Stift, das Klinikum Detmold, das Klinikum Bremen Nord, das AK Hamburg Harburg sowie die Häuser AK Hamburg Altona, AK Hamburg Eilbek, AK Hamburg Barmbeck und AK Hamburg Bergedorf an der vorliegenden Studie teilgenommen (s. Grafik).

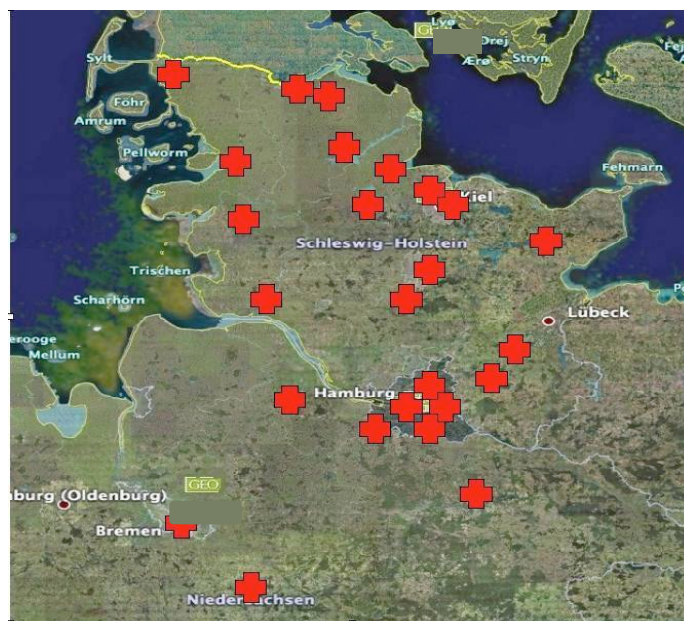


Abb.2: Geographische Darstellung der teilnehmenden Kliniken Norddeutschlands

Einschlusskriterien

Bei den an der Studie teilnehmenden Patienten lag ein histologisch gesichertes kolorektales Karzinom vor (ICD10 C18/19/20). Es wurden Patienten deutscher Herkunft, deren beide Eltern in Deutschland geboren wurden, eingeschlossen. Alle Patienten waren volljährig.

Um eine populationsbasierte Rekrutierung zu erreichen, wurde im Gebiet Schleswig-Holstein nördlich des Nordostseekanals (=Rekrutierungsgebiet des popgen-Projekts) bis zur dänischen Grenze, keine obere Altersgrenze festgelegt. Ein maximales Lebensalter von 65. Jahren galt lediglich für die Patienten südlich des Nordostseekanals. So konnte eine Hochrisikokohorte aufgestellt werden.

Patienten, welche entweder die klinischen Kriterien „Amsterdam“ oder „Bethesda“ für HNPCC erfüllten, wurden ausgeschlossen.

Rekrutierungsplattform

Bei der Forschungsstudie **Popgen** (Populationsgenetik) handelte es sich um ein populationsgenetisches Forschungsprojekt des Universitätsklinikums Kiel, finanziert durch das Nationale Genomforschungsnetz (NGFN).

Die Rekrutierungsplattform **Popgen** wurde genutzt, um ein Patientenkollektiv mit kolorektalem Karzinom zu erstellen. Darüber hinaus befasste sich **Popgen** mit der Aufgabe, die Bedeutung genetischer Prädispositionen verschiedener Erkrankungen auf Bevölkerungsebene zu prüfen. Untersucht wurden, neben des kolorektalen Karzinoms, Krankheiten aus verschiedenen medizinischen Bereichen, wie die koronare Herzerkrankung, das Gallensteinleiden, Epilepsie und der essentielle Tremor. Dieses Projekt wurde direkt gefördert vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) und umfasst medizinische, bioinformatische, statistische sowie epidemiologische Bereiche, die sich mit dem Vorgang der Patientenidentifikation, über die Rekrutierung bis hin zur Genotypisierung befaßten. Mit der **Popgen** Rekrutierungsstruktur ist man in der Lage ein Patientenkollektiv zu erstellen, das sowohl durch seine Größe als auch durch seine Zusammensetzung in der Lage ist, die Bevölkerung zu repräsentieren.

Um eine noch größere Kohorte zu ermöglichen, respektive noch bessere Ergebnisse liefern zu können, wurden zu den 10 im popgen-Gebiet liegenden Kliniken, noch weitere 15 Kliniken,

aus dem nördlichen Teil Niedersachsens sowie Bremen und Hamburg, für die Studie gewonnen.

Die Vorgaben für Datenschutz und Ethik waren für diese 15 weiteren Kliniken auf demselben Niveau, wie Sie bereits für das Popgen-Projekt festgelegt waren. Die in Frage kommenden Patienten wurden durch die einzelnen Kliniken selbst angeschrieben und auf die Studie aufmerksam gemacht. Durch die Rücksendung einer schriftlichen Einverständniserklärung konnten Sie an der Studie teilnehmen. Erst im Anschluss erfolgte die Übersendung der Patientendaten an unser Forschungsprojekt.

2.1.1 Datenschutz und Ethik

Die Ethik- Kommission der Medizinischen Fakultät der Christian- Albrechts- Universität zu Kiel überprüfte die eingereichten Unterlagen vom 29.09.2003 des Studienplanes: **Popgen**-populationsrepräsentative Stichprobe für die populationsgenetische Exploration im NGFN-Phase 1 (AZ: A 156/03) auf berufsethische und berufsrechtliche Bedenken. Die Kommission stimmte darüber überein, dass gegen die Durchführung der Studie keine Bedenken bestehen.

Auch der Antrag auf Ausweitung der Studie zur Untersuchung der genetischen Ursachen des sporadischen Kolonkarzinoms vom 11.05.2004 wurde positiv beschieden.

Für den Datenschutz wurde das Prinzip der Pseudonymisierung verwendet. Für das unabhängige Landeszentrum für Datenschutz in Schleswig- Holstein bestanden im Hinblick auf das Verfahren und die zu Grunde liegende Einwilligungserklärung keine datenschutzrechtlichen Bedenken.

Rekrutierung

Die infrage kommenden Patienten wurden von dem jeweiligen Klinikum auf schriftlichem Wege kontaktiert und zur Teilnahme an der Studie eingeladen. Blieb eine Antwort von Seiten der Patienten aus, wurde ein Erinnerungsschreiben gesendet. Die Personen, die der Teilnahme an der Studie zugestimmt hatten, wurden dann durch Mitarbeiter des **Popgen**- Projektes kontaktiert und dazu aufgefordert, einen zugesandten Fragebogen auszufüllen (Anlage 1). In dem Fragebogen wurde der Patient darum gebeten, Fragen über seine Herkunft, seinen eigenen Gesundheitszustand und den seiner Verwandten zu beantworten. Ebenfalls wurden Fragen beispielsweise zur Lokalisation des kolorektalen Karzinoms, sowie zum Datum der operativen Therapie gestellt. Außerdem wurde 30 ml peripher venöses Blut in ebenfalls

zugesandten EDTA- Blutröhrchen abgenommen. Dieses geschah größtenteils im Rahmen einer Routineuntersuchung beim Hausarzt. Für Patienten, die in Kiel lebten oder sich dort aufhielten, bestand zusätzlich das Angebot, sich das Blut von Studienmitarbeitern abnehmen zu lassen. Weiterhin waren alle Studienteilnehmer dazu verpflichtet, ihre schriftliche Einwilligung zu geben (s. 7.1).

Kontrollgruppe

Als Kontrollgruppe wurden Personen rekrutiert die dem POPGEN Project als Pool zur Verfügung standen. Diese wurden aus Datensätzen des Einwohnermeldeamtes rekrutiert. Probanden bei denen eine maligne, oder entzündliche Darmerkrankung in der Geschichte gefunden werden konnte, wurden ausgeschlossen. Alle Patienten der Kontrollgruppe waren volljährig.

Nach Zusage der Teilnahme an der Studie und nach Unterzeichnung der Einverständniserklärung füllten auch die Kontrollpersonen einen Fragebogen aus (s. 7.3) und sendeten 30 ml venöses Blut zu bzw. ließen sich dieses von Studienmitarbeitern abnehmen.

2.2 Genotypisierung

2.2.1 DNA- Extraktion

Die Extraktion der DNA aus 10 ml Vollblut wurde mit Hilfe des FlexiGene DNA Kits von Qiagen (Hilden, Deutschland) vorgenommen. Dazu wurden 25 ml eines Lyse- Puffers und das Blut in ein 50 ml umfassendes Röhrchen gefüllt und einige Male bis zur vollständigen Lyse der Blutzellen umgeschwenkt. Durch die anschließende Zentrifugierung des Röhrchens für fünf Minuten bei 2000 g, setzten sich die Zellkerne und die Mitochondrien am Röhrchenboden ab. Nach sorgfältiger Entfernung des Überstandes wurden 50 µl Protease und 5 ml des denaturierenden Puffers hinzugefügt. Dieser Puffer enthielt ein chaotropes Salz, welches in der Lage war Makromoleküle wie Proteine und DNA- spaltende Enzyme (Dnasen), nicht jedoch DNA, zu denaturieren. Direkt nach Zugabe dieser zwei Substanzen, musste die Probe sorgfältig gemischt werden, bis sich in dem Röhrchen eine homogene Flüssigkeit befand. Nun wurde die Probe in einem 65°C warmen Wasserbad für 15 Minuten inkubiert. Die Protease sorgte für die enzymatische Aufspaltung der enthaltenen zellulären Proteine und der DNA- gebundenen Histonproteine. Als Nächstes wurden 5 ml Isopropanol hinzugefügt und durch Umschwenken des Röhrchens mit der Probe vermengt. Nach einigen

Sekunden fiel die DNA in Form einer weißlichen, fädigen Substanz aus. Mit Hilfe der Zentrifugierung (drei Minuten bei 2000 g) konzentrierte sich nun die DNA am Boden des Röhrchens. Der Überstand wurde im nächsten Schritt sorgfältig abgegossen. Um zelluläre Verunreinigungen und verbliebenes Salz zu entfernen, wurde das DNA- Pellet im Anschluss mit Hilfe von 5 ml 70%igem Ethanol gewaschen. Nun erfolgte eine weitere Zentrifugierung für drei Minuten bei 2000 g und das Verwerfen des Überstandes. Um Ethanolreste zu entfernen, wurde die DNA anschließend an der Luft getrocknet. Als letzten Schritt löste sich das Erbmaterial durch die Zugabe des Hydratationspuffers und durch Inkubation (in einem 65°C warmen Wasserbads) für eine Stunde. Die DNA- Qualität der Proben wurde dann mittels Gelelektrophorese überprüft. Die Ermittlung der DNA- Konzentration erfolgte dann quantitativ mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Picogreen (Molecular Probes- Invitogen, Carlsbad, Ca, USA). Im Anschluß wurde die DNA- Konzentration der Proben auf 20- 30 ng/µl eingestellt.

2.2.2 Whole genome amplification (WGA)

Bei der WGA handelt es sich um eine Amplifikationsmethode, bei der identische Kopien des gesamten vorhandenen Genoms hergestellt werden. Diese Methode ermöglicht den ressourcenschonenden Umgang mit wertvoller Probanden- DNA und stellt zugleich sicher, dass auch bei einer geringen Menge von Ausgangsmaterial (wenige Nanogramm) ausreichend DNA für die folgenden Analysen vorhanden ist. Hierzu wurde das WGA- Kit von GenomiPhi (Amersham, Uppsala, Schweden) verwendet. Der Amplifikationsprozess basierte auf nachfolgenden Schritten:

- 1.) Genomweite Bindung von Zufalls- Hexamer- Primern an denaturierter Probanden- DNA
- 2.) Paralleler Replikationsbeginn und DNA- Polymerisation an multiplen Loci mittels der DNA- Polymerase Phi29
- 3.) Generierung neuer Einzelstrang- Matrizen- DNA durch Strangersetzungsreaktionen
- 4.) Erneute Anlagerung von Zufalls- Hexamer- Primern und DNA- Polymerisation

Dazu fügte man 1 µl der isolierten DNA und 9 µl des Sample- Puffers (dieser enthielt die Hexamer- Primer) zusammen. Im nächsten Schritt wurde die DNA durch eine 3- minütige Erhitzung bei 99°C denaturiert. Dann wurde die Probe sofort auf Eis gestellt und dadurch bis auf 4°C heruntergekühlt. Danach fügte man 9 µl des Reaktionspuffers und 1 µl der

Enzymmischung hinzu. Im Reaktionspuffer sind die zur Amplifikation benötigten Desoxyribonukleotide enthalten. Außerdem besteht dieser aus verschiedenen Salzen, die einen optimalen pH- Wert für die bevorstehende enzymatische Reaktion sicherstellen. Die Amplifikation erfolgte isothermal bei 30°C für 16- 18 Stunden. Als nächstes wurde das Enzym durch 10- minütiges Erhitzen auf 65°C inaktiviert. Anschließend wurde die Probe nochmals auf 4°C abgekühlt. Im Röhrchen war nun amplifizierte DNA vorhanden. Durch Erhitzen auf 99°C für 3 Minuten wurde die DNA fragmentiert. Schließlich wurden 100 µg der DNA bei Raumtemperatur in TwinTec 384 well plates (Eppendorf, Hamburg) über Nacht getrocknet.

2.2.3 Genotypisierung mit dem SNPlex System

Die Genotypisierung erfolgte unter der Verwendung der SNPlex Reagenzien (Applied Biosystems, Foster City, USA) auf einer robotergesteuerten Plattform. Eingesetzt wurde dazu der TECAN Freedom EVO- und der 384well TEMO liquid handling- Roboter (TECAN, Männerdorf, Schweiz). Diese Art der Genotypisierung nutzt die Ligation von Oligonukleotiden, um allelische Unterschiede sichtbar zu machen. Außerdem wird sie mit der PCR- Technologie kombiniert, um bestimmte Nukleotidsequenzen gezielt zu vermehren. Mit dieser Technologie ist es möglich, bis zu 48 SNPs in einer Reaktion zu genotypisieren. Von vorrangiger Bedeutung bei dieser Methode sind SNP- spezifische Oligonukleotide. Bei den SNP- spezifischen Oligonukleotiden wird für jeden SNP zwischen zwei Allel- spezifischen Oligonukleotiden (ASOs) und einem Locus- spezifisches Oligonukleotid (LSO) unterschieden. Weitere Bestandteile der SNPlex- Reagenzien sind die ASO- und LSO- Linker. Die ASO- Linker besitzen neben den Bindungsstellen für die Oligonukleotide eine universelle PCR-Primer Region und eine charakteristische ZipCode Sequenz. An diese Sequenz hybridisiert im weiteren Verlauf eine komplementäre ZipChute Probe. Eine ZipChute Probe ist eine universelle fluoreszenzmarkierte Oligonucleotidsonde mit einem einmaligen strukturellen Merkmal, welches eine festgelegte Mobilitätsrate während der Elektrophorese gewährleistet. Beide Allele eines SNP-Locus werden durch ein ZipChute Probenpaar repräsentiert, die sich nur in diesem strukturellen Merkmal unterscheiden. Beide ZipChute Proben sind mit dem gleichen Fluoreszenzfarbstoff versehen. SNPlex arbeitet mit insgesamt zwei verschiedenen Fluorophoren. Somit wird die genetische Information eines SNP- Locus bei SNPlex zuerst in der ZipCode Sequenz gespeichert und im späteren Verlauf

mittels ZipChute Proben umkodiert in elektrophoretische Mobilitätsunterschiede, die dann mittels Kapillarsequenziergeräten detektiert werden.

Im ersten Schritt der Genotypisierung erfolgte die Aktivierung sowohl der SNP- spezifischen Proben als auch der Linker durch Phosphorylierung des 5' -Endes. Dabei wurde der Phosphatrest durch eine Kinase von dATP (Desoxyadenosin- Triphosphat) auf das jeweilige Substrat übertragen. Als nächstes fügte man die fragmentierte gDNA (Genomic desoxyribonucleic acid), Ligase und ein Ligationspuffer hinzu. Die Ligase katalysierte nun Reaktionen, durch die sowohl die DNA mit den SNP- spezifischen Oligonukleotiden als auch die Linker mit den Oligonukleotiden eine Verbindung eingingen.

Bei der Purifikation wurden ungebundene sowie nicht vollständig gebundene Bestandteile der DNA und der Oligonukleotide entfernt. Dieses geschah durch die Beifügung von Exonuklease I und Exonuklease lambda, die in der Lage sind, diese Nukleinsäuremoleküle zu spalten. Um zu verhindern, dass auch die gebundenen Substanzen von den Enzymen abgebaut wurden, waren die Linker mit einem internen Spacer synthetisiert. Dieser sorgte dafür, dass die Exonuklease dort nicht angreifen kann.

Im nächsten Schritt erfolgte die Amplifikation der Ligationsprodukte mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR). Dazu wurde ein Set mit universellen Primern verwendet, von denen die reverse Primer biotinyliert vorlagen. Nach Ende der Amplifikation wurde der biotinylierte DNA- Strang durch Streptavidin überzogene Platten erfasst und festgehalten. Dabei gingen Biotin und Streptavidin eine irreversible Bindung ein. Durch nachfolgende Denaturierung und Entfernen des Überstandes blieb nur der biotinylierte Strang zurück.

Zur Dekodierung der allelischen Information der Ligationsprodukte fügte man die ZipChute Proben hinzu. Es folgte eine Hybridisierung dieser mit den ZipCode Sequenzen der Einzelstränge. Im nächsten Schritt wurden die ZipChute Proben von den biotinylierten Strängen abgelöst und mit Hilfe des 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) elektrophoretisch getrennt. Die Datenanalyse erfolgte durch die Software GeneMapper 4.0. (Applied Biosystems).

2.2.4 Auswahl der SNPs

Die SNPs wurden mit Hilfe des International HapMap Project ausgewählt (www.hapmap.org), wobei man dazu eine Auswahl von SNPs der kaukasischen Rasse aus dem CEU (Centre d'Etude du Polymorphisme Humain collection) Datenbestand verwendete.

Folgende Voraussetzungen mussten erfüllt sein:

1. Mendel-Fehler durften nicht auftreten
2. Die geringste Allel-Frequenz sollte mindestens 0,01 betragen
3. Der p-Wert für das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht sollte ebenfalls 0,01 betragen
4. Allel-Frequenz in der kaukasischen Bevölkerung sollte $>0,005$ sein

Außerdem wurden kodierende SNPs mit einer Häufigkeit von über 1% von der dbSNP-Datenbank ermittelt und verwendet. Bereits in der Literatur beschriebene SNP's, bei denen ein Zusammenhang zum sporadischen kolorektalen Karzinom beschrieben wurde, wurden ebenfalls verwendet.

2.3 Analyse

Die Auswertung der Daten wurde unter Verwendung der Sliding-Window-Haplotypen-Analyse durchgeführt. Diese Methode unterteilt die Kandidatenregion in kleinere Analyseabschnitte, als bei herkömmlichen Methoden. Die so gefundenen Analyse-Fenster wurden getrennt auf das Vorhandensein möglicher Assoziationen untersucht. Aufgrund der geringen Größe der Analyseabschnitte, war auch die Anzahl der Haplotyp-Strukturen geringer, im Gegensatz zur Untersuchung der ganzen Kandidatenregion in einem Schritt. Daher mussten für jede einzelne Analyse weniger Parameter einbezogen werden, wodurch konsekutiv die Aussagekraft (Power) über eine möglicherweise vorhandene Assoziation zwischen dem Haplotyp und der Erkrankung stieg.

Aus der Annahme, dass eine Genstruktur, die nahe an der wahren krankheitsauslösenden Variante liegt, eine stärkere Assoziation aufweist, als andere Regionen, folgte die Annahme, dass eine Assoziation in einem kleineren Untersuchungsfenster besser zu erkennen wäre, als bei Untersuchung des ganzen Haplotyps. Für die Analyse wurde das zur Assoziationsanalyse von multilokulären Haplotypen entwickelte Programm UNPHASED gewählt. Das Programm COCAPHASE wurde für die Analyse von Fall-Kontroll-Daten genutzt. X2-Test und Kontingenztafeln kamen bei der Auswertung zum Einsatz.

3. ERGEBNISSE

3.1 Darstellung des Gesamtkollektivs

Für die Untersuchung wurden, wie in Tabelle 1 dargestellt, insgesamt 10.913 Personen durch uns angeschrieben. Von diesen über 10.000 Patienten gelang es uns mit insgesamt 7.569 in Kontakt zu treten. Die übrigen 3344 angeschriebenen Personen waren, in der Zeit zwischen Aufnahme Ihrer Daten im jeweiligen Krankenhaus bzw. dem Krebsregister Schleswig-Holstein und der versuchten Kontaktaufnahme durch uns, entweder unbekannt verzogen, oder leider bereits verstorben. Für die Studie gewinnen konnten wir knapp 40% (N=2892) der Patienten mit denen wir in Kontakt standen.

Die Geschlechtsverteilung war mit 54,9% Männern und 45,1% Frauen nahezu ausgeglichen. Der jüngste Patient war 22 Jahre alt, der älteste 94 Jahre. Der Altersdurchschnitt der Männer lag somit bei 67 Jahren. Die jüngste Patientin war 17 Jahre alt, die älteste 96 Jahre. Es ergibt sich für die weiblichen Patienten ein Altersmedian von 66 Jahren. Das mittlere Alter des gesamten Kollektivs betrug 66,4 Jahre.

Klinik	Ange-schrieben	verzogen, verstorben	Kontakt	Absage	TN Gesamt	TN % Gesamt
Krebsregister	667	140	527	11	177	34
UKSH	1398	566	836	95	476	57
Lüneburg	335	169	166	24	157	95
Rotenburg	324	67	257	11	98	38
Stade	118	39	79	0	41	52
Altona	309	68	241	8	130	54
Eilbek	409	157	252	24	80	32
Detmold	215	27	188	5	95	51
Bergedorf	19	1	18	1	7	39
Reinbek	236	46	190	13	90	47
Schleswig	794	266	528	41	236	45
Malteser Flensburg	399	124	275	17	103	37
Rendsburg	1386	629	757	41	209	28

Klinik	Ange-schrieben	verzogen, verstorben	Kontakt	Absage	TN Gesamt	TN % Gesamt
Eckernförde	470	155	315	7	48	15
Niebüll	239	108	131	12	29	22
Husum	464	202	262	18	79	30
Itzehoe	356	97	259	10	111	43
Städt. KH Kiel	822	22	800	12	169	21
Neumünster	116	22	94	1	55	59
Harburg	188	54	134	4	59	44
Neustadt	89	15	74	1	47	64
Diako Flensburg	127	58	69	5	21	30
Heide	585	198	387	12	167	43
Bad Oldesloe	27	1	26	1	5	19
Bremen-Nord	90	2	88	0	45	61
Barmbek	727	111	616	7	158	26
Summe:	10.913	3.344	7.569	374	2.892	40%

Tabelle 1: Verteilung der für die Studie angeschriebenen Patienten über die verschiedenen partizipierenden Krankenhäuser bzw. das Krebsregister S.-H.

3.2 Das Kollektiv der untersuchten Patienten

Von dem in 3.1 beschriebenen Gesamtkollektiv (N=2892) wurden insgesamt 1068 Patienten (Fälle) in diese Studie einbezogen. Das durchschnittliche Lebensalter der Fälle lag bei 63 Jahren. Das mediane Lebensalter bei Krankheitsbeginn war 59 Jahre. Die Geschlechterverteilung war mit 50% Frauen und 50% Männern ausgeglichen. Alle Patienten waren deutscher Herkunft und zum Zeitpunkt der Untersuchung volljährig. Die Kontrollgruppe ohne KRK bestand aus insgesamt 738 Personen. Das durchschnittliche Lebensalter bei den Kontrollen war 67 Jahre. Das Verhältniss von Frauen zu Männern war auch hier mit 50% Frauen und 50% Männern ausgeglichen.

Kollektiv	Anzahl	Altersdurchschnitt	% Männer
Fälle	1068	63	50%
Kontrollen	738	67	50%

Tabelle 2: Darstellung der analysierten Patienten

3.3 Berechnung der Power

Die Einschätzung der Aussagekraft (power) für den verwendeten Ansatz wurde für “single point allelic effects” über eine odds ratio von 1.0 bis 2.0 auf einem nominalen Signifikanzlevel von 0.05 für Allelfrequenzen von 0.1, 0.2 und 0.5 für den jeweilig auffälligen Marker durchgeführt.

Wie in der untenstehenden Grafik dargestellt, ist die Signifikanz für die Feststellung einer odds ratio von größer als 1.54 bei allen Modellen etwa 80% oder höher. Für alle auffälligen Marker mit einer Allelfrequenz von 0.2 bzw. 0.5 ist eine odds ratio von 1.4 auf diesem Powerlevel zu erkennen.

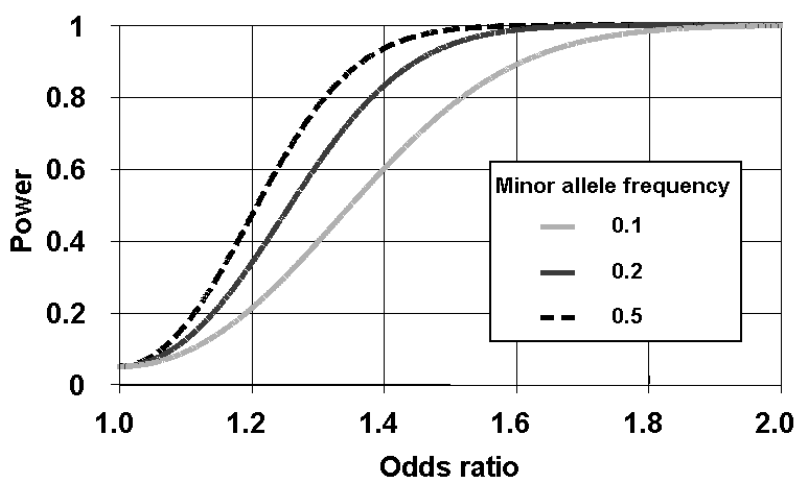


Abb. 3: Einschätzung der Aussagekraft des Tests (y-Achse) bei der genutzten Probengröße auf einem Signifikanzlevel von $p < 0.05$ für einen zweiseitigen Test, über eine Spannweite der odds ratio (x-Achse) im Bereich von 1.0 bis 2.0. Die Grafik wurde mittels des Programms PS-power angefertigt und stellt die Aussagekraft (power) des Tests als Funktion des Chancenverhältnisses (odds ratio) dar [Dupont et al. 1997].

3.4 Ergebnisse zu den Kandidatengen

3.4.1 *MSH6*

Für das Kandidatengen *MSH6* wurden die haplotyp-spezifischen SNP's mittels der für die Kandidatengene verfügbaren Daten aus der HAPMAP Datenbank ausgewählt. Alle auffälligen SNP's (coding SNP's) die bereits in der Literatur mit dem sporadischen KRK in Verbindung gebracht werden konnten, wurden ebenfalls in die Untersuchung mit einbezogen.

Alle anderen kodierenden SNP's wurden in die Untersuchung einbezogen wenn ihre Allelfrequenz in der kaukasischen Bevölkerung bei $> 0,005$ lag. Insgesamt wurden fünfzehn Marker auf dem Gen *MSH6* ausgewählt und genotypisiert. Die Verteilung dieser fünfzehn untersuchten Marker auf dem Gen, sowie die regionale Haplotypstruktur ist in Abbildung 4 zu sehen.

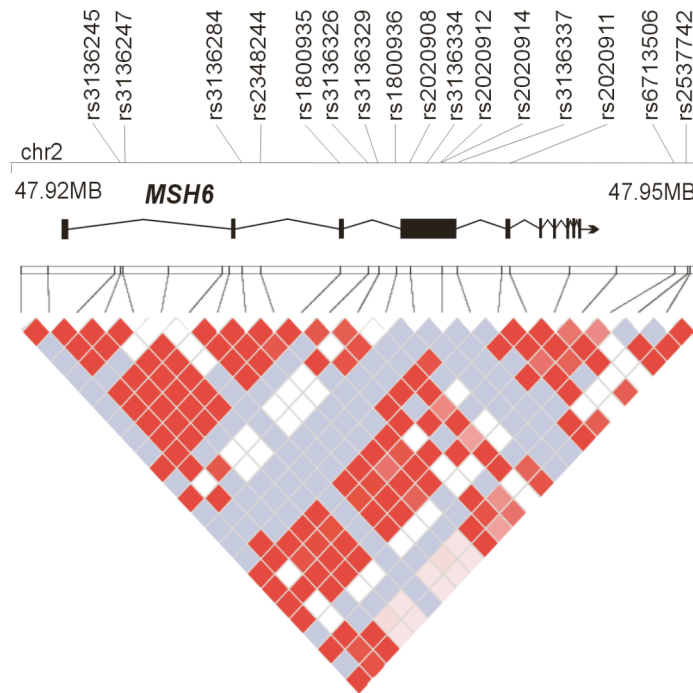


Abb. 4: Blockstruktur des Kandidatengens *MSH6* aus HAPMAP für kaukasische Genotypen. Erzeugt mittels HAPLOVIEW

Diese Marker stellen einen aussagekräftigen Pool dar und inkludieren durch Ihre Lage alle größeren Haplotypen-Blöcke des Kandidatengens. Alle Einzelpunkt- und "sliding window haplotyp" Analysen sind in der untenstehenden Tabelle 3 aufgeführt. Viele der kodierenden SNP's waren nur monomorph im untersuchten Kollektiv vorhanden. Dies lässt auf spezielle Umweltbedingungen oder Vererbungsvorgänge im Sinne einer Akkumulation innerhalb derer Bevölkerungsgruppen schließen, bei denen diese SNP's polymorph vorhanden waren. Es wurde keine Korrektur für Mehrfachtestung durchgeführt, um die Aussagekraft zu verbessern. Keiner der Marker zeigte in den Kontrollen eine signifikante Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Für alle Orte wurde eine "sliding-window-haplotyp" Analyse durchgeführt um zusätzliche potentiell krankheitsbedingende Varianten zu finden, die nicht zu der Gruppe der ausgewählten 15 SNP's gehörten. Keine der Haplotypen Analysen wurden für

Mehrfachtestung korrigiert und es wurden keine signifikanten Assoziationen gesehen ($p > 0.05$). Die seltenen Varianten A878V und V396L waren nicht mit dem phänotypischen auftreten des KRK assoziiert. Es wurden keine Assoziationen des Kandidatengens *MSH6* und dem KRK festgestellt.

Gen - dbSNP id	Position	MAF case	MAF cont	OR _{Rec} [CI _{95%}]	OR _{dom} [CI _{95%}]	P _{allelic}	P _{geno}	HAP2	HAP3	HAP4	HAP5
rs3136245	intron	0.19	0.21	0.64 [0.40-1.03]	0.88 [0.95-2.40]	0.095	0.157	0.241	0.125	0.199	0.445
rs3136247	intron	0.17	0.16	1.07 [0.58-2.00]	1.05 [0.51-1.76]	0.639	0.890	0.549	0.715	0.852	0.806
rs3136284	intron	0.17	0.17	1.09 [0.60-1.99]	1.03 [0.51-1.68]	0.730	0.937	0.943	0.998	0.886	0.686
rs1800935	exon syn D180D	0.28	0.27	1.04 [0.72-1.52]	1.03 [0.67-1.39]	0.771	0.957	0.971	0.893	0.709	0.847
rs3136326	intron	0.11	0.11	1.00 [0.42-2.35]	0.99 [0.42-2.35]	0.929	0.995	0.782	0.388	0.563	0.564
rs3136329	intron	0.44	0.43	1.14 [0.86-1.49]	0.95 [0.64-1.04]	0.552	0.144	0.896	0.903	0.905	0.813
rs1800936	intron	0.13	0.13	0.91 [0.44-1.90]	1.03 [0.53-2.29]	0.852	0.905	0.840	0.841	0.717	0.717
rs2020908	exon V396L	0.01	0.01	n/a*	0.81	0.548	0.546	0.552	0.507	0.507	0.654
rs3136334	exon A623P	0	0	n/a*	n/a*	n/a*	n/a*	0.320	0.320	0.553	0.387
rs2020912	exon A878V	0.003	0.005	n/a*	0.51	0.320	0.220	0.326	0.553	0.409	0.793
rs2020914	exon V886I	0	0	n/a*	n/a*	n/a*	n/a*	0.967	0.382	0.807	0.328
rs3136337	intron	0.11	0.11	0.92 [0.39-2.21]	1.01 [0.46-2.59]	0.974	0.975	0.382	0.807	0.328	#
rs2020911	intron	0.36	0.38	0.80 [0.60-1.07]	0.92 [0.93-1.60]	0.173	0.316	0.563	0.419	#	#

Gen - dbSNP id	Position	MAF case	MAF cont	OR _{Rec} [CI _{95%}]	OR _{dom} [CI _{95%}]	P _{allelic}	P _{geno}	HAP2	HAP3	HAP4	HAP5
rs6713506	3' flanking region	0.15	0.15	1.07 [0.55-2.07]	1.03 [0.49-1.82]	0.795	0.965	0.437	-#	-#	-#
rs2537742	3' flanking region	0.24	0.23	1.24 [0.81-1.90]	1.10 [0.55-1.27]	0.261	0.516	-#	-#	-#	-#

Tabelle 3: Ergebnisse der genetischen Assoziationsanalyse der auf dem untersuchten Gen MSH6 liegenden 15 SNP's. (Informationen zum Lesen der Tabelle - siehe Erläuterungen zu Tabelle 4)

3.4.2 PMS 2

Für das Kandidatengen *PMS2* wurden ebenfalls die haplotyp-spezifischen SNP's mittels der für die Kandidatengene verfügbaren Daten aus der HAPMAP Datenbank ausgewählt. Auch hier wurden alle auffälligen SNP's (coding SNP's) die bereits in der Literatur mit dem sporadischen KRK in Verbindung gebracht werden konnten, ebenfalls in die Untersuchung mit einbezogen. Für alle anderen kodierenden SNP's galt auch hier, dass Sie nur in die Untersuchung einbezogen wurden, wenn ihre Allelfrequenz in der kaukasischen Bevölkerung bei $> 0,005$ lag. Insgesamt wurden zehn Marker auf dem Gen *PMS2* ausgewählt und genotypisiert. Die Verteilung dieser zehn untersuchten Marker auf dem Gen, sowie die regionale Haplotypstruktur ist in Abbildung 5 zu sehen.

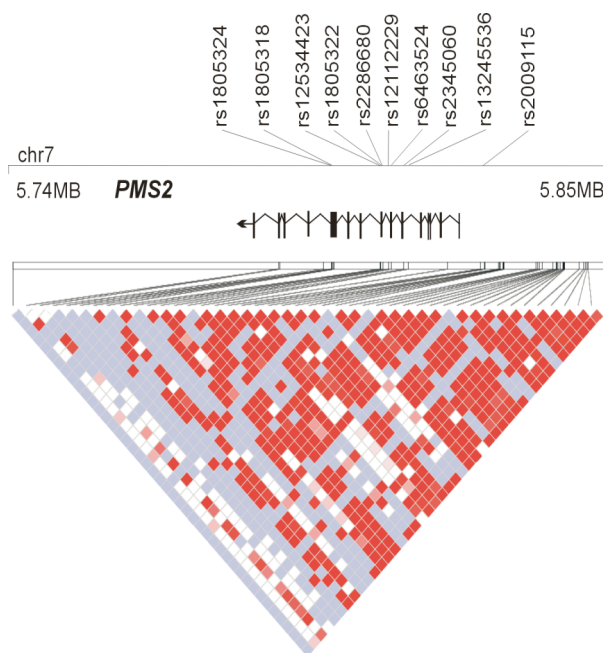


Abb. 5: Blockstruktur des Kandidatengens PMS2 aus HAPMAP für kaukasische Genotypen. Erzeugt mittels HAPLOVIEW

Die Einzelpunkt- und “sliding window haplotyp” Analysen sind in der untenstehenden Tabelle 4 aufgeführt.

Der auf dem Exon K277T gelegene SNP rs1805322 war nur monomorph vorhanden (vgl. 3.4.1). Wie auch beim Kandidatengen *MSH6* wurde hier keine Korrektur für Mehrfachtestung durchgeführt, um die Aussagekraft zu verbessern. Keiner der Marker zeigte in den Kontrollen eine signifikante Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Für alle Orte wurde eine “sliding-window-haplotyp” Analyse durchgeführt um zusätzliche potentiell krankheitsbedingende Varianten zu finden, die nicht zu der Gruppe der ausgewählten 10 SNP’s gehörten. Keine der Haplotypen Analysen wurden für Mehrfachtestung korrigiert und es wurden keine signifikanten Assoziationen gesehen ($p > 0.05$). Die Variante K227T und die ungleichen SNP’s I622M und S597T zeigten keinen Unterschied. Der auf dem Intron gelegene auffällige SNP rs12534423 zeigte einen genotypischen P-Wert von 0.039. Dieses Zeichen fand keine Unterstützung durch eine Assoziation zum Haplotypen oder benachbarten SNP’s. Der allelische p-Wert lag bei 0.054.

Gen – dbSNPId	Position	MAF case	MAF cont	ORRec [CI95%	ORdom [CI95%	P _{allelic}	P _{geno}	HAP2	HAP3	HAP4	HAP5
rs1805324	exon I622M	0.03	0.03	0.69 [0.04-11.05]	0.96 [0.09-23.16]	0.814	0.952	0.517	0.294	0.294	0.666
rs1805318	exon S597T	0.02	0.01	n/a*	1.47	0.197	0.194	0.132	0.132	0.358	0.526
rs12534423	intron	0.04	0.05	n/a*	0.70	0.054	0.039	0.056	0.150	0.299	0.233
rs1805322	exon K277T	0	0	n/a*	n/a*	n/a*	n/a*	0.770	0.565	0.550	0.815
rs2286680	intron	0.14	0.13	0.85 [0.41-1.73]	1.05 [0.59-2.45]	0.770	0.731	0.565	0.550	0.815	0.889
rs12112229	intron	0.24	0.24	0.93 [0.63-1.39]	1.03 [0.74-1.62]	0.914	0.795	0.515	0.945	0.894	0.862
rs6463524	exon syn S260S	0.18	0.18	1.06 [0.64-1.76]	0.99 [0.57-1.55]	0.999	0.953	0.663	0.799	0.749	#

Gen – dbSNPId	Position	MAF case	MAF cont	ORRec [CI95%	ORdom [CI95%	P _{allelic}	P _{geno}	HAP2	HAP3	HAP4	HAP5
rs2345060	intron	0.25	0.26	0.90 [0.61-1.32]	0.94 [0.75-1.59]	0.488	0.787	0.735	0.653	#	#
rs13245536	intron	0.13	0.13	0.84 [0.41-1.71]	1.07 [0.60-2.49]	0.716	0.670	0.562	#	#	#
rs2009115	5' flanking region	0.14	0.13	0.86 [0.42-1.75]	1.09 [0.59-2.44]	0.596	0.606	#	#	#	#

Tabelle 4: Ergebnisse der genetischen Assoziationsanalyse der auf dem untersuchten Gen PMS2 liegenden 10 SNP's. Die Spalte "dbSNPId" enthält den Namen des untersuchten SNP's. In der Spalte "Position" wird die Position des SNP's auf dem Gen angegeben. Die Häufigkeiten des Vorkommens – also die Allel-Frequenzen - in Fällen und Kontrollen ist unter "MAFcase" bzw. "MAFcont" angegeben. Die nur monomorph vorkommenden Marker sind in den Spalten "MAFcase" bzw. "MAFcont" mit einer "0" versehen. Sie konnten im untersuchten Kollektiv nicht gefunden werden. "ORdom" und "ORrec" beziehen sich auf die odds ratio, das Quoten- oder Chancenverhältniss, bei dominantem bzw. rezessivem Erbgang. Die Konfidenzintervalle der Odds Ratio (CI 95%) sind in Klammern angegeben, jedoch nicht bei seltenen Markern (Allelfrequenz < 1%) und nicht signifikanten Markern. P-Werte sind angegeben für das allelische "Pallelic", sowie das genotypische "Pgeno" Verhältniss. Die Spalten "HAP2" bis "HAP5" geben die p-Werte für das Verhältniss bei der sliding window haplotype Analyse unter Verwendung des Programmes COCAPHASE wieder. Die SNP Marker sind unabhängig der Transkriptorientierung in genomischer 5'-3' Richtung angegeben. Die P Werte der sliding window Haplotypanalyse sind an der Position des am weitesten in Richtung 5' gelegenen Markers des jeweiligen Haplotypen angegeben. Bei mit "*" gekennzeichneten Feldern erfolgte aufgrund zu geringer Allelfrequenz keine Berechnung der odds-ratio. Bei mit "#" gekennzeichneten Feldern ist der p-Wert für den ersten Marker im untersuchten haplotypen-Fenster angegeben.

4. DISKUSSION

In der vorliegenden Untersuchung wurden die Mismatch-Reparaturgene *MSH6* und *PMS2* auf ihre Assoziation zur Entstehung des sporadischen KRK hin untersucht.

Die Tatsache, dass Keimbahnmutationen u.a. in den MMR-Genen *MSH6* und *PMS2* als ursächliche Faktoren für syndromale KRK Erkrankungen identifiziert wurden, machten diese MMR-Gene zu attraktiven Kandidaten in der Untersuchung bezüglich des sporadischen KRK. Es konnte jedoch, obwohl die Power des Tests, eine odds ratio von größer als 1,54 zu erreichen, bei 80% oder höher lag, bei der untersuchten Population kein Beweis erbracht werden, dass diese beiden Vertreter der MMR-Gene in Beziehung zur Entstehung des sporadischen KRK stehen. Auch die nach den Einzelpunktanalysen durchgeführten Haplotypenanalysen lieferten keine signifikanten Werte. Die Ursache dieser fehlenden Signifikanz soll im folgenden Kapitel diskutiert werden.

4.1 Familiäre Häufung

Die Genetik der syndromalen KRK- Formen (HNPCC, FAP etc.) ist weitgehend geklärt. Es bestehen in diesen Fällen klar erkennbare mendelsche Erbgänge. Die Annahme, dass auch beim sporadischen KRK eine genetische Prädisposition bei der Krankheitsentwicklung eine Rolle spielt, ist durch mehrere anerkannte Studien innerhalb der letzten 15 Jahre geradezu belegt worden. Man muss wohl von einer genetischen Komponente ausgehen, wenn das persönliche Lebenszeitrisiko von normalerweise 2-5% auf bis zu 17% Risiko bei 1^o-iger Verwandtschaft mit zwei erkrankten Personen ansteigt und das eigene Risiko um das bis zu 6.15-fache erhöht ist, wenn ein Bruder bzw. eine Schwester unter 55 Jahren erkrankt ist. Die durchgeführten Studien bezogen sich nicht nur auf den Eltern-Kind Vergleich, sondern auch auf das Geschwisterrisiko, sowie Risiken in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht [Johns et al. 2002, Hemminki et al. 2004, Aarnio et al. 1995, Houlston et al. 1990, St John et al. 1993]. Allein die Ergebnisse dieser Studien rechtfertigten eine genauere molekulargenetische Untersuchung, wie die hier vorliegende, da Sie für eine genetische Prädisposition bei der Entstehung des sporadischen KRK sprechen.

4.2 Methoden

Wir haben versucht die zuvor berichteten Assoziationen der funktionellen SNP's zum KRK in mismatch-repair und base-excision Genen zu reproduzieren [Lipkin et al. 2004, Shin et al. 2005, Kim et al. 2004, Farrington et al. 2005]. Hierfür wurde ein dichter haplotype tagging Ansatz gewählt, um den Auszug der genetischen Information auf den betreffenden loci zu verbessern. Eine erhebliche Hilfe bei dieser Art der Kandidatengen-Studien war die enorme Fülle an Genotyp- und Markerinformationen, die das internationale HAPMAP Projekt zur Verfügung stellt [Altshuler et al. 2005]. Der tagging Ansatz ist in der Lage, Signale von bisher ungenannten regulatorischen oder funktionellen Elementen in einer genetischen Region zu entdecken [de Bakker et al. 2005, Ke et al. 2004, Hirschhorn et al. 2005]. Er bietet einem auf diese Weise außerdem mögliche Vorteile für die Entdeckung einer direkten Mutation in einer codierenden Region eines einzelnen Gens, weil die Prädisposition für eine Erkrankung möglicherweise auch von anderen Varianten verliehen wird, beispielsweise in „splice sites“ oder „intronic“ Verstärkern [Helms et al. 2003, Tokuhiko et al. 2003]. Die tagging SNP's wurden aus der öffentlich zugänglichen HAPMAP-SNP-Quelle ausgewählt. Die Genotyp- und Allelfrequenzen für die hier untersuchten SNP's unterschieden sich nicht von denen der kaukasischen HAPMAP Gruppe. Dieser Fakt unterstreicht die gute Auswahl der Varianten aus der HAPMAP-Quelle. Auch bei der Durchführung der weiteren Methodik, wie DNA-Extraktion und Genotypisierung der SNPs, wurde auf bereits etablierte Verfahren zurückgegriffen, die beispielsweise bei einer großen veröffentlichten Studie zum Gen *CARD15* zu signifikanten Ergebnissen geführt haben [Hampe et al. 2002]. Des Weiteren wurde einer möglichst hohen Aussagekraft der Studie Tribut gezollt, indem alle nominellen p-Werte für alle Tests berichtet wurden, inklusive der Haplotypen-Assoziation.

4.3 Ergebnisse und Fallzahl

In unserer Untersuchung überschritt keiner der single-point-allelic p-Werte den Grenzbereich von $p < 0,05$. Ein genotypischer Test lieferte einen p-Wert von 0,039. Da aber eine Bestätigung durch Haplotypen, als auch eine Korrektur für mehrmaliges Testen fehlte, halten wir diesen Wert nicht für einen Beweis für eine tatsächliche Erkrankungsassoziation. Die seltenen Varianten A878V und V396L waren nicht mit dem phänotypischen Auftreten des KRK assoziiert. Die ungleichen SNP's I622M und S597T zeigten keine Unterschiede in der

Häufigkeit ihres Vorkommens bei Fällen und Kontrollen. Der auf dem Intron gelegene auffällige SNP rs12534423 zeigte einen genotypischen P-Wert von 0.039. Der allelische p-Wert lag bei 0.054. Dieses Zeichen fand keine Unterstützung durch eine Assoziation zum Haplotypen oder benachbarten SNP's. Teilweise gelang uns die Reproduktion der vormals berichteten, für das sporadische KRK codierenden, SNP's nicht. Beispielsweise konnten die zuvor berichteten Mutationen A623P und V886I im Gen *MSH6* in der deutschen Bevölkerung nicht gefunden werden. Ebenso konnte die Variante K227T des Gens *PMS2* hier nicht gefunden werden.

Generell muss man sich die Frage stellen, ob unsere Kohorte stark genug aufgestellt war, ob die Anzahl von Fällen und Kontrollen groß genug war oder ob wir mit einer zu geringen Fallzahl unrepräsentative Ergebnisse erzielt haben. Für diese Studie wurden 1068 Fälle und 738 Kontrollen analysiert. Zieht man einen Vergleich zu Studien anderer Forschungsgruppen, die sich ähnlichen Thematiken widmeten, also im Bereich der humanen Molekulargenetik publizierten, so zeigt sich, dass Anhand von Kohorten unserer Größenordnung durchaus signifikante Ergebnisse in der jeweils untersuchten Population zu erzielen sind. Ein Team in Amerika hatte eine ähnlich große Kohorte aufgestellt (1144 Fälle), um diese auf die Variante D132H hin zu untersuchen [Shin et al. 2005], die Lipkin et al. im Jahr 2004 in israelischen Patienten gefunden hatte. Ein koreanisches Forscherteam konnte 2004 anhand von 625 Fällen und 527 Kontrollen eine Überexpression von R154H (auf Gen *OGGI*) bei Ihren Fällen nachweisen [Kim et al. 2004]. In Ihrer schottischen Kohorte (870 Patienten) fanden Forscher insgesamt 38 Mutationen auf den Genen *MLH1*, *MSH2* und *MSH6* [Barnetson et al. 2006]. Die Frage, ob unsere Fallzahl groß genug war, kann mit einem höchstwahrscheinlich beantwortet werden. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass wir eine Assoziation zwischen den untersuchten Kandidatengenen und der Erkrankung hätten feststellen können, hätten wir eine noch größere Kohorte aufgestellt.

4.4 Rekrutierung

Viele der polygenen Erkrankungen sind durch einen festen Zusammenhang zwischen dem Alter einer Person (x) und dem Beginn der Erkrankung bei einem Verwandten (y) charakterisiert. Dieser Zusammenhang ist beispielsweise beim Brustkrebs [Claus et al. 1990] und der Alzheimer-Demenz [Pankratz et al. 2005] ausreichend erforscht. So ist es plausibel,

dass der genetische Einfluss zum Erwerb einer solchen Erkrankung sich im Alter, in dem eine solche Erkrankung auftritt, widerspiegelt [Pankratz et al. 2005]. Daher wurden, um die Aussagekraft der Studie zu erhöhen, Patienten mit einem relativ frühen Krankheitsbeginn (median 59 Jahre – Altersspanne 18-74) in diese Untersuchung mit einbezogen, da für Patienten mit frühem Krankheitsbeginn eine familiäre Komponente der Erkrankung als wahrscheinlicher gilt [Johns et al. 2002]. Demzufolge handelt es sich bei den untersuchten Proben um die DNA einer Hochrisikogruppe, die in der vorliegenden Studie eine größere Aussagekraft bieten sollte, als Proben aus der allgemeinen Bevölkerung. Genau gegensätzlich aber ebenfalls mit dem Ziel, die Aussagekraft der Studie zu erhöhen, gingen wir bei der Auswahl der Kontrollgruppe vor. Die Kontrollgruppe wurde so gewählt, dass Sie, im Gegensatz zum exakten Alters- und Geschlechtsabgleich, ein etwas höheres durchschnittliches Alter aufwies, als es beim median der Patienten bei Krankheitsbeginn der Fall war. Kontroll-Personen, die an einem HNPCC erkrankt waren oder eine positive Familienanamnese dafür hatten, wurden kategorisch von der Studie ausgeschlossen.

Nicht minder wichtig ist bei populationsgenetischen Studien die Auswahl des Rekrutierungsgebietes. Nur gering verfälschte Stichproben lassen sich auf Bevölkerungsebene am besten dadurch gewinnen, dass eine geographisch begrenzte Rekrutierungsregion bestimmt wird, aus der alle zugänglichen Patienten in die Studie mit eingebunden werden. Damit diese Stichprobe repräsentativ ist, dürfen keine systematischen oder unkontrollierten Abwanderungen der Patienten aus der Rekrutierungsregion stattfinden [Krawczak et al. 2006]. Als Untersuchungsgebiet diente dem Forschungsprojekt das Popgen-Gebiet, welches nördlich durch die dänische Grenze, südlich durch den Nord-Ostsee-Kanal, und seitlich durch die Nord- und Ostsee begrenzt ist. Durch seine geographisch klar abgegrenzte Struktur und die relativ geringe Zu- und Abwanderung der Bevölkerung stellt dies ein ideales Gebiet zur medizinischen Genforschung dar. Um ein Confounding durch ethnische Unterschiede zu minimieren, wurden nur Personen in die Studie eingeschlossen, deren Eltern in Deutschland geboren wurden.

4.5 Variation in der Population

Nach Betrachtung unserer Ergebnisse und dem direkten Vergleich zu ähnlichen in anderen Ländern durchgeführten Studien liegt der Gedanke nahe, dass die weiter oben erwähnte nicht mögliche Reproduzierbarkeit bestimmter Mutationen bzw. SNP's in der deutschen Population möglicherweise nicht an einer zu geringen untersuchten Fallzahl, sondern vielmehr in der Verschiedenartigkeit der untersuchten Populationen (Deutsche im Gegensatz zu Koreanern, Schotten und Israelis) liegt. Das augenfälligste Indiz für derartige Unterschiede ist die Abwesenheit einer Variation in der untersuchten Population. Beispielsweise ist die *MLH1* Variante D132H, die ursprünglich in israelischen Patienten entdeckt wurde [Lipkin et al. 2004], in der deutschen Bevölkerung nicht vorhanden. Shin et al. bestätigen dies, da Sie diese Variation bei amerikanischen Kaukasiern ebenfalls nicht nachvollziehen konnten [Shin et al. 2005]. Ebenso wurde die Variante R154H im Gen *OGGI* [Kim et al. 2004] – damals für Koreaner berichtet – in der hier untersuchten deutschen Bevölkerungsprobe nicht gefunden. Die Variationen im Gen *MUTYH* wurde in gleicher Frequenz gesehen, wie Sie bereits in einer schottischen Studie gesehen wurde [Farrington et al. 2005]. Indes konnte aber keine signifikante Verbindung zur Erkrankung entdeckt werden. Dies mag auf eine Risiko-heterogenität zwischen Schotten und Zentral-Europäern zurückzuführen sein, wie Sie bereits für die relativ seltenen Variationen im für die Crohn-Erkrankung verantwortlichen *CARD15* Gen beobachtet wurde [Arnott et al. 2004]. Hier mag die Aussagekraft strittig sein, denn das untersuchte Patientengut, besonders in Bezug auf jüngere Patienten, war bei der Studie von Farrington et al. größer als bei der hier berichteten Studie.

4.6 Resumee und Ausblick

Die bisher identifizierten Risikofaktoren der DNA Reparaturgene scheinen seltene Varianten zu sein, die Ihren Effekt auf populationsspezifischem Wege zu Tage bringen. Da ihre Assoziation zum KRK in den deutschen Stichproben nicht reproduzierbar war, ist ihr Mitwirken als wichtiger Risikofaktor bei der Entstehung des KRK fraglich. Der Beleg einer genetischen Komponente beim sporadischen Kolonkarzinoms bleibt davon jedoch unberührt bestehen.

Es bleibt eine Herausforderung für größer angelegte, systematische Untersuchungen, diejenigen gemeinsamen Varianten zu identifizieren, die populationsübergreifend als Risikofaktoren für das KRK vorkommen. Für diese Szenarien wird der hier genutzte haplotyp tagging Ansatz besonders nützlich sein und möglicherweise bei diesbezüglichen Entdeckungen in der Zukunft helfen.

Eine neue aber zugleich kostenintensive Art der Suche nach Varianten im menschlichen Genom ist durch spezielle Chips (500K – 1000K) möglich geworden, die beispielsweise von der Firma „Affymetrix“ angeboten werden. Sie ermöglichen eine genomweite Suche und konnten in aktuellen Studien bereits signifikante Ergebnisse erbringen. So konnten unlängst durch diese genomweite Suche mehrere vorher unbekannte Risiko-Varianten für das KRK auf den Genen 10p14 und 8q23.3, sowie auf den Genen 8q24 und 18q21 gefunden werden [Tomlinson et al. 2008, Tenesa et al. 2008]. Die Tatsache, dass bestimmte Allele auf dem Gen *SMAD7* (18q21.1) für ein erhöhtes KRK Risiko codieren wurde bereits 2007 in einer Studie veröffentlicht, die sich ebenfalls der genomweiten Suche bediente [Broderick et al. 2007]. Es ist in der Tat wahrscheinlich, dass, nicht zuletzt aufgrund des technischen Fortschritts, eine genomweite Suche nach auffälligen Faktoren für das KRK schneller zu Ergebnissen führen kann, bzw. wie bei Tomlinson et al. führen konnte. In jedem Falle war es uns möglich eine sowohl qualitativ als auch quantitativ hochwertige Kohorte aufzustellen, die im Idealfalle auch für zukünftige Studien herangezogen werden könnte.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Mit etwa 75.000 Neuerkrankungen in Deutschland pro Jahr ist das kolorektale Karzinom (KRK) das zweithäufigste Karzinom in Deutschland. Das KRK kommt sowohl in erblicher Form als auch sporadisch vor. Etwa 65-85% der KRK entstehen „spontan“ (sporadisch), 10-30% der KRK haben eine familiäre Komponente mit nicht klar erkennbarem Erbgang. Etwa 5% der entstandenen KRK fußen auf den syndromalen Erkrankungen Hereditary NonPolyposis Colorectal Cancer (HNPCC), der familiären adenomatösen Polyposis (FAP) und einigen sehr seltenen KRK-Syndromen. Das Lebenszeitrisiko für das KRK beträgt in der Normalbevölkerung etwa 2-5%.

Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass es auch außerhalb der bekannten syndromalen Erkrankungen einen familiären Zusammenhang beim KRK zu geben scheint. Seit Jahren beforschen internationale Teams Kandidatengene, also Gene, die aufgrund Ihrer biologischen Funktion möglicherweise zur Ätiologie einer bestimmten Krankheit beitragen, die bei der Entstehung des KRK eine ursächliche Rolle spielen könnten.

Systematisch durchgeführte genetische Untersuchungen des HNPCC haben bestimmte DNA-Mismatch repair – Gene (MMR) als wegweisend für die Entstehung des KRK, bei einem Teil der syndromalen Erkrankungen, ausmachen können. So sind Keimbahnmutationen in den DNA-MMR-Genen *MSH2*, *MLH1*, *PMS1*, *PMS2* und *MSH6* für die Entstehung des HNPCC verantwortlich. Da die Ursächlichkeit des MMR-Mechanismus in der Entstehung des KRK gut erforscht ist, waren diese Gene attraktive Kandidaten auch für die Untersuchung des sporadischen KRK. Ziel des Projekts war die Aufklärung genetischer Risikofaktoren für das sporadische Kolonkarzinom anhand der für den DNA-Reparaturmechanismus zuständigen Gene *PMS2* und *MSH6*, welche für die Entstehung des sporadischen KRK als auffällige Faktoren gelten.

Diese genetische Studie erfolgte primär als Fall-/ Kontrollstudie, wobei die Häufigkeit von Polymorphismen in Patienten und Kontrollen verglichen wurden, und die verantwortlichen genetischen Varianten durch systematische Kartierung mittels Kopplungsgleichgewicht identifiziert wurden. Zu diesem Zweck wurden 1068 Patienten mit operiertem KRK

(Altersmedian bei Krankheitsbeginn: 59 Jahre) mit 738 gesunden Kontrollen gleicher Geschlechtsverteilung (Altermedian: 67 Jahre) verglichen.

Alle Patienten waren deutscher Herkunft und volljährig. Haplotyp-charakteristische SNP's, sowie alle in der Literatur zuvor erwähnten Risikovarianten und kodierende SNP's mit einer in der Population vorkommenden Häufigkeit von $>0,005$ wurden für die Gene *PMS2* und *MSH6* genotypisiert.

Es konnte kein Zusammenhang zwischen den untersuchten Genen und dem Auftreten eines sporadischen KRK gefunden werden. Die bisher von anderen Forscherteams gefundenen Risikofaktoren in den DNA-MMR-Genen scheinen möglicherweise eine populationspezifische Expression aufzuweisen. Ihre Rolle als Risikofaktor für das KRK konnte in der deutschen Bevölkerung nicht reproduziert werden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Aarnio M, Mecklin JP, Aaltonen LA, Nystrom-Lahti M, Jarvinen HJ: Lifetime risk of different cancer in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) syndrome. *Int J Cancer* 1995; 64: 430-433.

Akiyama Y, Sato H, Yamada T, Nagasaki H, Tsuchiya A, Abe R, et al.: Germ-line mutation of the hMSH6/GTBP gene in an atypical hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindred. *Cancer Res* 1997;57(18):3920

Altshuler D, Brooks LD, Chakravarti A, Collins FS, Daly MJ, Donnelly P: A haplotype map of the human genome. *Nature* 2005;437(7063):1299-320

Andrieu N, Launoy G, Guillois R, Ory-Paoletti C, Gignoux M: Familial relative risk of colorectal cancer: a population-based study. *Eur J Cancer* 2003;39(13):1904-11

Arnott ID, Nimmo ER, Drummond HE, Fennell J, Smith BR, Mac Kinlay E, et al.: NOD2/CARD15, TLR4 and CD14 mutations in Scottish and Irish Crohn's disease patients: evidence for genetic heterogeneity within Europe? *Genes Immun* 2004;5(5):417-25

Barnetson RA, Tenesa A, Farrington SM, Nicholl ID, Cetnarskyj R, Porteous ME, et al.: Identification and Survival of Carriers of Mutations in DNA Mismatch-Repair Genes in Colon Cancer *N Engl J Med* 2006 354: 2751-2763

Berends MJ, Wu Y, Sijmons RH, Mensink RG, van der Sluis T, Hordijk-Hos JM, et al.: Molecular and clinical characteristics of MSH6 variants: an analysis of 25 index carriers of a germline variant. *Am J Hum Genet.* 2002; 70: 26-37

Böddeker I, Ziegler A: Assoziations- und Kopplungsstudien zur Analyse von Kandidatengenem; *Deutsch Med Wochenschr* 2000; 125: 810-815

Bradley BA, Evers BM: Molekular Advances in the etiology and treatment of colorectal cancer. *Surg Oncol.* 1997; 6: 143-156

Broderick P, Carvajal-Carmona L, Pittmann AM, Webb E, Howarth K, Rowan A, et al.: A genome-wide association study shows that common alleles of SMAD7 influence colorectal cancer risk. *Nat Genet.* 2007 Nov;39(11):1315-7

Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe MK, et al.: Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* 1994;368(6468):258-61

Burt RW, Petersen GM.: Familial CRC: diagnosis and management. In: Young GP, Rosen P, Levin E, eds. *Prevention and early detection of CRC.* London: W B Saunders, 1996:171

Cichon S, Freudenberg J, Propping P, Nöthen MM: Variabilität im menschlichen Genom. Bedeutung für die Krankheitsforschung. *Dtsch Arztebl* 2002; 99: A 3091-3101 [Heft 46]

Claus EB, Risch NJ, Thompson WD: Age of onset as an indicator of familial risk of breast cancer. *Am J Epidemiol* 1990;131(6):961-72

Collins FS, Brooks LD, Chakravarti A: A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome Res* 1998; 8: 1229–1231

Collins FS, Patrinos A, Jordan E, Chakravarti A, Gesteland R, Walters L: New goals for the U.S. Human Genome Project: 1998–2003. *Science* 1998; 282: 682–689

De Rosa M, Fasano C, Panariello L, Scarano M, Belli G, Iannelli A, et al.: Evidence for a recessive inheritance of Turcot's syndrome caused by compound heterozygous mutations within the PMS2 gene; *Nature* 2000 Mar 28, Vol.19, 13, 1719-1723

de Bakker PI, Yelensky R, Peér I, Gabriel SB, Daly MJ, Altshuler D: Efficiency and power in genetic association studies. *Nat Genet* 2005

Dupont WD, Plummer WD: PS power and sample size program available for free on the Internet. *Controlled Clin Trials* 1997;18:274

Farrington SM, Tenesa A, Barnetson R, Wiltshire A, Prendergast J, Porteous M, et al.: Germline Susceptibility to Colorectal Cancer Due to Base-Excision Repair Gene Defects. *Am J Hum Genet* 2005;77:112–19

Fearon ER, Vogelstein B: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990 Jun 1;61(5):759-67

Genetic Home reference; <http://ghr.nlm.nih.gov/gene=msh6>

Genetic Home reference; <http://ghr.nlm.nih.gov/gene=pms2>

Geschäftsstelle des Wissenschaftlichen Koordinierungskomitees des Deutschen Humangenomprojekts, ed. *Das Humangenomprojekt*. Berlin: <http://www.dhgp.de/german/publications/hgp/index.html>, 1998

Hamilton SR, Liu B, Parsons RE, Papadopoulos N, Jen J, Powell SM, et al.: The molecular basis of Turcot's syndrome. *N Engl J Med*. 1995 Mar 30;332(13):839-47.

Hampe J, Grebe J, Nikolaus S, Solberg C, Croucher PJ, Mascheretti S, et al.: Association of NOD2 (CARD 15) genotype with clinical course of Crohn's disease: a cohort study. *Lancet*. 2002 May 11;359(9318):1661-5.

Helms C, Cao L, Krueger JG, Wijsman EM, Chamian F, Gordon D, et al.: A putative RUNX1 binding site variant between SLC9A3R1 and NAT9 is associated with susceptibility to psoriasis. *Nat Genet* 2003;35 (4):349-56

Hemminki K, Chen B: Familial risk for colorectal cancers are mainly due to heritable causes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13(7):1253-6

Hendriks YM, Jagmohan-Changur S, van der Klift HM, Morreau H, van Puijenbroek M, Tops C, et al.: Heterozygous mutations in PMS2 cause hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (Lynch syndrome). *Gastroenterology* 2006 Feb;130(2):312-22.

Hirschhorn JN, Daly MJ: Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nat Rev Genet* 2005;6(2):95-108

Houlston RS, Murday V, Harocopos C, Williams CB, Slack J: Screening and genetic counseling for relatives of patients with colorectal cancer in a family cancer clinic. *Br Med J* 1990; 301: 366-368.

Jakobasch G, Jakobasch K-H: Molekulare Ursachen kolorektaler Kanzerogenese, klinische Manifestation und Therapie. *Z Ärztl Fortbild Qualitätssich.* 1997; 91: 125-133

Jeffreys AJ, Kauppi L, Neumann R: Intensely punctate meiotic recombination in the class II region of the major histocompatibility complex. *Nat Genet* 2001; 29: 217–222

Johns LE, Kee F, Collins BJ, Patterson CC, Houlston RS: Colorectal cancer mortality in first-degree relatives of early-onset colorectal cancer cases. *Dis Colon Rectum* 2002;45(5):681-6

Ke X, Durrant C, Morris AP, Hunt S, Bentley DR, Deloukas P, et al.: Efficiency and consistency of haplotype tagging of dense SNP maps in multiple samples. *Hum Mol Genet* 2004;13(21):2557-65

Kim IJ, Ku JL, Kang HC, Park JH, Yoon KA, Shin Y, et al.: Mutational analysis of OGG1, MYH, MTH1 in FAP, HNPCC and sporadic colorectal cancer patients: R154H OGG1 polymorphism is associated with sporadic colorectal cancer patients. *Hum Genet* 2004;115(6):498-503

Krawczak M, Nikolaus S, von Eberstein H, Croucher PJ, El Mokhtari NE, Schreiber S: PopGen: population-based recruitment of patients and controls for the analysis of complex genotype-phenotype relationships. *Community Genet.* 2006;9(1):55-61. Review.

Kruglyak L: Prospects for whole-genome linkage disequilibrium mapping of common disease genes. *Nat Genet* 1999; 22: 139–144

Layer P, Schmiegel W, Adler G, Fölsch U, Pox C, Sauerbruch T: Kolorektales Karzinom: Prävention und Früherkennung in der asymptomatischen Bevölkerung – Vorsorge bei Risikogruppen; *Dtsch Arztebl* 2000; 97(34-35): A-2234 / B-1930 / C-1697

Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Jen J, Parsons R, et al.: Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 1993;75(6):1215-25

Lebruna C, Olschwangb S, Jeanninaa S, Vandenbosa F, Sobolb H, Frenay M: Turcot syndrome confirmed with molecular analysis; *Europ J of Neurol* 2007 Apr, Vol.14 (4) , 470–472

Lipkin SM, Rozek LS, Rennert G, Yang W, Chen PC, Hacia J, et al.: The MLH1 D132H variant is associated with susceptibility to sporadic colorectal cancer. *Nat Genet* 2004;36(7):694-9

Michor F, Iwasa Y, Rajagopalan H, Lengauer C, Nowak MA. Linear model of colon cancer initiation. *Cell Cycle*. 2004 Mar;3(3):358-62. Epub 2004 Mar 1.

Miyaki M, Konishi M, Tanaka K, Kikuchi-Yanoshita R, Muraoka M, Yasuno M, et al.: Germline mutation of MSH6 as the cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet* 1997;17(3):271-2

Nature 437, A haplotype map of the human genome 1299-1320. 2005

Nature 449, A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs 851-861. 2007

Pankratz N, Byder L, Halter C, Rudolph A, Shults CW, Conneally PM, et al.: Presence of an APOE4 allele results in significantly earlier onset of Parkinson's disease and a higher risk with dementia. *Mov Disord* 2005

Pankratz VS, de Andrade M, Therneau TM: Random-effects Cox proportional hazards model: general variance components methods for time-to-event data. *Genet Epidemiol* 2005;28(2):97-109

Papadopoulos N, Nicolaidis NC, Wei YF, Ruben SM, Carter KC, Rosen CA, et al.: Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science* 1994;263(5153):1625-9

Parkin DM, Pisani P, Ferlay J: Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 1999;49:33-64

Peltomäki P: Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol*. 2003; 21: 1174-9.

Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, et al.: APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 1992 Sep 17;359(6392):235-7.

Reich DE, Cargill M, Bolk S, Ireland J, Sabeti PC, Richter DJ, et al.: Linkage disequilibrium in the human genome. *Nature* 2001; 411: 199-204

Reich DE, Schaffner SF, Daly MJ, McVean G, Mullikin JC, Higgins JM, et al.: Human genome sequence variation and the influence of gene history, mutation and recombination. *Nat Genet* 2002; 32: 135-142

Robert-Koch-Institut Krebs in Deutschland, Häufigkeiten und Trends 2006; <http://www.rki.de>

Shin BY, Chen H, Rozek LS, Paxton L, Peel DJ, Anton-Culver H, et al.: Low allele frequency of MLH1 D132H in American colorectal and endometrial cancer patients. *Dis Colon Rectum* 2005;48(9):1723-7

St John DJ, McDermott FT, Hopper JL, Debney EA, Johnson WR, Hughes ES: Cancer risk in relatives of patients with common colorectal cancer. *Ann Intern Med* 118:785-790, 1993

Tenesa A, Farrington SM, Prendergast J GD, Porteous ME, Walker M, Haq Naila, et al.: A genome-wide association study identifies colorectal cancer susceptibility loci on chromosomes 10p14 and 8q23.3. *Nat Genet.* 2008 May;40(5):623-30

Tokuhiro S, Yamada R, Chang X, Suzuki A, Kochi Y, Sawada T, et al.: An intronic SNP in an RUNX1 binding site of SLC22A4, encoding an organic cation transporter, is associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 2003;35(4):341-8

Tomlinson IP, Webb E, Carvajal-Carmona L, Broderick P, Howarth K, Pittmann AM, et al.: A genome-wide association study identifies colorectal cancer susceptibility loci on chromosomes 10p14 and 8q23.3. *Nat Genet.* 2008 May;40(5):623-30

Tomlinson IP, Ilyas M, Johnson V, Davies A, Clark G, Talbot I, et al.: A Comparison of the Genetic Pathways Involved in the Pathogenesis of Three Types of Colorectal Cancer. *J Pathol.* 1988; 184: 148-152

Tomlinson IP, Houlston RS: Peutz-Jeghers-syndrom. *J Med Genet.* 1997 Dec;34(12):1007-11

Tumorzentrum München: Gastrointestinale Tumoren. Tumormanual 2001

Tumorzentrum München: Manual Gastrointestinale Tumoren 2006 M.Gross

Vogel W: Genetische Epidemiologie oder zur Spezifität von Subdisziplinen der Humangenetik. *Med Genet* 2000; 12: 395–399

Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al.: Genetic alterations during colorectal tumor development. *N Engl J Med.* 1988 ;319: 525-32

Winawer SJ, Fletcher RH, Miller L, Godlee F, Stolar MH, Mulrow CD, et al.: Colorectal cancer screening – clinical guidelines and rationale, *Gastroenterology* 1997.112(2), 594-642

Woltmann A, Schiedeck T, Bruch HP: Chirurgie, hg. von Bruch HP et al, München: Urban&Fischer Verlag, 4. Auflage, 2000

www.hapmag.org

Ziegler A: Genetische Epidemiologie – Gegenwart und Zukunft, *Dtsch Arztebl* 2002; 99(36): A-2342 / B-1996 / C-1878

7. ANHANG

7.1 Einwilligungserklärung

**UK
SH**

«first_name» «last_name»
«street»

«postal_code» «city»



**UNIVERSITÄTSKLINIKUM
Schleswig-Holstein**

→ **Campus Kiel**
1. Medizinische Klinik
Forschungsprojekt **popgen**
Schiffenhelmstr. 12
24105 Kiel

POPGEN- STUDIE: GENETISCHE URSACHEN DES DICKDARMKREBSSES

EINWILLIGUNGSERKLÄRUNG

- Ich willige in die Entnahme von 30 ml Blut und die Speicherung der in diesem Zusammenhang gewonnenen Daten ein. Das Eigentum an diesem Material geht damit an das Universitätsklinikum Schleswig-Holstein über.

Ich hatte ausreichend Zeit und Gelegenheit zur Entscheidung. Mir ist bekannt, dass durch eine Nicht-Teilnahme keinerlei Nachteile für mich entstehen können.

- Ich erteile die Genehmigung zur Einsicht in vorhandene Patientenunterlagen «clinic» bei durch den/die verantwortliche Studienarzt/-ärztin.
- Ich erteile die Genehmigung zur Anforderung einer Tumorprobe für zusätzliche histologische Untersuchungen.

Ich weiß, dass ich meine Zustimmung jederzeit widerrufen kann, ohne dass mir daraus Nachteile entstehen.

Eventuelle zusätzliche Fragen sind mir ausreichend beantwortet worden, denn ich hatte die Gelegenheit, mit einem/r Arzt/Ärztin alle wichtigen Fragen zu diskutieren.

....., den 2007

Unterschrift:

7.2 Merkblatt zur Einwilligungserklärung

Merkblatt zur Einwilligungserklärung

Wir führen an der Klinik für Allgemeine Innere Medizin des Universitätsklinikums Schleswig- Holstein in Kiel das Forschungsvorhaben **popgen** zur genetischen Veranlagung von weit verbreiteten Krankheiten durch. Untersucht werden dabei *chronisch entzündliche Darmerkrankungen, Reizdarm, Darmkrebs, Gallensteine, Erkrankungen der Herzkranzgefäße (KHK), entzündliche Erkrankungen des Zahnfleisches und des Zahnhalteapparates und einige neurologische Erkrankungen wie Krampfleiden und Morbus Parkinson (Schüttellähmung)*. Um unsere Forschungserkenntnisse überprüfen zu können, bitten wir Sie um die Einwilligung, Ihnen

30 ml peripher venöses Blut

entnehmen zu dürfen und die daran gewonnen genetischen Daten ebenso wie Ihre zusätzlichen Angaben auf dem beiliegenden Fragebogen ausschließlich zu den oben genannten Forschungszwecken zu speichern. Wir beabsichtigen, aus Ihrem Blut DNA (Erbsubstanz) zu gewinnen, um die genetische Veranlagung zu einer der oben genannten Erkrankungen zu überprüfen. Die dafür verantwortlichen Gene können sich überall im gesamten Erbgut befinden. Es werden jedoch nur die jeweils als relevant bekannten Gene untersucht.

Risiken der Blutentnahme:

Wie zu einer Routineblutentnahme werden Ihnen unter sterilen Bedingungen 30 ml Blut aus einer peripheren Vene entnommen. Dazu ist die Punktion einer Vene notwendig. Die Risiken einer Blutentnahme sind: Lokale Infektion ("bakterielle Entzündung, Vereiterung"), Fehlpunktion der Vene und anschließende Ausbildung eines Blutergusses (Hämatom), sehr selten Fehlpunktion einer Schlagader, Schädigung eines Hautnervs mit der möglichen Folge dauerhafter Schmerzen und/oder bleibenden Funktionseinschränkungen). Alle oben genannten Risiken sind bei sachgemäßer Durchführung **extrem** selten.

Speicherung von Daten:

Ihre persönlichen Daten (Name, Vorname, Adresse, Geburtsdatum) werden getrennt von den Probanden gespeichert. Die Proben werden durch eine fortlaufende Strichkodierung pseudonymisiert. Die mit der Probe verbundenen Informationen (d.h. Angaben aus dem Fragebogen, Genotypen) sind nur über diese Kodierung abrufbar. Zur Qualitätskontrolle unserer Daten bitten wir Sie um die Genehmigung, vorhandene Patientenunterlagen einsehen zu dürfen. Für diese spezielle Situation entbinden Sie den behandelnden Arzt von der Schweigepflicht gegenüber verantwortlichen ärztlichen Mitarbeitern des Forschungsvorhabens.

Auf die Daten haben nur autorisierte Mitarbeiter des Forschungsprojektes Zugriff. Da das Projekt unter ärztlicher Leitung steht, unterliegen alle Mitarbeiter der ärztlichen Schweigepflicht. Eine Weitergabe Ihrer Daten an unberechtigte Dritte (insbesondere Arbeitgeber, Versicherungen) ist ausgeschlossen. Die Weitergabe von Proben und Informationen an wissenschaftliche Kooperationspartner erfolgt ohne Angaben zu Ihrer Person. Bei Beendigung der Forschungsaktivitäten (frühestens nach 20 Jahren) werden die Proben und die dazu gehörenden Daten vernichtet. Das Konzept zur Sammlung und Speicherung aller Daten wurde vom Unabhängigen Landeszentrum für Datenschutz und der Ethikkommission der Universitätsklinikums Schleswig- Holstein geprüft.

Die Herausgabe einzelner persönlicher Untersuchungsergebnisse ist aus forschungsmethodischen Gründen nicht möglich. Durch diese Untersuchungen wird eine Vielzahl von genetischen Merkmalen getestet werden. Es ist der Zweck der Untersuchung, eine Risikoabschätzung für bestimmte genetische Erkrankungen in der „Durchschnittsbevölkerung“ zu erstellen. Dieses schließt eine persönliche Risikobewertung nicht ein. Es ist daher nicht zu erwarten, dass sich durch die Untersuchungen persönlichkeitsrelevante Erkenntnisse ergeben. Auf Ihren Wunsch informieren wir Sie gerne über den allgemeinen Fortgang des Forschungsprojektes. In diesem Fall würden wir Ihren Namen, Ihren Vornamen und Ihre Adresse gemäß den datenschutzrechtlichen Bestimmungen des Landes Schleswig Holstein in einer gesonderten Adressdatei speichern, um Ihnen einen Projektbericht zusenden zu können.

Patentrechte

Es kann sein, dass im Rahmen zukünftiger Forschungsergebnisse Patente entstehen, die auf Erkenntnissen basieren, die aus Ihren Proben gewonnen wurden. Solche Patente sind die Voraussetzung für die Entwicklung neuer Medikamente. In diesem Fall besteht kein individueller Patentanspruch, basierend auf Ihrem individuellen biologischen oder genetischen Material.

Widerruf

Die Teilnahme an diesen wissenschaftlichen Untersuchungen ist absolut freiwillig. Solange Ihre persönlichen Daten nicht gelöscht sind, kann Ihre Zustimmung jederzeit widerrufen werden. Daraus entstehen Ihnen keinerlei Nachteile. Gegebenenfalls bereits entnommene Proben werden dann unverzüglich vernichtet, und Ihre Daten werden umgehend gelöscht. Einen etwaigen Widerruf Ihrer Zustimmung richten Sie bitte schriftlich an die Projektleitung **popgen**, 1. Medizinische Klinik, Universitätsklinikum Schleswig- Holstein, Campus Kiel, Schittenhelmstr. 12, D- 24105 Kiel.

Weitere Fragen

Wünschen Sie ein weitergehendes, ausführliches Arztgespräch, so vereinbaren Sie bitte einen Termin unter 0431/597-3710.

Verantwortliche ärztliche Leitung
PD Dr. med. Susanna Nikolaus

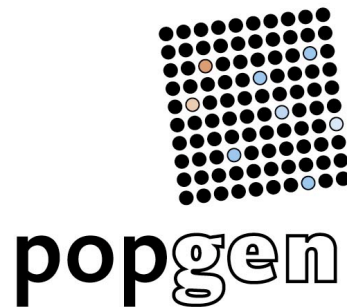
Studienarzt
PD Dr. med. Jochen Hampe

Projektleitung
Dipl. soz. Huberta von Eberstein

7.3 Fragebogen

Fragebogen zur Schleswig- Holsteinischen Studie „Gesundheit für Generationen“

Genetische Ursachen des Dickdarmkrebses



GEFÖRDERT VOM

Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

Herzlich willkommen! Wir freuen uns darüber, dass Sie an unserer Studie teilnehmen. Die Antworten zu folgenden Fragen werden von uns ohne Ihre persönlichen Daten ausgewertet. Zu Beginn haben wir einige allgemeine Fragen zu Ihrer Person und Ihrer Herkunft, bzw. der Herkunft Ihrer Eltern.

1)	Heutiges Datum	<input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	
		Tag	Monat	Jahr	
2)	Geschlecht	<input type="checkbox"/> männlich <input type="checkbox"/> weiblich			
3)	Geburtsdatum	<input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	
		Tag	Monat	Jahr	
4)	Körpergröße (cm):	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>			
	Gewicht (kg):	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>			
5)	Sind Sie in Deutschland geboren?	<input type="checkbox"/>	ja	<input type="checkbox"/>	nein
	Sind Sie in Schleswig-Holstein nördlich des Nord-Ostsee-				
	Kanals geboren?	<input type="checkbox"/>	ja	<input type="checkbox"/>	nein
	Sind Sie in Kiel geboren?	<input type="checkbox"/>	ja	<input type="checkbox"/>	nein
	Wenn nicht in Deutschland, in welchem Land sind Sie dann geboren?	Land: _____			
6)	Ist Ihr Vater in Deutschland geboren?	<input type="checkbox"/>	ja	<input type="checkbox"/>	nein
	Ist Ihr Vater in Schleswig-Holstein nördlich des Nord-				
	Ostsee-Kanals geboren?	<input type="checkbox"/>	ja	<input type="checkbox"/>	nein
	Ist Ihr Vater in Kiel geboren?	<input type="checkbox"/>	ja	<input type="checkbox"/>	nein
	Wenn nicht in Deutschland, in welchem Land ist Ihr Vater dann geboren?	Land: _____			
7)	Ist Ihre Mutter in Deutschland geboren?	<input type="checkbox"/>	ja	<input type="checkbox"/>	nein
	Ist Ihre Mutter in Schleswig-Holstein nördlich des Nord-				
	Ostsee-Kanals geboren?	<input type="checkbox"/>	ja	<input type="checkbox"/>	nein
	Ist Ihre Mutter in Kiel geboren?	<input type="checkbox"/>	ja	<input type="checkbox"/>	nein
	Wenn nicht in Deutschland, in welchem Land ist Ihre Mutter dann geboren?	Land: _____			

8) Haben Sie Kinder?

nein

ja

Wenn ja, wie viele?

Anzahl:

9) Haben Sie Geschwister?

nein

ja

Wenn ja, wie viele?

Anzahl:

10) Hat Ihr Vater Geschwister?

nein

ja

Wenn ja, wie viele?

Anzahl:

11) Hat Ihre Mutter Geschwister?

nein

ja

Wenn ja, wie viele?

Anzahl:

12) Wie schätzen Sie Ihre gegenwärtige körperliche Verfassung ein?

sehr gut

gut

weniger gut

schlecht

13) Falls Sie gesundheitliche Beschwerden haben, welche sind das?

14) Haben oder hatten Sie jemals in Ihrem Leben eine andere schwere Erkrankung als Dickdarmkrebs?

- nein
- ja

Wenn ja, welche?

Im Folgenden werden Sie zum Dickdarmkrebs befragt:

15) Wann wurde bei Ihnen der Dickdarmkrebs festgestellt?

Jahr: oder damaliges Alter:

16) Wo trat die Krebserkrankung auf?

- Enddarm (Rektum)
- übriger Dickdarm

Wissen Sie es noch genauer?

- rechter Dickdarm
- Querkolon
- linker Dickdarm

17) Wurden Sie operiert?

- nein
- ja

Jahr: oder damaliges Alter:

Falls Sie die Genehmigung zur Untersuchung des Tumorgewebes erteilen (siehe Einwilligungserklärung), bitten wir Sie hier Namen und Ort des Krankenhauses, in dem der Eingriff vorgenommen wurde, anzugeben.

Name und Ort des Krankenhauses, in dem der Eingriff vorgenommen wurde:

.....

18) Hat / hatte der Tumor bereits gestreut (Metastasen gesetzt)?
<input type="checkbox"/> nein
<input type="checkbox"/> ja: Leber
<input type="checkbox"/> ja: im Bauch
<input type="checkbox"/> ja: andere Organe
19) Haben / hatten Sie neben dem Dickdarmkrebs noch andere Krebserkrankungen?
<input type="checkbox"/> nein
<input type="checkbox"/> ja
Wenn ja, um welche handelt es sich?
<input type="checkbox"/> Brustkrebs
<input type="checkbox"/> Blasenkrebs
<input type="checkbox"/> Dünndarmkrebs
<input type="checkbox"/> Eierstockkrebs
<input type="checkbox"/> Gebärmutterkrebs
<input type="checkbox"/> Leberkrebs
<input type="checkbox"/> Magenkrebs
<input type="checkbox"/> Sonstige, welche: _____

Die erbliche Veranlagung für Krebserkrankungen ist für uns besonders wichtig. Deshalb befragen wir Sie im folgenden zu Krebserkrankungen, die in Ihrer Familie auftraten.

20) Wissen Sie von Blutsverwandten, die Krebserkrankungen haben / hatten?
<input type="checkbox"/> nein
<input type="checkbox"/> ja

Beachten Sie bitte besonders die folgende Tabelle.

Bei bestimmten Erkrankungen tritt gehäuft Darmkrebs auf, deshalb möchten wir Sie fragen:

22) Leiden Sie an Morbus Crohn? <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> ja Wenn ja, wann wurde die Krankheit diagnostiziert? Jahr: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> oder damaliges Alter: <input type="text"/> <input type="text"/>
23) Leiden Sie an Colitis ulcerosa? <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> ja Wenn ja, wann wurde die Krankheit diagnostiziert? Jahr: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> oder damaliges Alter: <input type="text"/> <input type="text"/>
24) Leiden Sie an einer anderen entzündlichen Darmerkrankung? <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> ja Wenn ja, an welcher? <hr/> Wann wurde die Krankheit diagnostiziert? Jahr: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> oder damaliges Alter: <input type="text"/> <input type="text"/>

Die nächsten Fragen beschäftigen sich mit Genussmitteln:

25) Wieviel Alkohol trinken Sie ungefähr pro Tag? <input type="checkbox"/> keinen <input type="checkbox"/> weniger als eine Flasche Bier (1-2 Glas Wein oder Schnaps) <input type="checkbox"/> etwa eine Flasche Bier (1-2 Glas Wein oder Schnaps) <input type="checkbox"/> mehr als eine Flasche Bier (1-2 Glas Wein oder Schnaps)
26) Haben Sie in Ihrem Leben über einen längeren Zeitraum (mehr als 2 Jahre) mindestens 5 Zigaretten pro Tag geraucht? <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> ja

Herzlichen Dank für Ihre Mitwirkung!

Bitte beachten Sie die nächste Seite.

Wir haben noch einige abschließende Fragen an Sie:

Wir können Ihnen leider keine persönlichen Untersuchungsergebnisse der genetischen Analysen mitteilen. Aufgrund vieler Rückfragen von Patienten führen wir jedoch eine separate Adressendatei für die Zusendung **allgemeiner** Informationen zum Fortgang des Projektes.

Möchten Sie weiter über die allgemeinen Ergebnisse der Studie auf dem Laufenden gehalten werden? Wenn ja, werden wir Ihren Namen und Ihre Adresse aufbewahren, um Sie über die neuesten Fortschritte zu informieren. Diese Daten werden natürlich getrennt von Ihren persönlichen Untersuchungsdaten gespeichert.

- ja, ich möchte weiter informiert werden
- ja, ich möchte per E-Mail informiert werden:

- nein, ich möchte nicht weiter informiert werden

In Zukunft werden Folgestudien zu dieser Untersuchung durchgeführt. Wir würden uns freuen, wenn auch Sie wieder daran teilnehmen. In diesem Fall werden wir Ihren Namen und Ihre Adresse getrennt von Ihren Studiendaten für eine erneute Kontaktaufnahme zu Beginn der Folgestudie speichern.

Sind Sie bereit, an einer Folgestudie teilzunehmen?

- ja
- nein

*Haben Sie Fragen, wenden Sie sich bitte an das **popgen**-Team (Tel.: 0431/597-3710). Sie können uns auch eine E-mail schicken: info@popgen.de*

Nochmals vielen Dank! Und alles Gute für Sie!



Ihr

Forschungsteam

8. DANKSAGUNG

Diese Studie wurde unterstützt durch das „National Genome Research Network“ (NGFN), der POPGEN Biodatenbank, der nationalen Genotypisierungs-Plattform und dem NGFN Netzwerk für umweltbedingte Erkrankungen.

Für die Mithilfe aller Patienten, deren Familien und für die Mitarbeit aller beteiligten Ärzte, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre, möchte ich mich herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Huberta von Eller-Eberstein und ihrem Team der POPGEN Biodatenbank.

Ohne die Hilfe der Chefarzte der teilnehmenden chirurgischen Kliniken wäre eine so hohe Zahl an Patienten nicht möglich gewesen. Herzlichen Dank für die tatkräftige Unterstützung und die Begeisterung, die Sie unserem Projekt entgegengebracht haben:

Prof. Dr. Ilka Vogel – Städtisches Krankenhaus Kiel, PD Dr. Hermann Dittrich – Kreiskrankenhaus Rendburg, Dr. Jürgen Belz – Klinikum Husum, Dr. Rainer Quäschling – Kreiskrankenhaus Eckernförde, PD Dr. Hodjat Shekarriz – Martin Luther Krankenhaus Schleswig, Prof. Dr. Werner Neugebauer – St. Franziskus Hospital Flensburg, PD Dr. Volker Mendel – Diakonissenkrankenhaus Flensburg, Prof. Dr. Friedrich Kallinowski – Westküstenklinikum Heide, Prof. Dr. Anton Schafmayer – Klinikum Lüneburg, Prof. Dr. Sebastian Debus – AK Hamburg Harburg, Prof. Dr. Eberhard Gross - AK Hamurg Barmbek, Prof. Dr. Wolfgang Teichmann – AK Hamburg Altona, Dr. Lutz Steinmüller – AK Hamburg Eilbek, Prof. Dr. Marco Seiler – AK Hamburg Bergedorf, Prof. Dr. Benno Stinner – Klinikum Stade, Prof. Dr. Hans Fred Weiser – Klinikum Rotenburg, Prof. Dr. Eick Hartwig Egberts – Klinikum Detmold, Prof. Dr. Guido Schürmann – Klinikum Itzehoe, Dr. Jiri Klima – Klinikum Niebüll, Prof. Dr. Albrecht Eggert – Krankenhaus Reinbek St. Adolf Stift, PD Dr. Nicolas Schwarz – Friedrich Ebert Krankenhaus Neumünster, PD Dr.med. Dipl.Ing. Günter Fröschele – Asklepiosklinik Bad Oldesloe, Prof. Dr. Dr. Hendrik Schimmelpenning – Klinikum Neustadt, Prof. Dr. Heiner Wenk - Kinikum Bremen Nord

Für die Unterstützung im Bereich Technik und IT gilt mein besonderer Dank: Tanja Weese, Birthe Petersen, Lena Bossen, Susan Ehlers, Meike Davids und Rainer Vogler.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Stephan Buch aus dem Institut für Klinische Molekularbiologie in Kiel, für stets schnelle Hilfe per e-mail, Telefon oder bei kurzweiligen Sitzungen im Labor.

Danken möchte ich meiner Kollegin Heike Wolken, die mich auf das Projekt aufmerksam gemacht hat und mich in die Materie eingearbeitet hat.

Für die Durchhalteparolen und Ihr großes Verständnis in der Zeit der Niederschrift dieser Arbeit danke ich meiner Partnerin und Kollegin Jasmin Evers.

Den Initiatoren des Projekts, Herrn PD Dr. med. Jochen Hampe, sowie Herrn PD Dr. med. Jürgen Tepel möchte ich für die hervorragende Projektleitung und die stete Unterstützung herzlichst danken. Die äußerst kollegiale Zusammenarbeit hat mir großen Spaß gemacht und wird mir immer in Erinnerung bleiben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Clemens Schafmayer MBA, für die Überlassung des Dissertationsthemas und das in mich gesetzte Vertrauen. Für seine herausragende Betreuungsarbeit, seine Unermüdlichkeit und Professionalität sowie für das stets offene Ohr kann ich nicht genug danken. Ohne sein Engagement wäre diese Arbeit nie zustande gekommen!

9. LEBENSLAUF

Name	Sven Schwiedernoch
Geburt	02.06.1978 in Heidelberg
Eltern	Monika Schwiedernoch (geb. Gantert), Sprachheilpädagogin und Dr. med. Gerd Schwiedernoch, Facharzt für Orthopädie

Schulbildung

1984 – 1988	Besuch der Mönchhof Grundschule Heidelberg
1988 – 1993	Besuch des Kurfürst Friedrich Gymnasiums Heidelberg
1993 – 1998	Besuch des Heidelberg College Heidelberg Abschluss der allgemeinen Hochschulreife
1998 – 1999	Zivildienst Johanniter Unfall Hilfe e.V., Mannheim

Studium der Humanmedizin

10/2001	Aufnahme des Studiums an der Christian Albrecht Universität zu Kiel
09/2004	Ärztliche Vorprüfung
10/2005 – 09/2008	Anfertigen der vorliegenden Dissertation
08/2007	Veröffentlichung: Genetic investigation of DNA-repair pathway genes PMS2, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, OGG1 and MTH1 in sporadic colon cancer.; Schafmayer C et al.; Department of General and Thoracic Surgery, Christian-Albrechts-University, Kiel, Germany; Int J Cancer. 2007 Aug 1;121(3):555-8.
11/2008	Ärztliche Prüfung und Erhalt der Approbation als Arzt